

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação

**Determinação de Na, K, Ca e Mg em amostra de requeijão por técnicas de
espectrometria atômica após digestão ácida com sistema de refluxo e
solubilização em TMAH**

Leila Maria Neves Diniz

Pelotas, fevereiro 2016

Leila Maria Neves Diniz

Determinação de Na, K, Ca e Mg em amostra de requeijão por técnicas de espectrometria atômica após decomposição ácida com sistema de refluxo e solubilização em TMAH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química (ênfase em Química Analítica).

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes
Co-Orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Pelotas, fevereiro 2016

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “Determinação de Na, K, Ca e Mg em amostra de requeijão por técnicas de espectrometria atômica após decomposição ácida com sistema de refluxo e solubilização em TMAH”, de autoria de Leila Maria Neves Diniz.

Banca examinadora:

.....
Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes (Orientadora - UFPel)

.....
Profa. Dra. Daiane Dias (FURG)

.....
Profa. Dra. Mariana Antunes Vieira (UFPel)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela serenidade e força em mais essa conquista. Aos meus pais, Antônio e Amélia, e irmãos, Glauce e Estêvão, que mesmo distantes se fizeram presentes pelo amor que nos une. Aos meus sogros Márcio e Soraia, e minha avó Lia, pelas orações e carinho. Meus cunhados Érika, Michelle, Felipe e Diego pela torcida e presença (online).

Em especial agradeço ao meu amado companheiro Fabrício, por estar sempre ao meu lado, me incentivar e fazer com que eu acredite mais em mim.

Ao Programa de Pós-graduação em Química por possibilitar a execução desse trabalho e a FAPERGS pelo apoio financeiro.

A professora Adriane e ao professor Anderson pela oportunidade e por compartilharem seus conhecimentos e experiências.

A amiga Aline Medina pela ajuda e dedicação, que com seu imenso conhecimento me incentivou e mostrou a importância de estudar sempre e tornar possível mais essa vitória.

Aos inesquecíveis amigos do LABMEQUI Eliete, Marcelo, Jana, Manu, Camila Oliz, Ane e Natiele, pelos maravilhosos e memoráveis momentos de descontração e troca de conhecimentos dentro e fora do laboratório.

Aos colegas do LABMEQUI Richard, Eliézer, Alexander, Camila Pereira, Ana Clara, Daísa, Thaianne, Patrícia e Paulo pelas ajudas e trocas de experiências e conhecimentos.

As grandes amigas Sílvia, Priscila, Meibel, Lara e Marilice que tornaram Pelotas um Lar.

A todos que tiveram comigo, MUITO OBRIGADA!

Título: Determinação de Na, K, Ca e Mg em amostra de requeijão por técnicas de espectrometria atômica após decomposição ácida com sistema de refluxo e solubilização em TMAH

Autora: Leila Maria Neves Diniz

Orientador: Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

RESUMO

Neste trabalho foram propostos dois procedimentos de preparo de amostras a fim de determinar Na e K por F AES e Ca e Mg por F AAS em amostras de requeijão. O primeiro procedimento foi realizado através da decomposição ácida (mistura de HNO_3 e H_2SO_4) com sistema de refluxo e o segundo a solubilização alcalina com o uso de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH). Os procedimentos foram otimizados utilizando o delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar a significância das variáveis. As condições otimizadas foram, para a decomposição ácida 875 mg de amostra, 3 mL de H_2SO_4 , 325 °C e 3 h, e para a solubilização alcalina 300 mg de amostra e 100 μL de TMAH. A exatidão foi avaliada por testes de adição e recuperação, sendo obtidas recuperações entre 80 e 102 % para o procedimento 1 e 80 a 104 % para o procedimento 2. A exatidão foi comprovada ao comparar as concentrações dos elementos obtidas após a realização dos procedimentos propostos com o procedimento de referência (decomposição por via seca) ao aplicar o teste Tukey a 95 % de confiança não houve diferença significativa. A título de comparação as concentrações dos elementos foram determinadas pela técnica de MP AES. Os resultados mostraram a simplicidade e eficiência dos procedimentos no preparo de amostras de requeijão, apresentando como alternativas viáveis para o controle de Na e para a determinação dos elementos K, Ca e Mg.

Palavras-chave: requeijão; preparo de amostra; decomposição ácida, solubilização alcalina, F AAS/AES, MP AES.

Título: Determination of Na, K, Ca e Mg in brazilian cheam cheese by atomic spectrometry techniques after acid decomposition with refluxing system and solubilization TMAH

Autora: Leila Maria Neves Diniz

Orientador: Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

ABSTRACT

In this work there were evaluated two sample preparation procedures for subsequent determination of Na, K, Ca and Mg in brazilian cream cheese (locally know as “requeijão”) samples by atomic spectrometry techniques. The first procedure was realized by acidic decomposition ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) in a reflux system, and the second used the alkaline solubilization with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). The procedures were optimized using central composite design (CCD) to assess the significance of the variables and thus establish the best working conditions. The optimized conditions was for the first procedure was 875 mg of sample, 3 mL of H_2SO_4 , 325 °C on the digester block and 180 min of decomposition time. For the second procedure was 300 mg of sample mass and 100 μL of TMAH. The accuracy was verified by recovery tests and the results were between 80 and 104 % for both procedures. A comparison with a reference procedure was also performed and applying the Tukey test at 95 % confidence level, and no significant differences have been observed. The MP AES was used for comparison of the analyte results. The results showed the simplicity and efficiency of procedures in the preparation of brazilian cream cheese samples , presenting as viable alternatives for the control of Na and for the determination of elements K , Ca and Mg .

Keywords: brazilian cream cheese, sample preparation, acid decomposition, alkaline solubilization, F AAS/AES, MP AES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica.....	11
Figura 2. Modelo esquemático do sistema de dedo frio adaptado por Ferreira e colaboradores (2013).	18
Figura 3. Esquema do sistema de dedo frio acoplado ao tubo digestor confeccionado por Orestes e colaboradores (2013).....	20
Figura 4. Diagrama de Pareto para a decomposição ácida com sistema de refluxo na determinação de Na (A), K (B) e Ca (C) e Mg (D).	34
Figura 5. Superfícies de respostas para decomposição ácida com sistema de refluxo na determinação de Na (A), K (B), Ca (C) e Mg (D) em função da massa, temperatura e tempo	35
Figura 6. Diagrama de Pareto para a solubilização com TMAH na determinação de Na (A), K (B) e Ca (C) e Mg (D).	39
Figura 7. Superfícies de respostas para solubilização com TMAH na determinação de Na (A), Ca (B) e Mg (C) em função da massa e volume de TMAH	40
Figura 8. Efeito do pH sobre a solubilização da caseína.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros operacionais para determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de requeijão por F AAS/AES	25
Tabela 2. Parâmetros operacionais para determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de requeijão por MP AES	26
Tabela 3. Matriz DCCR para determinação de Na e K por F AES e Ca e Mg por F AAS na amostra 1 após decomposição ácida com sistema de refluxo	29
Tabela 4. Matriz DCCR para determinação de Na e K por F AES e Ca e Mg por F AAS na amostra 1 após solubilização em TMAH	30
Tabela 5. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial para decomposição ácida com sistema de refluxo da amostra 1	30
Tabela 6. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial para solubilização da amostra 1 em TMAH	30
Tabela 7. Análise de variância para a superfície de resposta do modelo quadrático para a determinação de Na, K, Ca e Mg em requeijão por F AES/AAS após decomposição ácida	35
Tabela 8. Análise de variância para a superfície de resposta do modelo quadrático para a determinação de Na, K, Ca e Mg em requeijão por F AES/AAS após solubilização com TMAH	40
Tabela 9. Concentrações de Na, K, Ca e Mg (mg g^{-1}) antes e após as adições de diferentes concentrações dos elementos na amostra 1 por decomposição ácida com sistema de refluxo	43
Tabela 10. Concentrações de Na, K, Ca e Mg (mg g^{-1}) antes e após as adições de diferentes concentrações dos elementos na amostra 1 por solubilização com TMAH	44
Tabela 11. Concentração média dos elementos (mg g^{-1}) e RSD % para Na e K por F AES e Ca e Mg por F AAS após os três preparos de amostra	45

Tabela 12. Parâmetros de mérito das técnicas F AAS/AES e MP AES para decomposição ácida com sistema de refluxo, solubilização alcalina com TMAH e decomposição via seca 47

Tabela 13. Concentrações de Na (mg/30g de requeijão) informadas no rótulo e a média das concentrações (mg/30 g requeijão) determinadas para as cinco amostras analisadas 49

Tabela 14. Concentração de Na, K, Ca e Mg (mg g^{-1}), nas amostras 2, 3, 4, 5 e 6, obtidas por F AAS/AES e MP AES após os procedimentos 1 e 2 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

POF: Pesquisas de Orçamento Familiar

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

OMS: Organização Mundial da Saúde

MS: Ministério da Saúde

ABIA: Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação

F AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (em inglês, *Flame Atomic Absorption Spectrometry*)

F AES: Espectrometria de Emissão Atômica com Chama (em inglês, *Flame Atomic Emission Spectrometry*)

GF AAS: Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (em inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)

MP AES: Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Excitado por Micro-ondas (em inglês, *Microwave Induced Plasma Atomic Emission Spectrometry*)

AOAC: Métodos analíticos oficiais (em inglês, *Association of Official Analytical Chemists*)

IAL: Instituto Adolfo Lutz

ICP OES: Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (em inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

PA: Pressão Arterial

SBC: Sociedade Brasileira de Cardiologia

HCL: Lâmpada de Catodo Oco (em inglês, *Hollow Cathode Lamp*)

PE: Ponto de Ebulição

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

MSR: Metodologia de Superfície de Resposta

LD: Limite de detecção

RSD: Desvio Padrão Relativo (em inglês, *Relative Standard Deviation*)

MRC: Material de Referencia Certificado

FDA: *Food and Drug Administration*

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. O requeijão	4
2.2. Composição de leite e derivados	5
2.3. Sódio nos alimentos processados	6
2.4. Espectrometria atômica na determinação de minerais	9
2.4.1. Espectrometria de absorção atômica (AAS)	10
2.4.1.1. Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS)	11
2.4.2. Espectrometria de emissão atômica (AES)	12
2.5. Preparo de amostra	14
2.5.1. Decomposição ácida por via úmida	15
2.5.1.1. Decomposição ácida em sistema aberto	16
2.5.1.2. Decomposição ácida por radiação de micro-ondas	17
2.5.1.3. Decomposição ácida com sistema de refluxo	18
2.5.2. Decomposição por via seca em forno mufla	21
2.5.3. Solubilização alcalina com TMAH	23
3. Parte Experimental	25
3.1. Instrumentos e parâmetros instrumentais.....	25
3.2. Reagentes e soluções	27
3.3. Amostras	27
3.4. Preparo das amostras	27
3.4.1. Planejamento fatorial DCCR – Otimização dos procedimentos	28
3.4.1.1. Decomposição ácida com sistema de refluxo – Procedimento 1..	31
3.4.1.2. Solubilização alcalina com TMAH – Procedimento 2.....	31
3.4.2. Decomposição ácida por via seca (método de referência) –	
Procedimento 3.....	31
3.4.3. Aplicação das condições otimizadas.....	32
4. Resultados e discussões.....	33

4.1. Planejamento fatorial DCCR – otimização dos procedimentos 1 e 2	33
.....	
4.1.1. Decomposição ácida com sistema de refluxo – Procedimento 1	33
.....	
4.1.2. Solubilização alcalina com TMAH – Procedimento 2	38
4.3. Resultados analíticos	42
4.4. Aplicação dos procedimentos propostos	48
5. Conclusão	51
6. Referências bibliográficas	52

1. Introdução

O requeijão é um produto legitimamente brasileiro, definido como um produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite, opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou butter oil. Ao produto podem ser adicionados condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias. O requeijão cremoso é um queijo pertencente ao grupo denominado fundidos, processados e pasteurizados (BRASIL, 1997).

Recentemente cresce a discussão acerca da necessidade de alguns laticínios como, bebidas lácteas, mussarela e requeijão, se adaptarem à produção reduzindo os teores de sódio (ZACARCHENCO, 2009). A necessidade nutricional de sódio para humanos é pequena, 500 mg (cerca de 1,2 g de sal). Ao analisar o consumo *per capita*, as Pesquisas de Orçamentos Familiares (POF) de 2002–03 e 2008–09 mostraram que mais de 70 % da população brasileira consome Na em excesso, estimando uma ingestão média diária de 12 g de sal/pessoa (BRASIL, 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como limite máximo para ingestão diária, 5 g de sal de cozinha (que corresponde a 2 g de Na) (NAKASATO, 2004).

Dentro desse contexto foi firmado um acordo voluntário, em 2010, entre o Governo do Brasil e a Associação Brasileira de Indústrias de Alimentação (ABIA) para reduzir o teor de sódio em dezesseis categorias de alimentos, sendo o requeijão um integrante desta relação. Esse acordo visa reduzir o consumo excessivo de sal, que está associado a uma série de doenças crônicas, como hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, problemas renais e cânceres (FORMENTI, 2011).

Os minerais (Na, K, Ca e Mg) presentes em alimentos processados, como o requeijão, podem ser determinados por técnicas analíticas de espectrometria atômica. De La Fuente e colaboradores (1997) determinaram Ca, Mg, Na e K pela técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) em produtos lácteos. Nunes e colaboradores (2011) utilizaram a técnica de F AAS na determinação de Ca, Fe e Mg, e a técnica de espectrometria absorção atômica

com forno de grafite (GF AAS) na determinação de Cu, em amostras de carne fresca e processada.

Nos últimos anos, a instrumentação analítica, para determinação de metais tem sofrido avanços consideráveis. A técnica de espectrometria de emissão atômica com plasma excitado por micro-ondas (MP AES) é nova e cada vez mais utilizada na determinação de metais em amostras diversas. Amais e colaboradores (2013) utilizaram a técnica para determinar Si em diesel e biodiesel, Ozbek e colaboradores (2015) determinaram B em aço e vinho e Ozbek e colaboradores (2016) determinaram Ca, K e Mg em diversas amostras de queijos da Turquia. A técnica possui vantagens que a torna atrativa, como a análise multielementar simultânea, altas sensibilidade e precisões, rapidez, bem como ampla faixa linear de trabalho.

O uso dessas técnicas analíticas requer um pré-tratamento das amostras visando a sua preparação para posterior determinação dos elementos. O requeijão, por ser uma matriz complexa, com elevados teores de compostos orgânicos, necessita desse preparo prévio da amostra (SILVA, 2001).

De maneira geral, o preparo de amostras pode envolver aquecimento na presença de diferentes ácidos oxidantes fortes, tais como, o nítrico (HNO_3), sulfúrico (H_2SO_4) e perclórico (HClO_4), ou a combinação deles, além de agentes oxidantes, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KRUG, 2010). Os métodos convencionais de preparo mais utilizados para determinação de minerais em amostras orgânicas, por técnicas espectrométricas, são os que se baseiam no uso de decomposições ácidas por via seca ou por via úmida em sistema aberto (AOAC, 1995; IAL, 2008). A decomposição úmida também pode ser realizada em sistema semi-fechado (FERREIRA, 2013; ORESTE, 2013) ou por radiação micro-ondas (KORN, 2008; KRUG, 2010). No entanto, a decomposição ácida a altas temperaturas em sistemas abertos não é viável devido a possíveis perdas de elemento e evaporação do solvente, e o uso de sistema fechado em altas temperaturas e sob pressão, possui riscos se não forem tomados os devidos cuidados (KRUG, 2010).

Uma alternativa promissora que visa contornar tal problemática, utiliza a decomposição ácida com sistema de refluxo (dedo frio), que foi desenvolvida e testada por Ferreira e colaboradores (2013). Oreste e colaboradores (2013) acoplaram a esse sistema a recirculação de água para resfriamento dos dedos

e utilizaram essa técnica no preparo de amostras biológicas a fim de determinar Hg por CV AAS. O mesmo sistema foi utilizado por Pinheiro e colaboradores (2014) para determinação de Cu, Fe, Mn e Zn pela técnica F AAS em amostras de arroz e por Souza e colaboradores (2015) no preparo de amostras de goma xantana e posterior determinação de Cu e Pb pela técnica GF AAS. Oliveira e colaboradores (2016) utilizaram o sistema para preparar amostras de arroz branco, parboilizado e integral e posterior determinação de As, Cd, Pb e Se por GF AAS.

Uma outra alternativa simples utilizada para o preparo de amostras orgânicas é o uso do hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), principalmente para solubilizar amostras biológicas. Amostras tratadas com TMAH fornecem uma solução com características de suspensão, apresentando um baixo fator de diluição e permanecendo estáveis por meses em temperatura ambiente (NÓBREGA, 2006). Trabalhos como de Ribeiro e colaboradores (2003) utilizaram a solubilização com TMAH em amostras de leite e café em pó para determinação de diferentes elementos pela técnica de ICP OES.

Considerando a falta de informação na literatura a respeito de um preparo de amostra que seja comprovadamente adequado para requeijão e prezando praticidade, rapidez e eficiência, o trabalho tem como objetivo desenvolver dois procedimentos de preparo de amostras de requeijão: decomposição ácida, utilizando mistura de HNO_3 e H_2SO_4 em sistema de refluxo e solubilização alcalina com TMAH, para posterior determinação das concentrações de Na e K por espectrometria de emissão atômica com chama (F AES) e Ca e Mg por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS). A técnica MP AES também foi utilizada na determinação dos quatro elementos a título de comparação dos resultados, ao aplicar os procedimentos propostos às amostras comerciais.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O requeijão

O requeijão é um queijo tipicamente brasileiro, originado como uma forma de aproveitamento do leite coagulado espontaneamente devido à ação da microbiota láctica natural do leite. Produzido pela utilização do leite desnatado, uma prática proveniente da época em que a manteiga era o derivado do leite mais valorizado (VAN DENDER, 2006). É definido como um produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite, opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou *butter oil*. Ao produto podem ser adicionados condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias (BRASIL, 1997).

O requeijão cremoso é um queijo pertencente ao grupo denominado fundidos, processados e pasteurizados. É consumido normalmente logo após a fabricação e deve apresentar sabor ligeiramente ácido, opcionalmente salgado, agradável ao paladar, aroma característico e consistência untável (BRASIL, 1997).

O princípio de fabricação de queijos fundidos consiste em fundir os dois elementos principais do queijo, a proteína e a gordura. A fusão ocorre quando a matéria-prima é submetida ao calor e à agitação mecânica. Durante o processo é necessário o emprego de produtos emulsificantes conhecidos como sais fundentes (citratos, monofosfatos e polifosfatos de sódio), com o propósito de evitar a separação da gordura e da água. Os sais fundentes promovem a emulsificação da mistura (gordura, proteína e água), fornecendo um produto final homogêneo e estável (VAN DENDER, 2006). No mercado existem queijos, chamados requeijão, com diferentes teores de umidade e, com isso, consistência específica, com cremosidade e propriedade de espalhabilidade, como o requeijão cremoso, até produtos firmes e até mesmo fatiáveis como o requeijão do norte. O mesmo ocorre com relação ao teor de gordura, que pode variar desde elevado até praticamente sem gordura. O sabor também possui variação, seja por meio da combinação de diferentes queijos para compor a mistura, ou ainda e, principalmente, mediante a utilização de condimentos ou outros

ingredientes alimentícios de sabor característico. Portanto, não existe um padrão típico para os produtos comercializados com a denominação de requeijão (OLIVEIRA, 1986; CAVALCANTE, 1991; VAN DENDER, 2009).

2.2. Composição de leite e derivados

O leite bovino é composto por água, lactose, gordura, proteínas e minerais. Juntos formam uma mistura homogênea de grande número de substâncias, das quais algumas estão em emulsão (gordura e substâncias associadas), suspensão (caseínas ligadas e sais minerais) e outras em solução (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais, etc.) (OLIVEIRA, 2012).

Os minerais essenciais constituintes no leite estão presentes, muitas vezes, como sais, principalmente de cloretos, fosfatos, citratos, bem como, bicarbonato de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Os íons Na^+ , K^+ e Cl^- , presentes nesses sais, estão quase totalmente como íons livres, os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} ocorrem principalmente como complexos. Esses últimos se ligam as proteínas do leite, tanto como íons individuais quanto como estruturas complexas, nas micelas de caseína. Essas interações afetam a estabilidade e a funcionalidade das proteínas do leite, por isso, os sais do leite desempenham um papel importante nas propriedades dos produtos lácteos (CAROLI, 2007; DAMODARAN, 2010).

Os derivados do leite fornecem alguns dos principais constituintes como, gordura, proteínas, vitaminas e minerais, os quais são necessários para o crescimento saudável de diferentes tecidos, o bom desempenho das funções orgânicas, assim como o funcionamento de muitos sistemas enzimáticos (BIEGO, 1998; WILLIAMS, 1997). Esses componentes estão presentes de forma variável nos derivados do leite, assim como conservantes, aditivos e sal (NaCl), os quais são adicionados durante o processamento (SA, 1978).

2.3. Sódio nos alimentos processados

O sódio é um mineral presente em diversos alimentos, sendo o constituinte principal do sal de cozinha (cloreto de sódio - NaCl). O uso mais antigo e reconhecido do sal é na preservação dos alimentos, incluindo carnes, peixes, legumes e frutas. A salga impede a deterioração, extraindo a água, o que diminui a umidade necessária para proliferação de bactérias. Hoje, o sal ainda é muito utilizado para tal finalidade, sendo o uso maior para fins industriais no processamento dos alimentos, promovendo o sabor e aumentando a vida de prateleira dos mesmos (IFIC, 2010).

A rotina conturbada e a praticidade contribuem para o aumento no consumo dos produtos industrializados dentro e fora das residências, o que acarreta na redução da ingestão de alimentos naturais. Esse padrão alimentar pode ocasionar efeitos nocivos à saúde, sendo que a ingestão excessiva de sódio (Na) está diretamente relacionada com a elevação da pressão arterial (PA). A causa da hipertensão arterial é desconhecida, porém, vários são os fatores que podem estar associados à elevação da PA, tais como, idade, gênero e etnia, excesso de peso e obesidade, ingestão de álcool, sedentarismo, fatores socioeconômicos, genética e a ingestão excessiva de sal (SBC, 2006).

A necessidade nutricional de sódio para os seres humanos é pequena, 500 mg (cerca de 1,2 g de sal), porém ao analisar o consumo alimentar pessoal, as Pesquisas de Orçamentos Familiares (POF) de 2002–03 e 2008–09 mostraram que mais de 70% da população brasileira consumiam Na em excesso, estimando uma ingestão média diária de 12 g de sal (BRASIL, 2011). Devido a esse consumo excessivo, a Organização Mundial de Saúde definiu em 5 g de sal de cozinha (que corresponde a 2 g de Na) a quantidade considerada máxima saudável para ingestão alimentar diária (NAKASATO, 2004).

Mundialmente, programas de redução gradual de sódio nas diversas categorias de alimentos têm sido estabelecidos pelos órgãos públicos e autoridades. Estes programas são formados em conjunto com as indústrias de alimentos e formadores de opinião em diversos países como, a Itália (*Gaining Health*), Bélgica (*Federal Nutrition Plan for Nutrition & Health*), Suécia, Dinamarca, Polônia (*National Strategy for Sodium Reduction*), Hungria (*Hungarian Salt Reduction Program*), Canadá (*Health Canada Multi Stakeholder*

Working Group on Sodium Reduction), Turquia e África do Sul (*Use Salt Sparingly*), todos esses com planos de redução de sódio estruturados (BANNWART, 2014).

No Brasil, um acordo voluntário denominado 'Plano de redução do sódio em alimentos processados', que é parte do plano de redução do consumo de sal pela população brasileira, foi firmado pela Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA) e o Ministério da Saúde (MS), com o objetivo de reduzir o conteúdo máximo de sódio em diferentes categorias de alimentos, de forma gradual e sustentável, até 2020. Dentre essas categorias estão os produtos lácteos, e entre esses o requeijão, que deve ter o conteúdo de sódio reduzido (BRASIL, 2011).

A diminuição da quantidade de Na é possível de forma gradual, com um intervalo de 8 a 12 semanas para que o paladar se habitue, sendo que não são perceptíveis diminuições da ordem dos 10 a 20% (VIEGAS, 2009). Esse espaço de tempo é necessário para que o organismo se adapte de forma progressiva o nível de detecção de sódio, de acordo com as alterações alimentares efetuadas (IFIC, 2010).

A redução do teor de sal nos alimentos, é um grande desafio do ponto de vista tecnológico e sensorial, uma vez que resulta não apenas em redução do gosto salgado e aceitabilidade, mas também pode impactar as importantes funções que este ingrediente desempenha na produção e conservação de muitos alimentos. Diversos compostos têm sido estudados a fim de compensar os impactos sensoriais causados ao reduzir o teor de sal em diferentes produtos. Esses estudos estão em torno do uso de realçadores de sabor, compostos proteicos, ervas, especiarias e aromas, que auxiliem no balanço das formulações reduzidas em sódio, de maneira a manter a aceitação dos consumidores. Até o momento, entretanto, não se alcançou uma solução ideal para todos os tipos de alimentos, devido à exclusividade do sódio como estímulo para o gosto salgado, além das implicações de custo em produtos finais (DÖTSCH, 2009; DOYLE, 2010; COBCROFT, 2008; REDDY, 1991; LIEM, 2011).

Segundo Johnson e colaboradores (2009) o cloreto de potássio (KCl) é o composto que mais se assemelha quimicamente ao NaCl. Pesquisas que estudam as possíveis substituições do NaCl mostram que a substituição parcial por KCl é aceitável pelo consumidor, para muitos alimentos, desde que não

ultrapasse 30% a 40% de KCl (LINDSAY, 1982; GUÀRDIA, 2006). Pollonio (2009) afirma que em teores de substituição acima de 40% de KCl, dependendo do produto, resulta em aumento significativo do gosto amargo e perda de gosto salgado.

A busca por substituições em queijos tem sido estudada por vários pesquisadores. Katsiari e colaboradores (1997) avaliaram a qualidade do queijo feta ao substituir de 50 e 75 % da quantidade de NaCl por KCl. De acordo com os autores, os produtos finais mostraram-se viáveis sem efeito adverso na qualidade final do queijo. Rodrigues e colaboradores (2013) estudaram as características sensoriais ao substituir 30 e 54 % de Na por um mix de NaCl, KCl e glutamato monossódico na produção de queijo mussarela. Os resultados dos testes apresentaram perfil de sabor salgado semelhante ao queijo sem substituição, porém com menos intensidade. Gomes e colaboradores (2011) avaliaram o efeito da substituição parcial do NaCl pelo KCl (0 %, 25 %, 50 % e 75 %) na produção de queijo Minas Frescal. Ao fim observaram que a redução do teor de sódio em até 50 %, o queijo apresentou boa aceitação sensorial. Martins (2015) estudou a substituição de 50 % de NaCl por 50 % de KCl e 30 % NaCl por 70 % de KCl em queijo Minas padrão e avaliou o efeito da redução de sódio nas características físico-químicas do queijo. Os queijos com substituição de sódio apresentaram menor teor de umidade, com elevado teor de acidez titulável e menor atividade proteolítica quando comparado ao queijo controle. O estudo mostrou que a substituição de sódio pelo potássio na proporção de 50% e 70% não causou grandes alterações na composição centesimal e não afetou as características microbiológicas das formulações de queijos.

Na produção dos queijos processados ou fundidos, por exemplo o requeijão, as fontes de sódio são o cloreto de sódio (NaCl), com a finalidade de enriquecer o sabor, melhorar a textura e a aparência do queijo, controlar a fermentação láctica, determinando o nível ideal de acidez, inibir o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis e auxiliar na retirada do soro, e os sais fundentes (citratos, monofosfatos e polifosfatos de sódio) que possuem como função sequestrar o Ca e ajustar o pH, o que ajuda a hidratar a caseína, facilitando a interação entre a água e a gordura, produzindo uma emulsão homogênea, esses sais utilizados em quantidades corretas são capazes de desenvolver todas as características necessárias como troca de

íons, peptização da proteína, estabilização da emulsão, regulação do pH, ação tampão e cremificação (VAN DENDER, 2006; BORZANI, 2001).

A diminuição da quantidade Na em requeijão tem sido estudada pelo grupo da TECNOLAT/ITAL ao desenvolver e otimizar tecnologia de fabricação e formulações de requeijões sem gordura e com teor reduzido de Na, com substituição tanto do NaCl como dos sais fundentes a base de Na. O grupo ressalta que para cada formulação de requeijão é importante avaliar as melhores soluções tecnológicas para redução da quantidade de sódio. Estas soluções são alcançadas através da realização de estudos de desenvolvimento e avaliação físico-química, microbiológica e sensorial, durante a fabricação e estocagem refrigerada de formulações de requeijão ou outros queijos fundidos (VAN DENDER, 2015).

Van Dender e colaboradores (2012) desenvolveram um requeijão sem adição de gordura e com teor reduzido de sódio. A gordura foi substituída por concentrado de proteína do soro e a redução do teor de sódio pela substituição de 40% do cloreto de sódio (NaCl) por cloreto de potássio (KCl) e de parte do sal fundente tradicional, com teor de sódio de 30,5 %, por um sal fundente com teor de sódio de 8,2 %. Os resultados foram positivos para os parâmetros físico-químicos (teor de sódio e de gordura no extrato seco) e sensoriais.

Como dito, o requeijão é um dos produtos derivados do leite que necessitam controlar a adição de Na em sua formulação. Aliando a necessidade de quantificação desse elemento à obtenção de informações dos minerais essenciais como, K, Ca e Mg, presentes nesse produto, informações essas escassas na literatura, está a química analítica com técnicas espectrométricas capazes de determinar elementos minerais presentes no requeijão.

2.4. Espectrometria atômica na determinação de minerais

As técnicas de espectrometria atômica utilizam a radiação magnética absorvida ou emitida por átomos no estado gasoso, a fim de determinar, de forma qualitativa ou quantitativa, os metais presentes em uma determinada amostra. As técnicas espectrométricas são rápidas e geralmente seletivas (KRUG, 2004; SKOOG, 2002).

Para as determinações, as espécies atômicas devem estar na forma gasosa, na qual os átomos individuais ou íons elementares se encontram separados uns dos outros. Com isso, a etapa mais importante dessas técnicas é a atomização, processo este onde a amostra é volatilizada e decomposta de forma a produzir uma fase gasosa de átomos e íons. Os atomizadores mais utilizados são: plasmas indutivamente acoplados, chamas, fornos de grafite, atomizadores eletrotérmicos (SKOOG, 2002).

A escolha da técnica irá depender principalmente da concentração dos elementos presentes na amostra (mg, µg, ng), promovendo a exatidão e a precisão requeridas, bem como do número de elementos a ser determinado (CAROLI, 2007). Os elementos que estão presentes em altas concentrações (mg), como Na, K, Ca e Mg em requeijão, podem ser facilmente determinados por técnicas monoelementares (F AAS ou F AES) ou multielementares (MP AES, ICP AES).

2.4.1. Espectrometria de absorção atômica (AAS)

A espectrometria de absorção atômica é uma técnica analítica baseada na absorção da radiação. Os átomos no estado fundamental são capazes de absorver energia luminosa em um comprimento de onda específico, alcançando um estado excitado. Com o aumento do número de átomos presentes, ocorre um aumento na quantidade de radiação absorvida. A quantidade do elemento presente na amostra é determinada pela variação da quantidade de luz transmitida e absorvida. Nessa técnica, fontes especiais de luz conjugadas com sistemas eficientes de seleção de comprimentos de onda permitem a determinação específica dos elementos (PROJAHN, 2004; SKOOG, 2002; WELZ, 1999). A quantificação dos elementos obedece aos princípios das leis de Lambert e Beer (SKOOG, 2002):

$$A = \log_{10} I_0/I_t = a b C \quad \text{equação 1}$$

Sendo: A = absorvância, I_0 = intensidade da radiação incidente emitida pela fonte de luz, I_t = intensidade da radiação transmitida (não absorvida), a = coeficiente de absorção do meio ou absortividade, b = espessura do volume de

observação ou volume de absorção, C = concentração de átomos no estado fundamental.

Um espectrômetro de absorção atômica é constituído basicamente por: uma fonte de radiação primária, sendo as mais utilizadas as lâmpadas de cátodo oco (HCL), com o objetivo de fornecer as raias de emissão do elemento; uma cela de atomização, geralmente uma chama, forno de grafite, plasma, vapor eletrotérmico, sendo esta a etapa crítica, onde ocorre a formação de vapor da solução que contém os átomos do elemento no estado fundamental, estando estes aptos a absorver a radiação proveniente da fonte de radiação; um conjunto de monocromador, onde ocorre a seleção das linhas dos elementos a serem determinados (comprimento de onda); um detector, que transforma o sinal de radiação em sinal elétrico; um amplificador e um sistema de leitura (SKOOG, 2002; WELZ, 1999). A Figura 1 apresenta de forma esquemática a configuração de um espectrômetro de absorção atômica (KRUG, 2004).

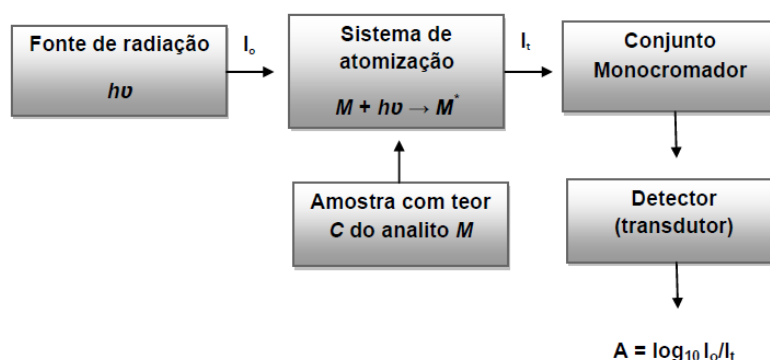


Figura 1. Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica

2.4.1.1. Espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS)

A Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS) é uma técnica monoelementar, sendo a chama a fonte de atomização dos elementos presentes na amostra. Os elementos chegam ao atomizador através de um sistema de nebulização pneumática, assim ocorre a produção de um aerossol constituído de microgotículas de solução da amostra, que é introduzida na chama de ar/acetileno ou N_2O /acetileno. Na chama o solvente é evaporado e os

sólidos remanescentes se separam em átomos. A F AAS é uma técnica muito utilizada, apresentando robustez, precisão, baixo custo de aquisição e manutenção do espectrômetro, além de proporcionar adequada seletividade com poucas interferências (WELZ, 1999; KRUG, 2004).

A atomização pela chama é a mais antiga dentre as técnicas de AAS. Foi desenvolvida em 1955 por Sir Allan Wash e sua disponibilização comercial iniciou a partir de 1962. Desde então, a FAAS tornou-se uma técnica analítica bem estabelecida que pode ser aplicada para a determinação de 70 elementos em uma variedade de matrizes, estando estes com concentrações em nível de ppm (mg L^{-1}). Por sua simplicidade de operação e custos, operacional e instrumental, relativamente baixos, esta técnica é popular e adequada para análises de rotina (PROJAHN, 2004; SKOOG, 2002; WELZ, 1999).

Na literatura são encontrados trabalhos que utilizam essa técnica na determinação de minerais em leite e derivados, como Sousa e colaboradores (2015) que avaliaram os teores de Fe e Zn em queijos *Petit Suisse* empregando a F AAS após a mineralização das amostras por via seca e úmida. Juárez e colaboradores (1995) e De La Fuente e colaboradores (1996) determinaram Ca e Mg em amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral, e de queijos, caseinato e leite em pó, respectivamente, por F AAS após decomposição ácida com HNO_3 e H_2O_2 em forno micro-ondas. Júnior e colaboradores (1999) utilizaram a técnica na determinação de Ca, Mg, Mn e Zn em leite de búfala, sendo avaliados os procedimentos de decomposição da amostra por solubilização em aminas terciárias e decomposição ácida com HNO_3 e H_2O_2 . Kaya e colaboradores (2008) determinaram Cu, Mn e Pb em iogurte por FAAS após decompor a amostra por via seca em mufla, decomposição ácida em sistema aberto e micro-ondas.

2.4.2. Espectrometria de emissão atômica (AES)

Na espectrometria de emissão atômica os átomos dos elementos presentes na amostra, no estado fundamental de energia, são excitados por uma energia externa (plasma, chama, descarga a baixa pressão ou laser). Os átomos são excitados momentaneamente e após alguns segundos (10^{-9}s), relaxam e voltam ao estado fundamental, fornecendo suas energias como fótons de

radiação visível ou ultravioleta. Os comprimentos de onda dos fótons emitidos são específicos para cada elemento e desta forma, podem ser utilizados para identificar a presença dos mesmos na amostra (SKOOG, 2002).

A fotometria de chama é uma técnica antiga, sendo a mais simples das técnicas analíticas baseadas em espectrometria de emissão atômica. Nessa técnica os átomos, na fase gasosa, são excitados pela chama, e ao retornarem para o estado fundamental, liberam a energia na forma de radiação eletromagnética, em comprimento de onda característico para cada elemento. No entanto, a fotometria de chama é restrita a determinação de poucos elementos como Na, K, Ca e Li.

Os metais alcalinos e alcalinos-terrosos emitem radiação eletromagnética na região do visível em uma chama composta por ar comprimido (oxidante) e gás butano (gás liquefeito de petróleo – GLP), que opera em uma temperatura entre 1700 e 1900 °C. Essa temperatura é relativamente baixa, mas proporciona a temperatura necessária para excitar os quatro elementos, sendo com isso, limitada a eles. Mesmo antiga, a técnica ainda é utilizada em análises de rotina (OKUMURA, 2004). Chen e colaboradores (2005) utilizaram a fotometria de chama para determinar sódio a fim de estimar a salinidade de alimentos processados. Oliz e colaboradores (2013) utilizaram a fotometria de chama na determinação de Na e K em carnes processadas após o preparo das amostras em microescala com TMAH e HCOOH. Os resultados mostram boas exatidão e precisão.

Temperaturas mais altas, em torno de 2100 e 2400 °C, podem ser conseguidas ao compor a chama com ar comprimido/gás acetileno e utilizar o espectrômetro de absorção atômica no modo emissão, o que restringe o uso de apenas um equipamento, além de abranger os elementos a serem analisados em diferentes tipos de amostras.

A Espectrometria de Emissão Atômica possui grande potencial para analisar elementos em determinações multielementares, sendo o espectrômetro de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) muito usado em determinações de metais em uma diversidade de amostras. Uma outra alternativa de fonte de excitação usada para determinações multielementares é o plasma por micro-ondas, onde o plasma é produzido através da transferência indutiva de energia a partir de ondas estacionárias em um ressonador adequado

e sustentado em um quartzo ou tubo cerâmico, que está localizado dentro de uma cavidade ressonante. Este sistema de eletrodo é comumente referido como plasma de micro-ondas (MP). Uma característica atraente dos equipamentos baseados no MP é a possibilidade de utilização de diferentes gases, Ar, He, N₂, ou mistura deles, Ar/He e N₂/O₂, para gerar o plasma. No MP-AES que utiliza a combinação N₂/O₂, o nitrogênio é fornecido através de um gerador de ar, o que reduz drasticamente o custo de operação em comparação com qualquer outra técnica de espectrometria atômica. O plasma é sustentado por nitrogênio à pressão atmosférica e a amostra é introduzida em forma de aerossol a partir de um nebulizador pneumático convencional (LI, 2013; JANKOWSKI, 2010).

2.5. Preparo de amostra

A escolha do preparo de amostra irá depender do tipo de técnica a ser utilizada para determinar os elementos. Apenas algumas técnicas como por exemplo, a fluorescência de raios X, permitem a introdução direta da amostra sem preparo prévio. O mesmo não ocorre com a análise elementar por técnicas de espectrometria atômica que possuem a introdução da amostra via capilar com uso de nebulização pneumática.

O procedimento de preparo de amostra deve ser compatível com a técnica analítica escolhida para determinação dos elementos, ou seja, se a técnica permite a análise direta de sólidos, o preparo irá depender da moagem e homogeneização; se a técnica permite determinações em solução, o preparo deverá transformar a amostra em solução (KRUG, 2010). Assim, vê-se a importância de primeiro escolher a técnica a ser utilizada na determinação dos elementos para que o preparo da amostra ideal seja selecionado, a fim de obter os melhores resultados analíticos.

A análise elementar de matrizes complexas como as de alimentos, por F AAS/AES e MP AES, requer um preparo da amostra. Nos preparos convencionais, a amostra é decomposta por ácidos com aquecimento, seja por via úmida, com uso de chapa de aquecimento, bloco digestor, micro-ondas ou por via seca em mufla. Preparos alternativos têm sido utilizados, como a formação de suspensões, após a solubilização parcial ou completa da amostra com reagentes alcalinos (KORN, 2008; NÓBREGA, 2006). No primeiro

procedimento, geralmente há eliminação da matriz, a fim de obter a espécie de interesse o mais livre possível em solução. No segundo, a amostra é dissolvida com reagentes adequados e pode ou não envolver reações químicas (PAES, 2007).

2.5.1. Decomposição ácida por via úmida

A decomposição ácida de amostras orgânicas e biológicas por via úmida geralmente implica no aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de misturas desses ácidos ou a mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os ácidos minerais oxidantes mais utilizados são o ácido nítrico (HNO_3), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido perclórico (HClO_4). Para garantir a oxidação completa da matéria orgânica, em formas inorgânicas simples e apropriadas para análise, algumas considerações são relevantes, como o poder oxidante do ácido utilizado e se o aquecimento será em temperaturas elevadas em um período de tempo adequado. Nesse método de decomposição muitos elementos de interesse são convertidos em cátions inorgânicos simples não voláteis, que permanecem no meio ácido, propiciando a determinação de elementos em baixas concentrações (KRUG, 2010).

A garantia de uma boa decomposição dependerá dos componentes presentes na amostra, sendo esse conhecimento de fundamental importância, pois é através dessa informação que são escolhidos, por exemplo, o ácido a ser utilizado, se sozinho ou na forma de misturas, temperatura e tempo de decomposição. Amostras ricas em carboidratos são facilmente decompostas com HNO_3 a 120 °C, enquanto que as ricas em gorduras, proteínas e aminoácidos necessitam de temperaturas em torno de 300 °C. O HNO_3 possui ponto de ebulição (PE) de 120 °C e acima dessa temperatura seu potencial de oxidação é relativamente baixo. Com isso, são sugeridos o uso de misturas de ácidos para uma decomposição eficiente, como a mistura de HNO_3 e o H_2SO_4 (PE 339 °C) e/ou H_2O_2 , em amostras que possuem esses constituintes (KRUG, 2010; KORN, 2008). O uso de H_2SO_4 é de grande relevância na oxidação, pois o ácido concentrado a quente é capaz de destruir parcial ou mesmo totalmente compostos orgânicos (KRUG, 2010).

Estudos sobre decomposições utilizando misturas variadas entre HNO_3 , H_2SO_4 e H_2O_2 em leite são encontrados na literatura. Santos e colaboradores (2005) determinaram, por ICP OES, Ba, Ca, Cu, K, Mg, Na, P e Zn em amostras de leite, integral e desnatado, após decomposição em HNO_3 e em mistura de HNO_3 e H_2SO_4 . Os autores afirmam um aumento na eficiência ao utilizar a mistura dos ácidos. Oreste e colaboradores (2015) determinaram Ca, Cu, Fe, K e Na em amostras de leite em pó por ICP OES. A amostra foi decomposta utilizando mistura de HNO_3 e H_2SO_4 , em sistema de refluxo, HNO_3 e H_2O_2 em forno micro-ondas e HNO_3 em sistema aberto com bloco digestor. O uso da primeira mistura apresentou recuperações entre 91 e 95 %, mostrando boa exatidão e o teor de carbono orgânico residual em 6 %, sendo este concordante com o procedimento realizado em micro-ondas.

2.5.1.1. Decomposição ácida em sistema aberto

A decomposição em sistema aberto (à pressão atmosférica) é o método mais antigo, sendo utilizado para a decomposição da matéria orgânica e inorgânica, sob aquecimento em chapa ou bloco digestor. O método permite a análise de um grande número de amostras, empregando um sistema simples e de baixo custo (KRUG, 2010). No entanto, o método está suscetível a erros sistemáticos em virtude da possibilidade de perdas ou contaminação. Apresenta algumas limitações relacionadas à eficiência de decomposição, aos níveis dos brancos e, ainda, com a concentração de ácido remanescente nos digeridos (VASSILEVA, 2001). Demirel e colaboradores (2008) prepararam amostras de fígado bovino em sistema aberto em chapa de aquecimento utilizando HNO_3 para posterior determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS e Al e Se por GF AAS. A decomposição apresentou boa recuperação, entre 92 e 96 %, com exceção de Se, possivelmente devido a perdas. Ferreira e colaboradores (2005) desenvolveram um procedimento utilizando a mistura de HNO_3 e HClO_4 , com aquecimento em chapa, para determinar Cu em amostras de origem animal e vegetal por F AAS. Kira e colaboradores (2007) prepararam amostras de queijos (mussarela, minas, prato e parmesão) em chapa aquecedora com HCl afim de determinar Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn por ICP OES. Os resultados

foram comparados estatisticamente com os obtidos após a decomposição por via seca.

2.5.1.2. Decomposição ácida por radiação de micro-ondas

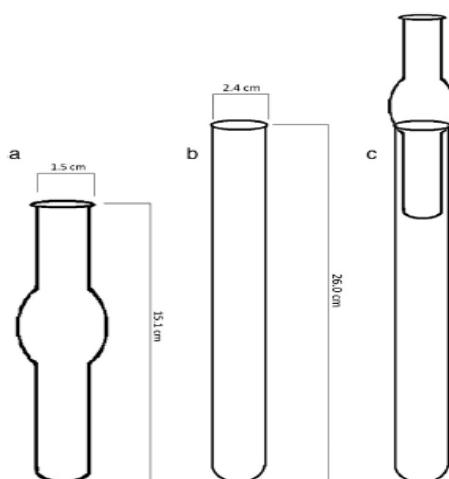
O uso de micro-ondas para decomposição de amostras data de 1975, com emprego inicial de fornos de micro-ondas doméstico. Embora esses fornos não fossem apropriados para este tipo de trabalho, possuíam a vantagem de um gasto menor de tempo, ao comparar com os procedimentos convencionais em sistema aberto com chapa ou bloco digestor (KORN, 2008). De La Fuente e colaboradores (1995) preparam amostras de leite desnatado, semi-desnatado e integral em forno micro-ondas convencional para posterior determinação de Ca, Mg, K e Na pelas técnicas FAAS e FAES, respectivamente. As recuperações foram para Ca, 99,3 %, Mg, 100,0 %, K, 100,3 % e Na, 100,5 %, mostrando boa exatidão. Recentemente, Oliz e colaboradores (2013) utilizaram um micro-ondas convencional no preparo de amostras em microescala para determinação de K, Mg, Na e Zn em carnes por F AAS e F AES. Os resultados obtidos foram concordantes com o material de referência certificado.

A decomposição ácida assistida por micro-ondas se baseia no aquecimento da amostra pela energia das micro-ondas, sendo estas ondas eletromagnéticas com frequência entre 300 e 300.000 MHz. A radiação na faixa das micro-ondas possui energia não ionizante que causa a movimentação de íons e a rotação de dipolos, mas não afeta a estrutura molecular, o que não significa que não ocorram outros efeitos ou interações desta radiação com a matéria (KINGSTON, 1988; KRUG, 2010). A técnica possui como vantagens, além da redução no tempo, o aumento na velocidade das reações como resultado das altas temperaturas e pressões, e o uso de frascos fechados que torna o tratamento da amostra menos susceptível a contaminações pelo ambiente, evitando perdas de elementos voláteis, bem como proporcionam total segurança ao analista. Atualmente, a mineralização ácida assistida por micro-ondas é uma técnica bem estabelecida, usada para diversos tipos de amostras (PAES, 2007). Gaze e colaboradores (2015) utilizaram a radiação micro-ondas na determinação de Na, Ca, K e P em amostras de doce de leite por ICP OES.

Os resultados obtidos foram concordantes com material de referência certificado, mostrando a eficiência do preparo.

2.5.1.3. Decomposição ácida com sistema de refluxo

Os primeiros métodos de preparo de amostras em sistema de refluxo foram com condensadores convencionais. O sistema mostrou eficiência ao preparar amostras com espécies voláteis, mas o mesmo não foi prático ao preparar grandes números de amostras. Com base na ideia e nas vantagens do uso do sistema de refluxo para análise de voláteis, Ferreira e colaboradores (2013) utilizaram um método de preparo de amostras chamado de "sistema de dedo frio", como mostra a Figura 2. Esse sistema decompõe a amostra sem que ocorra perda por volatilização. Isso ocorre devido à condensação dos vapores das espécies voláteis, ao atingir a superfície fria do dedo. Este método mostra-se vantajoso pois a massa de amostra e o volume de reagente não são parâmetros críticos, o risco de explosão é mínimo, e há possibilidade do uso de vários tipos de amostras, incluindo matrizes orgânicas e inorgânicas.



a: dedo frio; b: tubo digestor; c: dedo frio acoplado ao tubo digestor.

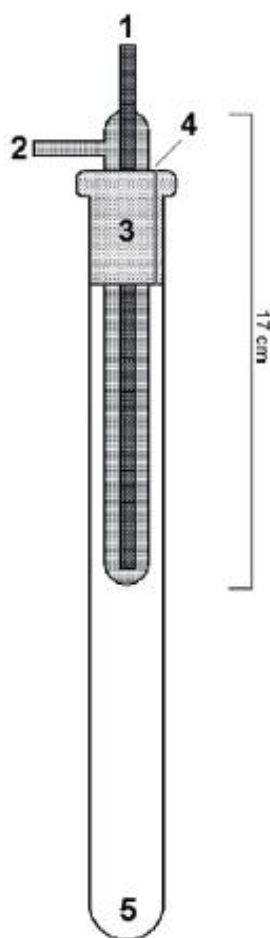
Figura 2. Modelo esquemático do sistema de dedo frio adaptado por Ferreira e colaboradores (2013).

O sistema de "dedo frio" consiste em acoplar um tubo de vidro com água, em um tubo digestor, que irá conter a amostra e os ácidos. O conjunto é colocado em um bloco digestor com aquecimento. O "dedo frio" é acoplado de forma a

arrefecer a parte superior do tubo digestor, causando refluxo e condensação de espécies voláteis, o que evita a perda desses elementos por evaporação.

Os ácidos usados na decomposição também são condensados, não sendo necessária a reposição deles no decorrer da decomposição, o que diminui o consumo dos mesmos e os riscos de contaminação (Ferreira, 2013). O sistema foi utilizado em vários trabalhos e aplicado na decomposição de diversas amostras para a determinação de elementos por diferentes técnicas, como Nano e colaboradores (2009) ao decompor amostras de ostras afim de determinar As, Cd, Ba, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn por ICP OES; Ferreira e colaboradores (2009) decompôs vinho e determinou Cd por ET AAS; Macedo e colaboradores (2009) preparou amostra de fertilizante para determinar As por HG AAS. Os trabalhos que utilizaram o sistema de dedo frio obtiveram bons resultados, seja na determinação de elementos com características voláteis, seja no retorno do ácido ao meio reacional, evitando a secura. No entanto, foram observados inconvenientes como o alto teor de ácido residual, além do aquecimento da água de resfriamento durante o período da decomposição, com consequente diminuição da eficiência de condensação no dedo frio (FERREIRA, 2013; ORESTE, 2013).

Com base nesse sistema, Oreste e colaboradores (2013) propuseram a introdução de uma tampa de teflon para encaixe do dedo frio no tudo digestor, com uma ranhura lateral para alívio de pressão, formando um sistema semi-fechado. Foi também implantada a recirculação de água em tal sistema. A água recirculada é mantida a 15 °C por um banho termostatizado. A Figura 3 mostra o esquema do sistema proposto pelos autores. Com esse sistema o autor determinou Hg em amostra biológica por CV AAS. O material de referência certificado (MRC) foi analisado comprovando assim a exatidão e precisão do método proposto.



1: entrada de água; 2: saída de água; 3: tampa de teflon; 4: ranhura lateral (alívio de pressão); 5: tubo digestor

Figura 3. Esquema do sistema de dedo frio acoplado ao tubo digestor confeccionado por Orestes e colaboradores (2013).

Após a confecção desse sistema, muitos outros trabalhos foram publicados pelo grupo de pesquisa, como o de Pinheiro e colaboradores (2014) que avaliaram a aplicação do sistema de refluxo com dedo frio, ao comparar com o sistema convencional em bloco digestor em sistema aberto, no preparo de amostras de arroz, para posterior determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS. Nesse trabalho o ácido utilizado na decomposição foi o HNO_3 . O uso do sistema de refluxo permitiu trabalhar em temperaturas de $210\text{ }^\circ\text{C}$, acima do PE do HNO_3 . Os resultados dos diferentes procedimentos de preparo das amostras não mostraram diferença significativa a 95 % de confiança. Souza e colaboradores (2015) desenvolveram um método para determinar Cd e Pb por GF AAS em

amostras de goma xantana, previamente preparadas utilizando a decomposição com HNO_3 com sistema de refluxo. A exatidão foi verificada com testes de adição, obtendo recuperações entre 83 e 100 %. Oreste e colaboradores (2015) compararam três métodos de tratamentos de amostra de leite em pó, o sistema de refluxo no qual utilizou a mistura de HNO_3 e H_2SO_4 com temperatura de 350 °C; a decomposição convencional com HNO_3 em sistema aberto e temperatura de 120 °C e o terceiro foi o uso de micro-ondas em que empregou HNO_3 e H_2O_2 com temperatura de 80 °C. Ao final foram determinados Ca, Cu, Fe, K, e Na por ICP OES. Os resultados mostraram que o uso do sistema de refluxo apresentou-se vantajoso quando comparado aos demais sistemas, apresentando recuperações entre 91 e 95 %, mostrando boa exatidão ao comparar os métodos, não havendo diferença significativa a 95 % de confiança.

2.5.2. Decomposição por via seca em forno mufla

A decomposição por via seca é o método mais simples utilizado para a decomposição de amostras biológicas e orgânicas. Consiste na eliminação da matéria orgânica por decomposição térmica e oxidação, com oxigênio do ar, usando um forno mufla. Os resíduos inorgânicos formados, em forma de cinzas, são solubilizados com ácidos apropriados os quais dependerão da técnica analítica a ser utilizada (KORN, 2008; KRUG, 2010, IAL, 2008). A temperatura é um parâmetro importante nesse método, pois é ela que irá garantir a completa decomposição da amostra sem perda de elementos por volatilização ou incorporação com resíduos insolúveis (KIRA, 2002). Na literatura encontram-se trabalhos que discutem a aplicação de diferentes temperaturas na decomposição de amostras. Amaro-López e colaboradores (1996) relatam que a temperatura comumente empregada em decomposição por via seca fica em torno de 450 °C a 500 °C, sendo que acima desta temperatura começavam a ocorrer perdas de elementos traço em amostras de leite e derivados.

O grau de perdas por volatilização é o fator limitante do método, sendo o tempo de decomposição e a propensão a contaminações outros inconvenientes (SPELLMER, 2011). Em vista dos problemas de perdas por volatilização o método é aplicável somente para elementos metálicos, visto que a maioria dos não metais é oxidada a produtos voláteis (KRUG, 2010). No entanto, o método

possui vantagens como a simplicidade, ampla aplicação, capacidade de manipular grandes quantidades de amostra, utilização de instrumentação geralmente disponível em laboratórios e possibilidade do tratamento de várias amostras ao mesmo tempo sem requerer a presença contínua do operador. Além disso, as cinzas resultantes são livres de matéria orgânica, o que é pré-requisito para algumas técnicas analíticas sensíveis como ICP MS e ICP OES, cujas determinações podem ser afetadas pela presença de matéria orgânica (KORN, 2008). É devido a essas vantagens que o uso da decomposição em forno mufla continua em grande uso, sendo o método de referência utilizado na determinação de elementos em uma variedade de matriz.

Na literatura são encontrados trabalhos que apresentam as vantagens e as desvantagens obtidas ao utilizar a decomposição por via seca. Kira e colaboradores (2002) determinaram Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn em amostras de queijos mussarela, minas, prato e parmesão por ICP OES. As amostras foram preparadas por decomposição via seca em mufla e por dissolução parcial com HCl em chapa aquecedora. Para a realização do primeiro procedimento foram gastas 24 h, enquanto que para o segundo foi necessário um tempo de 2 h. Os resultados mostraram diferença significativa na determinação de Cr, Cu e P para o queijo mussarela, Mn para o queijo minas e Cu para o queijo prato. Esse fato foi atribuído a incompleta eliminação da matéria orgânica pela dissolução parcial com HCl, ressaltando a vantagem da completa decomposição da matéria orgânica pela decomposição por via seca. Tüzen e colaboradores (2007) preparam amostras de mel por decomposição via seca e via úmida, em sistema aberto e fechado assistido por micro-ondas. Os elementos Al, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn foram determinados por F AAS e GF AAS. Os resultados mostraram diferenças significativas em relação a decomposição por via seca e os demais métodos, sendo a decomposição assistida por micro-ondas a que apresentou maiores recuperações dos elementos. Sousa e colaboradores (2015) determinaram Fe e Zn em amostras de queijo *Petit Suisse* por FAAS após decomposição da amostra por via seca em mufla e por via úmida com HNO₃ em chapa aquecedora. Os resultados não mostraram diferenças significativas, o que evidenciou a eficiência do método proposto para o objetivo da análise.

2.5.3. Solubilização alcalina com TMAH

O hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), com fórmula molecular $(CH_3)_4NOH$, apresenta-se na forma de uma solução alcalina com pH entre 13,4 e 14,7. O reagente é encontrado comercialmente disponível na concentração de 25 e 10 % (m/v) em solução aquosa e 25 % (m/v) em metanol, sendo a pureza dependente do fabricante. É uma base orgânica forte solúvel em água ou álcoois, capaz de se complexar e estabilizar os elementos voláteis. A solução formada é incolor com odor de amina (NOBREGA, 2006).

O tratamento da amostra por solubilização com TMAH é simples, rápido, requer pequenas quantidades do reagente e geralmente não necessita aquecimento. A solubilização, completa ou não, irá depender do tipo de amostra (NOBREGA, 2006). O reagente promove a clivagem de proteínas em fragmentos menores, facilitando a dissolução da amostra (SPELLMER, 2011). O TMAH é capaz de dissociar espécies químicas e de complexar efetivamente com elementos metálicos. Com isso, ele tem se mostrado adequado para o tratamento de amostras biológicas, como alternativa aos procedimentos de decomposição convencional, e posterior determinação de íons metálicos por técnicas de espectrometria atômica (NOBREGA, 2006). Muitos estudos foram e estão sendo desenvolvidos com base nas diferentes formas de uso do TMAH. Em uma revisão a esse respeito, Nobrega e colaboradores (2006) relatam que em grande parte dos trabalhos, o uso de TMAH proporcionou satisfatória precisão, exatidão e bom desempenho instrumental.

Como método alternativo à decomposição ácida, Silva e colaboradores (1999) prepararam amostras biológicas de origem marinha utilizando o TMAH na solubilização das amostras para posterior determinação de Cu, Cd, Ni, Pb e Cr por GF AAS. Diversas formas de solubilização foram avaliadas, em temperatura ambiente, com aquecimento e uso de agitação ultrassônica. Como resultado, as concentrações dos elementos foram concordantes ao comparar com material de referência certificado. Os autores relataram também a possibilidade de armazenar a solução preparada por até três anos.

Ribeiro e colaboradores (2003) mostraram como a solubilização com TMAH de amostras de leite e café em pó, para determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sn e Zn pela técnica ICP OES, foi uma metodologia

reprodutível, sendo o procedimento comparado com a decomposição ácida em micro-ondas e a exatidão confirmada com os resultados obtidos para o material de referência certificado.

Nobrega e colaboradores (1997) determinaram minerais majoritários (Ca, K, Mg, Na e P) e traços (Al, Ba, Cu, I, Mn, Mo, Pb, Rb, Se, Sr e Zn) pelas técnicas ICP OES e ICP MS, respectivamente, em amostras de leite em pó desnatado e integral, após solubilização das mesmas em TMAH. Martin-Hernández e colaboradores (1988) e Juárez e colaboradores (1992) utilizaram TMAH na solubilização de queijos. O primeiro autor obteve recuperações entre 87 e 106 % e o segundo entre 91 e 103 %. Mostraram assim o vantajoso uso do reagente alcalino na solubilização de amostras biológicas que possuem alto teor de gordura.

3. Parte Experimental

3.1. Instrumentos e parâmetros instrumentais

As análises foram feitas utilizando um espectrômetro de absorção/emissão atômica (F AAS/AES) modelo AAnalyst 200 (Perkin Elmer, Connecticut, EUA) com chama composta por ar comprimido com vazão de 10 L min⁻¹ e gás acetileno 99, 7% (Linde, São Paulo, Brasil) em uma vazão de 2,5 L min⁻¹. O equipamento operou em modo emissão para a determinação de Na e K e em modo absorção para a determinação de Ca e Mg, que requerem o uso de lâmpada de cátodo oco (Perkin Elmer, Singapura). Corretor de fundo com lâmpada de arco de deutério foi utilizado na determinação de Mg.

A título de comparação, ao aplicar os procedimentos desenvolvidos, além do F AAS/AES, foi utilizado um espectrômetro de emissão atômica com plasma excitado por micro-ondas (MP AES) modelo Agilent 4200 (Agilent Technologies, Melbourne, Austrália) equipado com uma câmara de pulverização ciclônica de vidro de dupla passagem (Agilent Technologies, Melbourne, Austrália). O nitrogênio utilizado é extraído do ar atmosférico usando um gerador de nitrogênio (4107 Nitrogen Generator - Agilent Technologies, Melbourne, Austrália). O alinhamento da tocha e a seleção da melhor linha espectral foram realizadas utilizando uma solução de calibração para cada meio (HNO₃/H₂SO₄ e TMAH) e otimizados automaticamente pelo instrumento com o MP Expert Software (versão 1.5.1.0, Agilent Technologies, Melbourne, Austrália).

Os parâmetros instrumentais utilizados nas determinações dos elementos são mostrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Parâmetros operacionais para determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de requeijão por F AAS/AES

Parâmetros	Elementos			
	Na	K	Ca	Mg
Comprimento de onda (nm)	589,00	766,49	422,67	285,21
Corrente da lâmpada (mA)	-	-	10	8
Fenda espectral (nm)	1,8	2,7	2,7	2,7

Tabela 2. Parâmetros operacionais para determinação de Na, K, Ca e Mg em amostras de requeijão por MP AES

Parâmetros	Elementos			
	Na	K	Ca	Mg
Comprimento de onda (nm)	588,995	766,491	393,366	285,995
Posição de observação	0	10	10	0
Fluxo do nebulizador (L/min)	1	1	0,65	0,8
Tempo de leitura (s)			3	
Número de replicatas			3	
Tempo de captação da amostra (s)			15	
Tempo de estabilização (s)			15	
Velocidade da bomba (rpm)			15	
Nebulizador	Ciclônico de vidro de dupla passagem			
Acionamento rápido da bomba			ligado	
Corretor de fundo			Auto	
Introdução de amostra			Manual	

As amostras foram pesadas em uma balança analítica modelo AR 2140 (Ohaus Adventurer, Nova Jersey, EUA.) com resolução de 0,1 mg e tara máxima de 210 g. A umidade foi determinada em uma estufa modelo 1.2 (Odontobras, São Paulo, Brasil). Para o preparo das amostras por decomposição em meio ácido com sistema de refluxo foi utilizado um bloco digestor modelo MA-4025 (Marconi, São Paulo, Brasil). Em cada tubo de decomposição foi introduzido um segundo tubo com sistema de refluxo (dedo frio) a fim de possibilitar a circulação de água, sendo a temperatura da mesma controlada em 15 °C por um banho termostático modelo Q-214M2 (Quimis, São Paulo, Brasil). Na decomposição por via seca (metodologia de referência) foi utilizado um forno mufla modelo Q-318.24 (Quimis, São Paulo, Brasil) e as cinzas finais foram solubilizadas em uma chapa aquecedora modelo 752A (Fisatom, São Paulo, Brasil).

3.2. Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados foram de grau analítico: ácido nítrico 65% (m/m) (Synth, São Paulo, Brasil), ácido sulfúrico 98% (m/m) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ácido clorídrico 36,5% (m/m) (Synth, São Paulo, Brasil) e hidróxido de tetrametilamônio 25%(m/v) em água (Sigma Aldrich, Seelze, Alemanha). As amostras e padrões foram preparados com água deionizada obtida por meio de um sistema de purificação com resina de troca iônica. O ácido nítrico foi duas vezes purificado em sistema de sub-ebulição de quartzo modelo MA-075 (Marconi, São Paulo, Brasil). As vidrarias e recipientes plásticos foram lavados e imersos em banho de ácido nítrico 10% (v/v) por 48 horas, após foram enxaguados com água deionizada e secos.

As soluções padrão dos elementos analisados foram diluídas com água deionizada a partir de soluções estoque (Fluka, Buchs, Germany) contendo 10000 mg L⁻¹ de Na, K e Mg e 1000 mg L⁻¹ de Ca. As curvas de calibração foram construídas a partir desses padrões em concentrações que variaram entre 0,25 e 1,5 mg L⁻¹ para Na e K, 1 e 4 mg L⁻¹ para Ca e 0,1 e 0,4 mg L⁻¹ para Mg, sendo o meio o mesmo das amostras.

3.3. Amostras

As amostras utilizadas durante o trabalho foram: requeijão tipo cheddar marca A (amostra 1), requeijão tradicional marca A e B (amostra 2 e amostra 3), requeijão *light* (teor reduzido de gordura) marca A e B (amostra 4 e amostra 5) e requeijão *light* (teor reduzido de gordura e sódio) marca B (amostra 6), totalizando 6 amostras, todas adquiridas no comércio da cidade de Pelotas-RS. As mesmas foram mantidas sob congelamento (-18 °C) durante todo o período da pesquisa e submetidas a uma etapa de homogeneização prévia as análises.

3.4. Preparo das amostras

O teor de umidade das seis amostras foi determinado com o objetivo de definir a amostra com maior quantidade de massa seca (menor teor de umidade) para desenvolvimento dos procedimentos. Para essa determinação foram

pesados aproximadamente 2 g de amostra em cadinhos de porcelana previamente tarados. O conjunto foi levado à estufa por 3 h a 105 °C. Após o resfriamento, em dessecador até temperatura ambiente, os cadinhos foram pesados. A operação foi repetida 3 vezes, até obtenção de peso constante (AOAC, 1995; IAL, 2008).

3.4.1. Planejamento fatorial DCCR – Otimização dos procedimentos

O planejamento experimental é uma ferramenta utilizada para minimizar o número de experimentos e otimizar os processos, tendo como base a análise estatística. Quando o interesse é investigar o efeito provocado nas respostas dos experimentos por duas ou mais variáveis, cada uma delas com dois ou mais níveis, é recomendado o uso de técnicas clássicas de planejamento, como por exemplo, a técnicas de planejamento fatorial completo. Essa técnica pode ser utilizada na avaliação da eficiência da decomposição de amostras com alto teor de gordura e proteínas, através do estudo de variáveis como, massa da amostra, volume de reagente, temperatura e tempo de decomposição (MOURA, 2008).

O planejamento fatorial tem sido muito aplicado e é classificado como um método do tipo simultâneo, cujo as variáveis de interesse que apresentam influências significativas nas respostas são avaliadas ao mesmo tempo. Afim de avaliar a influência das variáveis sobre a determinação dos sinais de emissão para Na e K e absorvância para Ca e Mg, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) com metodologia de superfície de resposta (MSR) para a decomposição ácida com sistema de refluxo (procedimentos 1) e solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (procedimento 2). Essa influência foi avaliada através do programa Statistica versão 8.0 para Windows (Tulsa, OK, USA). As variáveis independentes para o procedimento 1 foram massa da amostra, volume de H₂SO₄, temperatura do bloco digestor e tempo de decomposição, totalizando 27 ensaios (2⁴ com 3 pontos centrais e 8 pontos axiais) e para o procedimento 2, massa de amostra e volume de TMAH, totalizando 11 ensaios (2² com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais). Os ensaios foram realizados em triplicata. As Tabelas 3 e 4 apresentam as combinações obtidas para os dois procedimentos e as respostas dos sinais de emissão e absorvância para os quatro elementos por F AES (Na e K) e F AAS (Ca e Mg).

Tabela 3. Matriz DCCR para determinação de Na e K por F AES e Ca e Mg por F AAS na amostra 1 após decomposição ácida com sistema de refluxo

Ensaio	Variáveis				Sinais			
	Massa amostra (mg)	Volume de H ₂ SO ₄ (mL)	Temperatura bloco digestor (°C)	Tempo de decomposição (h)	Emissão		Absorvância	
					Na	K	Ca	Mg
1	625	1,5	295	1,5	2071667	165175	0,579	1,108
2	875	1,5	295	1,5	2626467	233590	0,710	1,282
3	625	2,5	295	1,5	2097800	164985	0,645	1,047
4	875	2,5	295	1,5	2725867	234060	0,692	1,263
5	625	1,5	295	2,5	2070067	169275	0,721	1,083
6	875	1,5	295	2,5	2607333	235405	0,699	1,271
7	625	2,5	295	2,5	2068867	166415	0,629	1,067
8	875	2,5	295	2,5	2549067	230155	0,693	1,269
9	625	1,5	325	1,5	2055133	173995	0,638	1,069
10	875	1,5	325	1,5	2595667	240030	0,678	1,286
11	625	2,5	325	1,5	1893800	172175	0,648	1,076
12	875	2,5	325	1,5	2350000	235395	0,689	1,275
13	625	1,5	325	2,5	2043533	170880	0,727	1,094
14	875	1,5	325	2,5	2515733	236395	0,708	1,307
15	625	2,5	325	2,5	2025733	175680	0,632	1,060
16	875	2,5	325	2,5	2612067	236945	0,702	1,282
17	500	2,0	310	2,0	1624133	132710	0,591	0,954
18	1000	2,0	310	2,0	3043533	262250	0,756	1,357
19	750	1,0	310	2,0	2295200	194975	0,687	1,208
20	750	3,0	310	2,0	2715000	208520	0,658	1,222
21	750	2,0	310	1,0	2440800	203325	0,611	1,191
22	750	2,0	310	3,0	2304800	197077	0,766	1,224
23	750	2,0	280	2,0	2173133	203085	0,609	1,171
24	750	2,0	340	2,0	2090933	207760	0,792	1,187
25	750	2,0	310	2,0	2403200	211215	0,654	1,211
26	750	2,0	310	2,0	2389300	203895	0,659	1,211
27	750	2,0	310	2,0	2342000	200145	0,613	1,206

Tabela 4. Matriz DCCR para determinação de Na e K por F AES e Ca e Mg por F AAS na amostra 1 após solubilização em TMAH

Ensaio	Variáveis		Sinais			
	Massa (mg)	Volume de TMAH (µL)	Na	K	Ca	Mg
			Emissão		Absorvância	
1	85	160	291909,667	455442,000	0,160	0,196
2	265	160	457286,667	830612,000	0,368	0,360
3	85	440	304107,333	459740,667	0,131	0,190
4	265	440	470893,000	859429,000	0,314	0,353
5	50	300	245049,333	359873,667	0,100	0,162
6	300	300	488353,000	8989913,667	0,337	0,369
7	175	100	404649,000	702303,333	0,247	0,283
8	175	500	407580,000	697333,667	0,212	0,281
9	175	300	406746,667	703159,333	0,212	0,270
10	175	300	405201,333	677741,334	0,193	0,257
11	175	300	407749,000	689217,333	0,191	0,259

As Tabelas 5 e 6 apresentam as variáveis e os níveis utilizados nos planejamentos fatoriais. Os ensaios foram realizados em triplicata. Testes preliminares, bem como o levantamento bibliográfico, foram fundamentais para a seleção das variáveis investigadas.

Tabela 5. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial para decomposição ácida com sistema de refluxo da amostra 1

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	1	2
Massa (mg)	500	625	750	875	1000
Volume H ₂ SO ₄ (mL)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Temperatura bloco (°C)	280	295	310	325	340
Tempo digestão (h)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0

Tabela 6. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial para solubilização da amostra 1 em TMAH

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Massa (mg)	50	85	175	265	300
Volume TMAH (µL)	100	160	300	440	500

3.4.1.1. Decomposição ácida com sistema de refluxo – Procedimento 1

A massa de amostra (500 a 1000 mg), o volume de H_2SO_4 (1 a 3 mL), a temperatura do bloco digestor (280 a 340 °C) e o tempo de digestão (1 a 3 h) foram avaliados com o objetivo de alcançar as condições ideais para as quatro variáveis, que forneçam os maiores sinais de emissão na determinação de Na e K por F AES e absorvância para Ca e Mg por F AAS. Os ensaios foram realizados de acordo com as combinações fornecidas pelo DCCR, como mostrado na Tabela 3. A amostra foi pesada diretamente em tubos de digestão, em seguida foram adicionados os volumes de HNO_3 (fixo em 5 mL) e de H_2SO_4 . O sistema de refluxo foi acoplado aos tubos de digestão, que foram aquecidos em um bloco digestor com temperatura e tempo estabelecidos de acordo com o planejamento estatístico. Após o resfriamento, as amostras decompostas foram transferidas para frascos de polipropileno e avolumados a 50 mL com água deionizada.

3.4.1.2. Solubilização alcalina com TMAH – Procedimento 2

A solubilização em meio alcalino foi realizada com TMAH 25 % (m/v) em água. Foram avaliados a massa de amostra (50 a 300 mg) e o volume de TMAH (100 a 500 μL) com o objetivo de alcançar as condições ideais para as duas variáveis, que forneçam os maiores sinais de emissão na determinação de Na e K por F AES e absorvância para Ca e Mg por F AAS. As amostras foram pesadas diretamente em frascos de polipropileno, seguidas da adição do TMAH. O conjunto permaneceu em repouso *over-night* (aproximadamente 12 horas) a temperatura ambiente. Após, os frascos foram avolumados a 50 mL com água deionizada.

3.4.2. Decomposição ácida por via seca (método de referência) – Procedimento 3

O procedimento utilizado foi o descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Nesse, foram pesados aproximadamente 2 gramas de amostra em cadinhos de porcelana e levados a estufa a 150 °C até secar. Em seguida os cadinhos foram levados a mufla com aquecimento gradual até 500 °C,

permanecendo nessa temperatura por 4 horas. Ao resfriar, as cinzas foram umedecidas com 1 mL de HNO_3 concentrado e o conjunto foi levado a chapa aquecedora até secura. Após, os cadinhos retornaram a mufla por mais 4 horas. Foram obtidas cinzas claras, o que representa a completa carbonização da matéria orgânica. Em seguida as cinzas foram dissolvidas em 5,8 mL de HCl concentrado, transferidas para frascos de polipropileno de 50 mL e avolumados a 25 mL, de modo que ao final a concentração do ácido seja de 10%.

3.4.3. Aplicação das condições otimizadas

Após a otimização das condições, os dois procedimentos de preparo de amostras foram aplicados a cinco amostras de requeijão: amostra 2, amostra 3, amostra 4, amostra 5 e amostra 6. As concentrações foram determinadas através das técnicas F AES (Na e K) e F AAS (Ca e Mg). As concentrações também foram determinadas por MP AES a fim de comparar os resultados obtidos e mostrar a viabilidade dos procedimentos propostos frente a diferentes técnicas de análise.

4. Resultados e discussões

4.1. Planejamento fatorial DCCR – otimização dos procedimentos 1 e 2

As porcentagens média de umidade encontradas para as 6 amostras foram, 65,0 % para a amostra 1, 67,0 % para as amostras 2 e 4, 75,0 % para as amostras 3 e 5 e 70 % para amostra 6.

A amostra 1 foi a que apresentou a maior quantidade de massa seca, além de possuir os maiores teores de gordura e proteínas, informações estas obtidas pelo rótulo do produto. Por se tratar da matriz mais complexa esta amostra foi escolhida para o desenvolvimento dos procedimentos propostos. Todas as determinações para o estudo das variáveis foram realizadas por F AES (Na e K) e F AAS (Ca e Mg).

4.1.1. Decomposição ácida com sistema de refluxo – Procedimento 1

Os resultados obtidos pelo DCCR (Tab. 3) mostraram, através de diagramas de Pareto (Fig. 4), quais foram as variáveis significativas na determinação dos sinais de Na, K, Ca e Mg ao nível de 95 % de confiança, onde o efeito é tão significativo quanto mais à direita da linha $p=0,05$ ele estiver, além de mostrar os efeitos das interações das variáveis duas a duas. A Figura 4 mostra os diagramas obtidos para os quatro elementos no procedimento 1. Observa-se que as variáveis massa e temperatura são as variáveis significativas, ou seja, as que interferem significativamente na determinação de Na (Fig. 4A), K (Fig. 4B) e Mg (Fig. 4D), enquanto na determinação de Ca (Fig. 4C) as variáveis interferentes são massa e tempo.

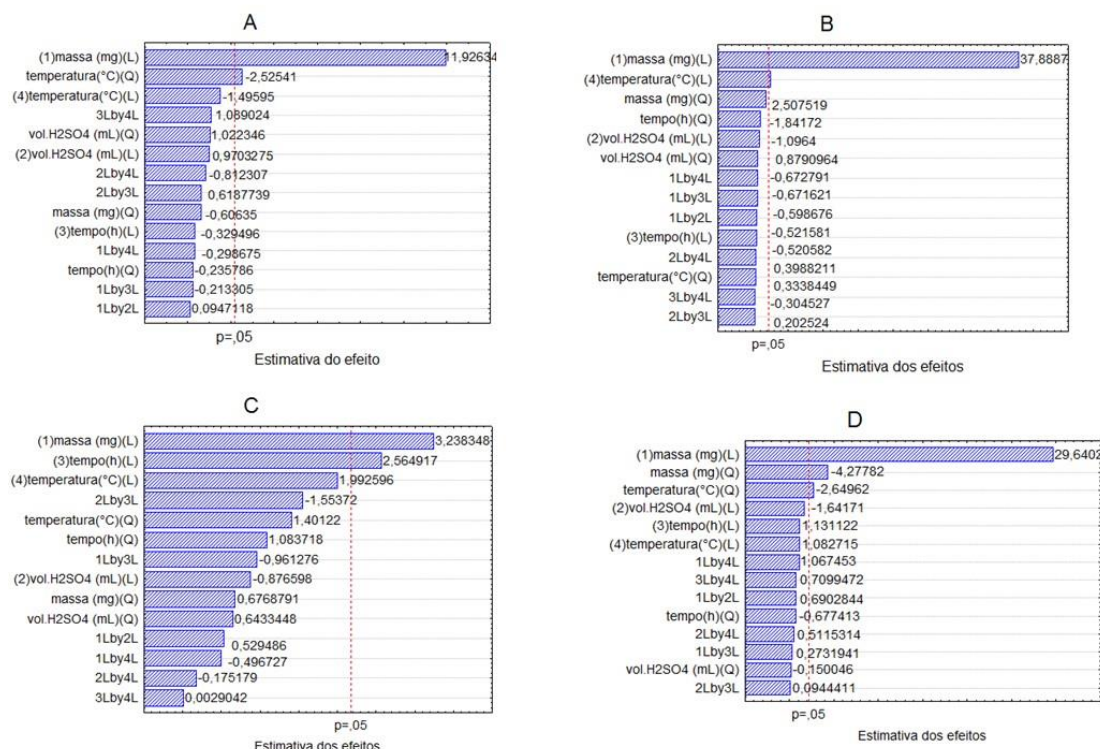


Figura 4. Diagrama de Pareto para a decomposição ácida com sistema de refluxo na determinação de Na (A), K (B) e Ca (C) e Mg (D).

As análises de variância (ANOVA) foram feitas considerando apenas os termos significativos. Os valores de F calculado para Na, K, Ca e Mg, apresentados na Tabela 7, mostram que os modelos foram significativos e adequados para descrever os resultados por meio de superfícies de resposta. Os gráficos de superfícies de resposta estão apresentados na Figura 5.

Tabela 7. Análise de variância para a superfície de resposta do modelo quadrático para a determinação de Na, K, Ca e Mg em requeijão por F AES/AAS após decomposição ácida

Elemento	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médio	F calculado	F tabelado	R ²
Na	Regressão	2,218x10 ¹²	2	2,992x10 ¹⁰	90,93	3,40	0,883
	Resíduos	2,927x10 ¹¹	24	3,295x10 ⁷			
	Total	2,511x10 ¹²	26				
K	Regressão	2,562x10 ¹⁰	2	1,281x10 ¹⁰	888,45	3,40	0,987
	Resíduos	3,460x10 ⁸	24	1,442x10 ⁷			
	Total	2,597x10 ¹⁰	26				
Ca	Regressão	0,0316	2	0,0158	8,891	3,40	0,426
	Resíduos	0,043	24	1,778x10 ⁻³			
	Total	0,074	26				
Mg	Regressão	0,254	3	0,085	8,891	3,03	0,978
	Resíduos	5,655x10 ⁻³	23	2,459x10 ⁻⁴			
	Total	0,259	26				

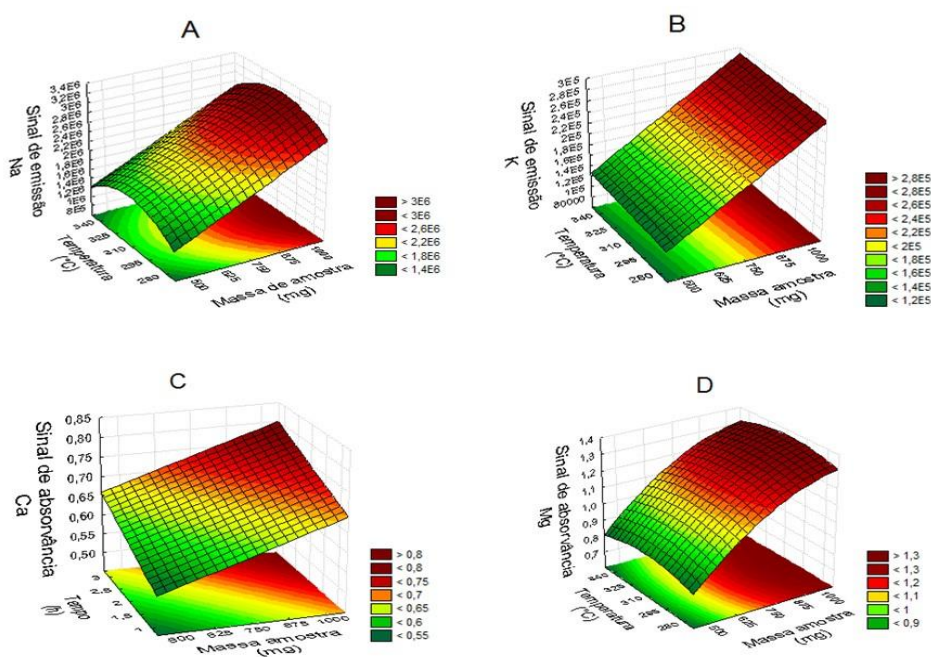


Figura 5. Superfícies de respostas para decomposição ácida com sistema de refluxo na determinação de Na (A), K (B), Ca (C) e Mg (D) em função da massa, temperatura e tempo

A Figura 5 mostra, através das superfícies de resposta, a influência das variáveis duas a duas, na determinação dos sinais dos quatro elementos após a decomposição ácida. A superfície da Figura 5A mostra que, os maiores sinais para o Na foram obtidos quando foi utilizada a massa no intervalo de 625 a 875 mg. Para os demais elementos, as maiores massas forneceram os maiores sinais. A decomposição ácida com sistema de refluxo não foi eficiente quando foram utilizadas massas menores (abaixo de 625 mg). As massas maiores na faixa estudada permitiram a determinação de todos os elementos avaliados com boa precisão e exatidão. Por esse motivo foi escolhida a massa de 875 mg de amostra, garantindo a eficiente decomposição e determinação dos elementos estudados.

Para a variável temperatura, as superfícies da Figura 5A e 5D mostram que os maiores sinais de Na e Mg, respectivamente, estão compreendidos entre 295 e 325 °C, no entanto, para o K (Fig. 5B) a maior temperatura resulta em maiores sinais. A decomposição ácida de amostras que possuem gordura e proteína como constituintes principais, necessitam de temperaturas em torno de 300 °C (WÜRFLES, 1988), o que possibilita maior eficiência no rompimento das ligações carbono-carbono de moléculas orgânicas (KRUG, 2010). Spellmeier (2011) mostrou em seu trabalho que o uso da temperatura de 280 °C na decomposição de produtos cárneos em forno micro-ondas foi eficiente, destacando as vantagens e melhores resultados obtidos ao comparar com o uso de temperaturas mais baixas. De forma semelhante, a amostra de requeijão utilizada é constituída tanto de gordura (12 % de acordo com o rótulo) quanto proteínas (2 % de acordo com o rótulo), justificando, portanto, o uso de altas temperaturas que proporcione eficiência ao processo.

A variável tempo foi estatisticamente significativa apenas na determinação de Ca. A superfície da Figura 5C mostra que foi necessário o maior tempo de decomposição na determinação desse elemento. O cálcio no requeijão é proveniente do leite e de aditivos (BRASIL,1997). Cerca de 70 a 80 % do Ca no leite está ligado a micela de caseína (DAMODARAN, 2010). De La Fuente e Juárez (1995) relataram que o cálcio associado com as micelas da caseína na presença de gordura causa dificuldades na determinação deste elemento em amostras de leite. Würfles e colaboradores (1988) descreveram em seus trabalhos que para oxidar completamente amostras biológicas, independente da

composição química, recomenda-se a decomposição ácida a 300 °C. Nesta temperatura após 2 h de decomposição, as soluções resultantes praticamente não contêm carbono (99,9 % do conteúdo original em carbono da amostra são oxidados). Possivelmente, devido a complexa estrutura da micela de caseína são necessários maiores temperatura e tempo de decomposição dessa amostra.

No entanto, devido ao ponto de ebulição relativamente baixo do HNO_3 (120 °C) é recomendada a decomposição na presença de uma mistura ácida de HNO_3 e H_2SO_4 (ponto de ebulição de 339 °C), o que permite trabalhar com altas temperaturas e acarreta em um aumento na eficiência do procedimento de decomposição, principalmente em amostras com alto teor de gordura (MOMEN, 2007).

A variável volume de H_2SO_4 não foi significativa, no entanto, em testes preliminares foi observado que a decomposição realizada com a mistura dos ácidos (HNO_3 e H_2SO_4) possui melhores sinais de emissão na determinação de Na e K e absorvância na determinação de Ca e Mg ao comparar com o uso de apenas HNO_3 como meio reacional. Esse fato pode ser explicado por a amostra ser composta praticamente por matéria orgânica, sendo essa parcialmente, ou mesmo completamente, destruída na presença de H_2SO_4 à quente (KRUG, 2010).

Na literatura são encontrados trabalhos que utilizaram a mistura desses dois ácidos, como Nóbrega e colaboradores (2002) e Santos e colaboradores (2005) que prepararam amostras de leite integral e desnatado com a mistura de HNO_3 e H_2SO_4 e decomposição em micro-ondas para posterior determinações de Ba, Ca, Fe, K, Mg, Na, P e Zn por ICP OES, cujos resultados evidenciaram a diminuição de carbono orgânico. Momen e colaboradores (2006) prepararam amostras de nozes por decomposição ácida em sistema aberto com chapa de aquecimento utilizando a mistura dos ácidos para posterior determinação de Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Al, Ba, Cd e Pb por ICP OES. Os resultados mostraram boa exatidão, com recuperações entre 86 e 101 %, e precisão satisfatória, com RSD < 10 %. Oreste e colaboradores (2015) determinaram Ca, Cu, Fe, K e Na em amostras de leite em pó integral por ICP OES. As amostras foram decompostas em meio ácido (mistura de HNO_3 e H_2SO_4) utilizando o sistema de refluxo (dedo frio), com a temperatura do bloco em 350 °C e 4 h de decomposição. Os resultados foram comparados com os obtidos após a decomposição por via

úmida em micro-ondas (mistura de HNO_3 e H_2O_2 , temperatura de 180 °C e 45 min decomposição). A exatidão foi avaliada por análise de MRC e os resultados foram satisfatórios. Os LD e LQ para ambos procedimentos foram baixos e o estudo do carbono orgânico residual mostrou que os dois procedimentos continham valores de carbono em torno de 6 %, o que indica que o procedimento 1, utilizando a mistura HNO_3 e H_2SO_4 em sistema de refluxo, apresentou boa eficiência na decomposição de amostras de leite em pó.

No decorrer da realização dos ensaios foi observado que a decomposição com a mistura ácida utilizando os volumes de 1 e 2 mL de H_2SO_4 apresentaram um resíduo untuoso após a decomposição, o que não foi observado ao utilizar 3 mL do ácido. Assim, o volume de 3 mL foi escolhido a fim de evitar interferências durante as análises, principalmente na nebulização no F AAS e MP AES.

Com base nos resultados obtidos, a condição otimizada para o procedimento 1 foi: aproximadamente 875 mg de amostra, 3 mL de H_2SO_4 , 5 mL de HNO_3 (fixo), temperatura do bloco a 325 °C e tempo de digestão de 3 h.

4.1.2. Solubilização alcalina com TMAH – Procedimento 2

Os resultados obtidos pelo DCCR (Tab. 4) mostraram, através de diagramas de Pareto (Fig. 6), as variáveis significativas na determinação dos sinais de Na, K, Ca e Mg ao nível de 95 % de confiança. A Figura 6 mostra, através dos diagramas, a massa e o volume como variáveis significativas na determinação de Ca (Fig. 6C) e Mg (Fig. 6D) e apenas a massa na determinação de Na (Fig. 6A). Para a determinação de K nenhuma das variáveis foi significativa ao nível de 95% de confiança.

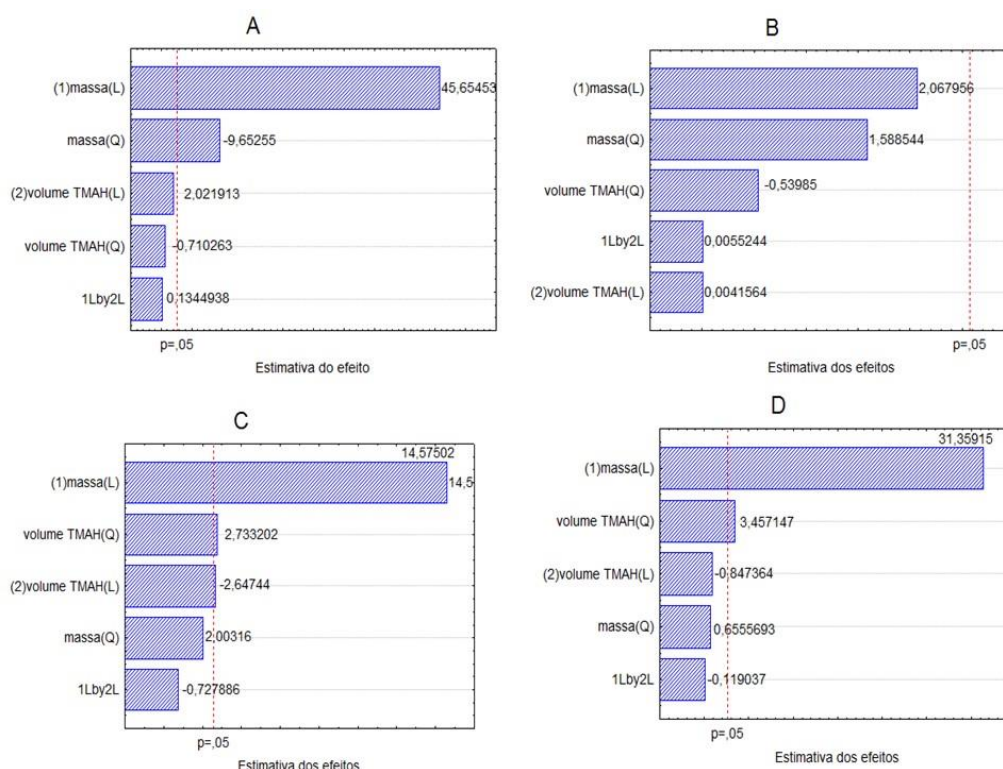


Figura 6. Diagrama de Pareto para a solubilização com TMAH na determinação de Na (A), K (B) e Ca (C) e Mg (D).

As análises de variância (ANOVA) foram feitas considerando apenas os termos significativos. Os valores de F calculado para Na, K, Ca e Mg, apresentados na Tabela 8, mostram que os modelos foram significativos e adequados para descrever os resultados por meio de superfícies de resposta. Os gráficos de superfícies de resposta estão apresentados na Figura 7.

Tabela 8. Análise de variância para a superfície de resposta do modelo quadrático para a determinação de Na, K, Ca e Mg em requeijão por F AES/AAS após solubilização com TMAH

Elemento	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médio	F calculado	F tabelado	R ²
Na	Regressão	5,984x10 ¹⁰	2	2,992x10 ¹⁰	908,14	4,46	0,996
	Resíduos	2,635x10 ⁸	8	3,295x10 ⁷			
	Total	6,0105x10 ¹⁰	10				
Ca	Regressão	0,06978	3	0,023	54,89	4,35	0,959
	Resíduos	2,966x10 ⁻³	7	4,237x10 ⁻⁴			
	Total	0,073	10				
Mg	Regressão	0,049	2	0,024	645,39	4,46	0,994
	Resíduos	3,020x10 ⁻⁴	8	3,775x10 ⁻⁵			
	Total	0,049	10				

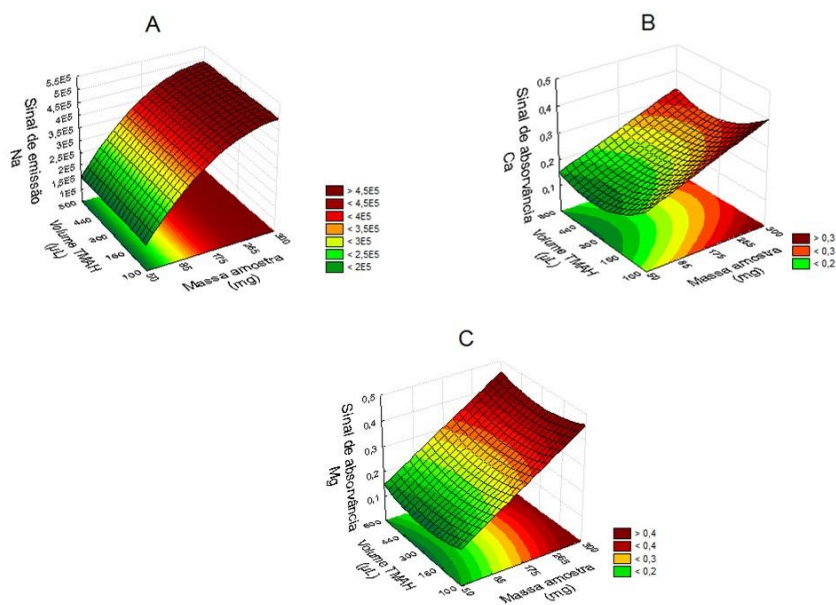


Figura 7. Superfícies de respostas para solubilização com TMAH na determinação de Na (A), Ca (B) e Mg (C) em função da massa e volume de TMAH

As superfícies de resposta mostram que para a solubilização com TMAH houve influência do aumento de massa na obtenção de maiores sinais de emissão para Na e de absorvância para Ca e Mg, assim como no procedimento

1. Para Na (Fig. 7A), as maiores massas forneceram os maiores sinais, independente do volume de TMAH utilizado. Para Ca (Fig. 7B) e Mg (Fig. 7C), os menores volumes do reagente apresentaram maiores sinais. Por esse estudo foi possível mostrar que poucas quantidades de TMAH são necessárias na solubilização da amostra, o que condiz com o predito por Matusiewicz e colaboradores (2004) e Nóbrega e colaboradores (2006). Com isso, foi utilizado o volume de 100 μ L visando o uso de uma menor quantidade de reagente, o que diminui os custos, bem como menor geração de resíduo. Portanto, a condição otimizada para a solubilização com TMAH foi: 300 mg de amostra e 100 μ L de TMAH.

Amostras com alto teor de gordura, como o requeijão, são de difícil dissolução. No entanto Martin-Hernández e colaboradores (1988) e Juárez e colaboradores (1992) utilizaram TMAH na solubilização de queijos obtendo recuperações entre 87 e 106 % para o primeiro e 91 e 103 % para o segundo, mostrando o uso eficiente do reagente alcalino frente a amostras de difícil solubilização, como as que apresentam alto teor de gordura. Uma das vantagens do TMAH é a eficiente solubilização em temperatura ambiente (NÓBREGA, 2006), como comprovado por Silva e colaboradores (2012) ao solubilizar amostras de carne com TMAH para posterior determinação de Na e K por F AAS/AES. Os resultados deste trabalho foram comparados com as decomposições ácidas (CH_2O_2 e $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) utilizando bloco digestor, não havendo diferenças entre os métodos, obtendo entre 90 e 100 % de recuperações.

Duarte e colaboradores (1998) estudaram o efeito do pH, entre 3 e 8, sobre a solubilização da caseína. Como pode ser observado na Fig. 8 (dados e figuras obtidos pelos autores), na faixa de pH de 3,0 a 5,0 a caseína apresentou solubilidade mínima. Quando o pH passou de 5,0 para 6,0, houve um aumento acentuado da solubilidade. A partir daí, notaram apenas uma pequena variação nos valores obtidos, sendo que o valor máximo foi atingido entre pH 7,0 e 8,0.

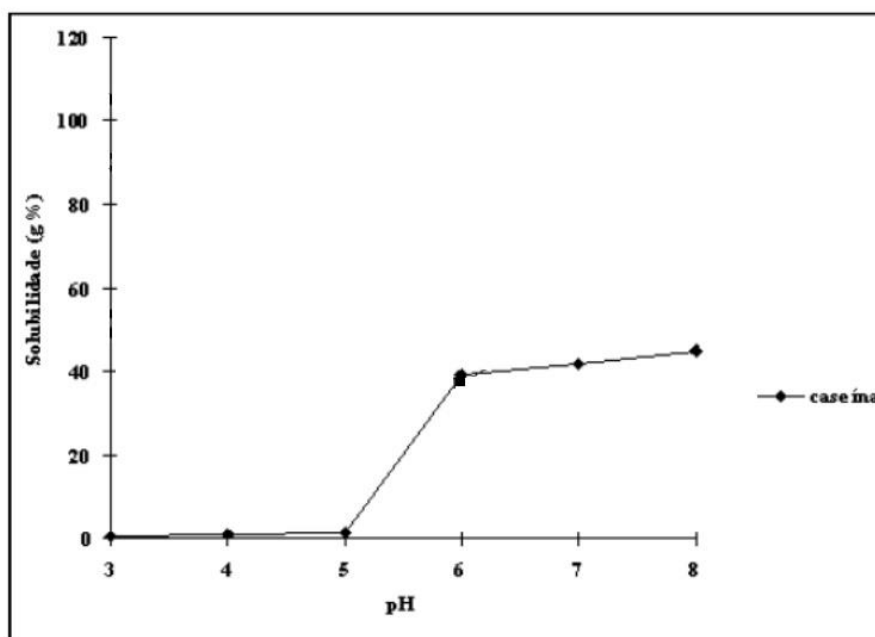


Figura 8. Efeito do pH sobre a solubilização da caseína

Pode-se explicar, com base neste estudo, o vantajoso uso do reagente alcalino, TMAH, na solubilização de requeijão, visto que tal amostra possui como principal constituinte a caseína.

4.3. Resultados analíticos

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI, 2004). O processo mais empregado para avaliar a exatidão de métodos é o uso de material de referência certificado (MRC), no entanto, para o desenvolvimento desse trabalho outros processos, aceitos e empregados quando não possui MRC, foram realizados, sendo eles, testes de recuperação de elementos, a comparação de métodos, bem como o uso de diferentes técnicas de análise.

O processo de adição e recuperação dos elementos foi realizado para os dois procedimentos propostos. Com as variáveis otimizadas, as massas da amostra foram pesadas, seguida da adição das soluções contendo os elementos Na, K, Ca e Mg em três concentrações distintas, como mostram as Tabelas 9 e

10. Em seguida, a decomposição ácida e a solubilização alcalina foram realizadas como descrito nos itens 3.4.1.1 e 3.4.1.2, respectivamente.

As porcentagens de recuperação ficaram em faixas satisfatórias, entre 80 e 102 %, para o procedimento 1, e 80 e 104 % para o procedimento 2, como mostram as Tabelas 9 e 10, respectivamente, o que confirma também a exatidão de ambos procedimentos. Esses resultados estão em conformidade com a FDA (*Food and Drug Administration*, 2014) que estabelece o intervalo de 80 a 120 % como aceitáveis para testes de recuperação.

Tabela 9. Concentrações de Na, K, Ca e Mg (mg g^{-1}) antes e após as adições de diferentes concentrações dos elementos na amostra 1 por decomposição ácida com sistema de refluxo

Elemento	Concentrações adicionadas	Concentrações encontradas*	Recuperação (%)
Na	0,00	$7,39 \pm 0,29$	-
	3,43	$10,60 \pm 0,19$	97,9
	9,14	$15,92 \pm 0,16$	96,3
	17,13	$21,24 \pm 0,35$	86,6
K	0,00	$0,76 \pm 0,01$	-
	0,46	$1,15 \pm 0,01$	94,3
	0,86	$1,50 \pm 0,01$	92,6
	1,37	$1,86 \pm 0,01$	87,3
Ca	0,00	$2,22 \pm 0,07$	-
	1,71	$3,84 \pm 0,03$	97,7
	3,08	$4,84 \pm 0,16$	91,3
	4,28	$5,68 \pm 0,03$	87,7
Mg	0,00	$0,108 \pm 0,002$	-
	0,19	$0,304 \pm 0,003$	102,0
	0,32	$0,427 \pm 0,005$	99,8
	0,43	$0,540 \pm 0,013$	100,4

*Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=3).

Tabela 10. Concentrações de Na, K, Ca e Mg (mg g^{-1}) antes e após as adições de diferentes concentrações dos elementos na amostra 1 por solubilização com TMAH

Elemento	Concentrações adicionadas	Concentração encontrada*	Recuperação (%)
Na	0,00	$7,18 \pm 0,08$	-
	2,50	$9,78 \pm 0,06$	101,0
	6,67	$13,29 \pm 0,11$	95,9
	10,00	$16,15 \pm 0,09$	94,0
K	0,00	$0,75 \pm 0,03$	-
	0,75	$1,49 \pm 0,04$	99,3
	2,00	$2,82 \pm 0,06$	102,5
	3,67	$3,69 \pm 0,02$	83,5
Ca	0,00	$1,98 \pm 0,01$	-
	5,00	$6,68 \pm 0,03$	95,7
	8,30	$9,08 \pm 0,01$	88,3
	11,70	$13,88 \pm 0,08$	101,5
Mg	0,00	$0,11 \pm 0,01$	-
	0,13	$0,24 \pm 0,01$	100,0
	0,21	$0,320 \pm 0,001$	100,0
	0,29	$0,40 \pm 0,01$	100,0

*Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

A exatidão dos métodos propostos também foi confirmada por comparação com a metodologia de referência. Essa comparação entre resultados obtidos empregando o método em desenvolvimento e os resultados adquiridos a partir de um método de referência avalia o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos, ou seja, o grau de exatidão do método proposto em relação ao método de referência (RIBANI, 2004). A Tabela 11 mostra as concentrações dos elementos Na, K, Ca e Mg obtidas na amostra 1, em mg g^{-1} e o RSD %, após o preparo dos três procedimentos e determinação por F AAS/AES.

Tabela 11. Concentração média dos elementos (mg g⁻¹) e RSD % para Na e K por F AES e Ca e Mg por F AAS após os três preparos de amostra

Elemento	Procedimento	Concentração (mg g ⁻¹) ± DP *	RSD %
Na	1	7,35 ± 0,15	2,04
	2	7,00 ± 0,15	2,14
	3	8,00 ± 0,03	0,38
K	1	0,76 ± 0,01	1,32
	2	0,75 ± 0,02	2,67
	3	0,80 ± 0,01	1,25
Ca	1	2,23 ± 0,01	0,45
	2	1,98 ± 0,05	2,53
	3	2,03 ± 0,13	6,40
Mg	1	0,108 ± 0,002	1,85
	2	0,110 ± 0,002	1,82
	3	0,107 ± 0,004	3,74

*Valores expressos como média ± desvio padrão (n=9).

O teste estatístico utilizado para avaliar a concordância entre os resultados obtidos, após os três procedimentos de preparo de amostra, foi o teste Tukey. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa, a 95% de confiança, na determinação dos elementos Na, K, Ca e Mg entre os métodos propostos e o procedimento convencional.

Os parâmetros de mérito para as curvas de calibração de todos os elementos por F AAS/AES estão dispostos na Tabela 12. Observou-se que as curvas de calibração apresentaram boa linearidade com $R^2 > 0,99$, independente do procedimento de preparo das amostras. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais (RIBANI, 2004). Ao analisar os limites de detecção (LD) do equipamento e dos procedimentos, respectivamente, os mesmos se apresentaram baixos, com valores máximos de 0,10 mg L⁻¹ e 0,81 µg L⁻¹ para Na, 0,02 mg L⁻¹ e 0,74 µg L⁻¹ para K, 0,18 mg L⁻¹ e 33,07 µg L⁻¹ para Ca e 0,02 mg L⁻¹ e 0,83 µg L⁻¹ para Mg. Isso mostra que as concentrações obtidas no decorrer do trabalho são passíveis de detecção, visto que as mesmas se encontram acima dos LDs.

As precisões dos procedimentos propostos foram avaliadas através dos valores de RSD obtidos de nove replicatas das amostras (Tab. 11). Pode-se observar que os valores de RSD estão entre 0,45 e 2,67 %, o que mostra boa repetibilidade dos procedimentos, visto que os valores estão abaixo de 5%.

Os parâmetros de mérito para MP AES foram apresentados na Tabela 12, juntamente com os parâmetros de mérito apresentadas para as demais técnicas de análise. Nota-se que as curvas de calibração para MP AES apresentaram boa linearidade com $R^2 > 0,997$, independente do procedimento de preparo das amostras. Com relação a sensibilidade, avaliada pelos valores da inclinação das curvas de calibração (a), a técnica MP AES mostrou-se mais sensível na determinação dos elementos, com maiores valores de ' a '. Ao analisar os limites de detecção (LD) do equipamento e do método, respectivamente, os valores máximos obtidos foram, 0,01 mg L⁻¹ e 0,27 µg g⁻¹ para Na, 0,003 mg L⁻¹ e 0,29 µg g⁻¹ para K, 0,01 mg L⁻¹ e 0,27 µg g⁻¹ para Ca e 0,003 mg L⁻¹ e 0,06 µg g⁻¹ para Mg. Comparando com os LD obtidos por F AAS/AES, o MP AES possui menores LD o que comprova sua sensibilidade.

Os RSDs % médios obtidos por MP AES foram em média de 1,98 % para Na, 4,81 % para K, 4,27 % para Ca e 7,17 % para Mg. Os valores de RSDs obtidos foram satisfatórios ficando todos abaixo de 10 %.

Tabela 12. Parâmetros de mérito das técnicas F AAS/AES e MP AES para decomposição ácida com sistema de refluxo, solubilização alcalina com TMAH e decomposição via seca

Elemento	Técnica analítica	Procedimento	Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	a* (L mg ⁻¹)	R ² *	LD* equipamento (mg L ⁻¹)	LD* método (µg g ⁻¹)
Na	F AES	1	0,25 - 1,5	14.703,49	0,991	0,01	0,43
		2		16.063,86	0,992	0,002	0,81
		3		12.373,81	0,994	0,10	0,55
	MP AES	1	0,25 - 1,5	672.308,67	0,999	0,01	0,27
		2		668.683,26	0,999	0,003	0,24
		3					
K	F AES	1	0,25 - 1,5	14.567,46	0,999	0,003	0,36
		2		15.122,71	0,999	0,003	0,74
		3		14.411,35	0,998	0,02	0,18
	MP AES	1	0,25 - 1,5	138.374,93	0,999	0,002	0,08
		2		115.606,64	0,998	0,003	0,29
		3					
Ca	F AAS	1	1,0 - 4,0	0,06	0,991	0,02	2,69
		2		0,06	0,999	0,03	33,07
		3		0,03	0,999	0,18	2,03
	MP AES	1	1,0 - 4,0	53.2036,32	0,998	0,01	0,23
		2		55.2129,78	0,999	0,01	0,27
		3					
Mg	F AAS	1	0,1 - 0,4	0,97	0,999	0,003	0,18
		2		0,90	0,999	0,003	0,83
		3		0,79	0,999	0,02	0,26
	MP AES	1	0,1 - 0,4	380.869,89	0,997	0,001	0,03
		2		353.678,66	0,998	0,003	0,06
		3					

* a: coeficiente angular da curva, LD: limite de detecção; R²: coeficiente de correlação linear

4.4. Aplicação dos procedimentos propostos

Após a obtenção das condições otimizadas para o procedimento 1 (~ 875 mg amostra, 3 mL de H_2SO_4 , temperatura do bloco de 325 °C e 3 h de digestão) e para o procedimento 2 (~ 300 mg de amostra e 100 μL de TMAH) e avaliação da exatidão e precisão dos mesmos, as condições foram aplicadas a cinco amostras de requeijão: amostra 2, amostra 3, amostra 4, amostra 5 e amostra 6. As determinações das concentrações dos elementos Na, K, Ca e Mg foram obtidas por F AES (Na e K), F AAS (Ca e Mg) e, a título de comparação, a fim de verificar a precisão dos procedimentos, as análises também foram feitas por MP AES (Na, K, Ca e Mg).

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos das concentrações (mg g^{-1}) em ambas as técnicas. Ao aplicar o teste Tukey, a 99 % de confiança, para as concentrações obtidas de Na e K pelas técnicas, não houve diferença significativa. Ao avaliar as concentrações de Na das amostras 2 e 4 (tradicional marcas A e B) e 3 e 5 (light marcas A e B), aplicando o teste Tukey a 95 % de confiança não possuem diferença significativa. Já a avaliação para K pelo teste Tukey a 95 % de confiança, apresentou diferença significativa. Esse fato pode ser por a composição de alguns sais light (NaCl) virem com substituição de NaCl por KCl , o que acarreta em um aumento da concentração de K.

Ao analisar as concentrações obtidas de Na para as amostras 4 (tradicional marca B) e 6 (light com teor de sódio reduzido marca B), aplicando o teste Tukey, não houve diferença significativa a 95 % de confiança, o que não era esperado, pois no rótulo da amostra 6 é informado que o produto é light com teor de sódio reduzido, de acordo com Brasil (2012), para se aplicar a denominação em requeijão com teor reduzido de sódio, o produto deve apresentar diminuição mínima de 25% em relação ao produto tradicional da mesma marca.

As concentrações de Ca obtidas para as amostras 2 e 4 (tradicional marcas A e B) e 3 e 5 (light marcas A e B) também foram avaliadas aplicando o teste Tukey, a 95 % de confiança houve diferença significativa entre as amostras. Esse fato pode ser explicado pela adição de paracaseinato de cálcio a massa para a produção de requeijão light, já que o mesmo apresenta alta porcentagem

de umidade, sendo essa adição necessária para ajudar a conseguir a consistência necessária ao produto final (BOSI, 2008).

A avaliação das concentrações de Mg pelo teste Tukey a 95 % de confiança, não houve diferença significava entre as amostras 2 e 4 (tradicional marcas A e B) e 3 e 5 (light marcas A e B).

A eficiência, precisão e exatidão dos procedimentos propostos para determinação dos elementos Na, K, Ca e Mg, foram comprovadas através da obtenção das concentrações por MP AES, mostrando assim a versatilidade dos procedimentos frente a uma segunda técnica de análise.

Devido à preocupação acerca da possibilidade do aumento da ingestão de Na está ligada a doenças cardiovasculares, o controle diário deste elemento no processamento desses alimentos se faz necessário. No rótulo dos produtos analisados, Tabela 13, é informado a quantidade de Na (mg g^{-1}) presente nos cinco produtos analisados, bem como a média das concentrações determinadas.

Tabela 13. Concentrações de Na ($\text{mg}/30\text{g}$ de requeijão) informadas no rótulo e a média das concentrações ($\text{mg}/30\text{ g}$ requeijão) determinadas para as cinco amostras analisadas

Amostras	Concentração de Na (rótulo produto)	Concentração de Na (determinada)
2*	160	186
3**	175	203
4***	183	167
5****	199	204
6*****	120	179

*requeijão tradicional marca A; **requeijão light marca A; ***requeijão tradicional marca B; ****requeijão light marca B; *****requeijão light com teor de sódio reduzido marca B

Pode-se observar que, de modo geral, os valores encontrados não são concordantes com os valores informados nos rótulos, o que comprova a importância do controle das quantidades presentes deste elemento pelas indústrias participantes do acordo assinado com o Ministério da Saúde do Brasil. Além disso, vê-se a importância na determinação e quantificação dos minerais essenciais, como K, Ca e Mg, em derivados do leite, visto que esses produtos são consumidos como fonte de nutrientes.

Tabela 14. Concentração de Na, K, Ca e Mg (mg g⁻¹), nas amostras 2, 3, 4, 5 e 6, obtidas por F AAS/AES e MP AES após os procedimentos 1 e 2

Elemento	Técnica Analítica	Procedimento	Amostras				
			amostra 2*	amostra 3**	amostra 4***	amostra 5****	amostra 6*****
Na	F AES	1	6,30 ± 0,34	6,97 ± 0,58	5,82 ± 0,46	7,77 ± 0,11	6,76 ± 0,26
		2	6,85 ± 0,16	7,23 ± 0,04	6,20 ± 0,06	7,82 ± 0,15	6,81 ± 0,04
	MP AES	1	5,28 ± 0,07	5,84 ± 0,02	4,98 ± 0,09	5,51 ± 0,05	5,13 ± 0,04
		2	6,42 ± 0,13	7,07 ± 0,09	5,30 ± 0,02	6,07 ± 0,06	5,22 ± 0,01
K	F AES	1	0,84 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,858 ± 0,001	1,07 ± 0,04	4,61 ± 0,07
		2	0,83 ± 0,01	0,289 ± 0,002	0,85 ± 0,01	1,096 ± 0,004	4,48 ± 0,03
	MP AES	1	0,65 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,86 ± 0,02	1,02 ± 0,01	4,50 ± 0,1
		2	0,84 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,89 ± 0,02	1,08 ± 0,03	4,48 ± 0,04
Ca	F AAS	1	2,15 ± 0,01	3,39 ± 0,10	3,23 ± 0,09	3,69 ± 0,03	3,26 ± 0,02
		2	2,129 ± 0,004	3,03 ± 0,12	3,13 ± 0,01	3,61 ± 0,03	3,24 ± 0,02
	MP AES	1	2,16 ± 0,02	2,87 ± 0,03	3,07 ± 0,14	3,71 ± 0,09	3,71 ± 0,09
		2	2,10 ± 0,1	3,15 ± 0,02	3,27 ± 0,05	3,58 ± 0,06	3,58 ± 0,06
Mg	F AAS	1	0,10 ± 0,01	0,101 ± 0,002	0,167 ± 0,002	0,226 ± 0,002	0,228 ± 0,004
		2	0,107 ± 0,001	0,107 ± 0,001	0,17 ± 0,01	0,224 ± 0,002	0,229 ± 0,002
	MP AES	1	0,10 ± 0,01	0,101 ± 0,003	0,16 ± 0,01	0,214 ± 0,007	0,22 ± 0,01
		2	0,105 ± 0,001	0,099 ± 0,004	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,01

*requeijão tradicional marca A; **requeijão light marca A; ***requeijão tradicional marca B; ****requeijão light marca B; *****requeijão light com teor de sódio reduzido marca B.

5. Conclusão

O uso do planejamento fatorial avaliou de forma eficiente as variáveis significativas dos procedimentos de preparo das amostras para subsequente determinação dos elementos. A decomposição ácida com sistema de refluxo e a solubilização alcalina com TMAH foram eficientes no preparo das amostras de requeijão permitindo a determinação do elemento controle, Na, bem como dos principais elementos essenciais, K, Ca e Mg, presentes no requeijão, pelas técnicas F AAS (Ca, Mg), F AES (Na, K) e MP AES (Na, K, Ca e Mg). As principais vantagens dos procedimentos propostos, quando comparados com a metodologia de referência, foram o uso de poucas quantidades de amostra, uma menor manipulação das amostras, o que diminuiu de forma significativa o número de etapas envolvidas, minimizando possíveis contaminações e perdas durante a execução, além de propiciar uma maior simplicidade as análises, características essenciais para a análise de rotina.

Sendo assim, o presente trabalho avaliou o uso de dois procedimentos simples e eficientes para o preparo de amostras de requeijão, os quais se mostraram exatos e precisos para o objetivo proposto, apresentando-se como alternativas viáveis para o controle de Na e para a determinação dos elementos K, Ca e Mg, presentes de forma majoritária, em amostras de requeijão, bem como versáteis, visto que houve respostas significativas ao utilizar a nova técnica analítica, no caso o MP AES, sendo essa de grande interesse em determinações analíticas, por sua abrangência na caracterização elementar por se tratar de uma técnica multielementar, pela alta sensibilidade e baixo custo de análise.

Os resultados obtidos para as concentrações dos quatro elementos nas diferentes amostras mostram a importância de um controle de qualidade rigoroso nas indústrias de alimentos, principalmente nos alimentos ditos light.

6. Referências bibliográficas

AMAI, R. S., DONATI, G. L., SCHIAVO, D., NOBREGA, J. A. A simple dilute-and-shoot procedure for Si determination in diesel and biodiesel by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Microchemical Journal**, 106, 318-322, 2013.

AMARO-LÓPEZ, M. A.; MORENO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-SEGARRA, P. J.; ZURERA-COSANO, G. Tratamiento de las matrices lácteas para la determinación de trazas metálicas por absorción atómica – Revisión. **Alimentaria**, v. 271, p. 71-78, 1996.

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

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. **Biotecnologia industrial - Vol. 4**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 544p.

BANNWART, G. C. M. DE C.; SILVA, M. E. M. P.; VIDAL, G. Redução de sódio em alimentos: panorama atual e impactos tecnológicos, sensoriais e de saúde pública. **Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 39, n. 3, 2014.

BIEGO, G. H., JOYEUX, M., HARTEMANN, P., DEBRY, G. Daily intake of essential minerals and metallic micropollutants from foods in France. **Sci. Total Environ.**, v.217, p.27-6, 1998.

BOSI, M. G. **Desenvolvimento de processo de fabricação de requeijão light e de requeijão sem adição de gordura com fibra alimentar**. 2008. 284 p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas – Campinas, SP, 2008.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 54 de 12 de novembro de 2012**. Brasília, DF, Brasil.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008–2009 - **Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade de Requeijão ou Requesón**. Diário Oficial da União. Brasília-DF, 08 set. 1997. Acessado em 05 de junho de 2014. Online. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>.

CAROLI, S. **The determination of chemical elements in food: applications for atomic and mass spectrometry**. John Wiley & Sons, 2007.

CAVALCANTE, A. B. D. **Desenvolvimento e padronização de formulação para o processamento de requeijão**. 1991. 112 p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia dos Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

CHEN, M., HSIEH, Y., WENG, Y. E CHIOU, Y. R. Flame photometric determination of salinity in processed foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 765 – 770, 2005.

COBCROFT, M.; TIKELLIS, K.; BUSCH, J. L. H. C. Salt reduction: a technical overview. **Food Australia**, v. 60, n. 3, p. 83-86, 2008.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DE LA FUENTE, M. A.; CARAZO, B.; JUÁREZ, M. Determination of major minerals in dairy products digested in closed vessels using microwave heating. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 806-811, 1997.

DE LA FUENTE, M. A.; JUÁREZ, M. Rapid determination of calcium, magnesium, sodium and potassium in milk by flame atomic spectrometry after microwave oven digestion. **Analyst**, v. 120, n. 1, p. 107-111, 1995.

DE LA FUENTE, M. A.; GUERRERO, G.; JUAREZ, M. Manganese and zinc analysis in milk by microwave oven digestion and platform graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2406-2410, 1995.

DEMIREL, S.; TUZEN, M.; SARACOGLU, S.; SOYLAK, M. Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 3, p. 1020-1026, 2008.

DÖTSCH, M.; BUSCH, J.; BATENBURG, M.; LIEM, G.; TAREILUS, E.; MUELLER, R.; MEIJER, G. Strategies to reduce sodium consumption: a food industry perspective - Critical reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 10, p. 841-851, 2009.

DOYLE, M. E.; GLASS, K. A. Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health - Comprehensive Reviews. **Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 44-56, 2010.

DUARTE, J. A.; CARREIRA, R. L.; JUNQUEIRA, R. G.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M. P. C. Propriedades emulsificantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos: 1. Efeito do pH e do tempo de hidrólise. **Food Science and Technology**, v. 18, 1998.

FERNANDES, M. da S.; GARCIA, R. K. de A. **Princípios e inovações em ciência e tecnologia de alimentos**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: AMCGuedes, 2015. 363 p.

FERREIRA, K.S.; GOMES, J.C.; CHAVES, J.B.P. Copper content of commonly consumed food in Brazil. **Food Chemistry**, v. 92, n. 1, p. 29–32, 2005.

FERREIRA, S. L.; JESUS, R. M. D.; MATOS, G. D.; ANDRADE, J. B. D.; BRUNS, R. E.; DOS SANTOS, W. N.; DESSUY, M. B. Multivariate optimization and validation of an analytical method for the determination of cadmium in wines employing ET AAS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 788-794, 2009.

FERREIRA, S. L.; SILVA, L. O.; DE SANTANA, F. A.; JUNIOR, M. M.; MATOS, G. D.; DOS SANTOS, W. N. A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 307-310, 2013.

FORMENTI, L. **Governo e indústria de alimentos fecham acordo para reduzir sódio**. O Estado de S.Paulo. Edição digital, 2011. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/noticias/impreso,governo-e-industria-de-alimentos-fecham-acordo-para-reduzirsodio,703297,0.htm>. Acessado em 08 de agosto de 2014.

GAZE, L. V.; COSTA, M. P.; MONTEIRO, M. L. G.; LAVORATO, J. A. A.; JÚNIOR, C. C.; RAICES, R. S. L.; CRUZ, A. G.; FREITAS, M. Q. Dulce de Leche, a typical product of Latin America: Characterisation by physicochemical, optical and instrumental methods. **Food Chemistry**, v. 169, p. 471-477, 2015.

GOMES, A. P.; CRUZ, A. G.; CADENA, R. S.; CELEGHINI, R. M. S.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H. M. A.; POLLONO, M. A. R.; GRANATO, D. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. In: **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 2701-2706, 2011.

GUÀRDIA, M. D.; GUERRERO, L.; GELABERT, J.; GOU, P.; ARNAU, J. Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. In: **Meat Science**, v.73, p. 484-490, 2006.

IFIC – “IFIC Review, Sodium in Food and Health”. 2010. Disponível em: http://www.foodinsight.org/Resources/Detail.aspx?topic=IFIC_Review_Sodium_in_Food_and_Health. Acessado em: 06-11-14.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, 4ª ed. 2008. 1020 p.

JANKOWSKI, K. J.; RESZKE, E. **Microwave induced plasma analytical spectrometry**. Royal Society of Chemistry, 2010.

JOHNSON, M. E.; KAPOOR, R.; MCMAHON, D. J.; MCCOY, D. R.; NARASIMMOM, R. G. Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: scientific and technological aspects. In: **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 252-268, 2009.

JUNIOR, J. B. P.; FERNANDES, K. G.; MÜLLER, R. C.; NÓBREGA, J. A.; PALHETA, D. C. Determinação direta de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite de búfala da Ilha de Marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2333-2335, 2009.

KATSIARI, M. C.; VOUTSINAS, L. P.; ALICHANIDIS, E.; ROUSSIS, I. G. Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 6, p. 465-472, 1997.

KAYA, G.; AKDENIZ, I.; YAMAN, M. Determination of Cu, Mn, and Pb in yogurt samples by flame atomic absorption spectrometry using dry, wet, and microwave ashing methods. **Atomic Spectroscopy**, v. 29, n. 3, p. 99-106, 2008.

KINGSTON, H. M.; JASSIE, L. B. Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice. **Anal. Chem.**, v. 61, n. 5, p. 330, 1989.

KIRA, C. S.; MAIHARA, V. A. Determinação de elementos essenciais maiores e traço em queijos por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio induzido após digestão parcial. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 3, p. 446-450, 2007.

KORN, M. DAS G.A.; MORTE, E. S. DA B.; DOS SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; DOS SANTOS, W. P. C.; DOS SANTOS, E. B. G. N.; KORN, M. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 67-92, 2008.

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, O. V. **Espectrometria de absorção atômica – Parte 1 Fundamentos e atomização com chama**, 2004.

KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba, 1ª ed., 2010. 340p.

LI, W.; SIMMONS, P.; SHRADER, D.; HERRMAN, T. J.; DAI, S. Y. Microwave plasma-atomic emission spectroscopy as a tool for the determination of copper, iron, manganese and zinc in animal feed and fertilizer. **Talanta**, v. 112, p. 43-48, 2013.

LIEM, D. G.; MIREMADI, F.; KEAST, R. S. Reducing sodium in foods: the effect on flavor. **Nutrients**, v. 3, n. 6, p. 694-711, 2011.

LINDSAY, R. C.; HARGETT, S. M.; BUSH, C. S. Effect of sodium/potassium (1:1) chloride and low sodium chloride concentrations on quality of cheddar cheese. In: **Journal Dairy Science**, v. 65, p. 360–70, 1982.

MACEDO, S. M.; DE JESUS, R. M.; GARCIA, K. S.; HATJE, V.; QUEIROZ, A. F. D. S.; FERREIRA, S. L. Determination of total arsenic and arsenic (III) in phosphate fertilizers and phosphate rocks by HG-AAS after multivariate

optimization based on Box-Behnken design. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 974-979, 2009.

MARTIN-HERNANDEZ, M. C.; ALONSO, L.; JUÁREZ, M.; FONTECHA, J. Gas chromatographic method for determining free fatty acids in cheese. **Chromatographia**, v. 25, n. 2, p. 87-90, 1988.

MARTINS, V. S. **Efeito da redução do sódio nas características físico-químicas do queijo tipo minas padrão**. 2015. 56 p. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná, Londrina, 2015.

MATUSIEWICZ, H.; GOLIK, B. Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization. **Microchemical Journal**, v. 76, n. 1, p. 23-29, 2004.

MOMEN, A. A.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N.; STRATIS, J. A. Investigation of four digestion procedures for multi-element determination of toxic and nutrient elements in legumes by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 565(1), 81-88, 2006.

MOMEN, A. A.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N.; STRATIS, J. A. Use of fractional factorial design for optimization of digestion procedures followed by multi-element determination of essential and non-essential elements in nuts using ICP-OES technique. **Talanta**, 71(1), 443-451, 2007.

MOURA, K. R. M. **Otimização do processo de produção de biodiesel metílico do sebo bovino aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR) e a avaliação da estabilidade térmica**. Tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2008.

NANO, R. M. W.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, S. L. C.; BACCAN, N.; CADORE, S. Statistical mixture design development of digestion methods for Oyster tissue using inductively coupled plasma optical emission spectrometry for the determination of metallic ions. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 559-564, 2009.

NAKASATO, M. Sal e Hipertensão. **Revista brasileira de hipertensão**, v. 11, p. 95-97, 2004.

NÓBREGA, J. A.; GÉLINAS, Y.; KRUSHEVSKA, A.; BARNES, R. M. Direct determination of major and trace elements in milk by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, n. 10, p. 1243-1246, 1997.

NÓBREGA, J. A.; TREVIZAN, L. C.; ARAÚJO, G. C.; NOGUEIRA, A. R. A. Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 1855-1876, 2002.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 61, p. 465-495, 2006.

NUNES, A. M.; ACUNHA, T. S.; ORESTE, E. Q.; LEPRI, F. G.; VIEIRA, M. A.; CURTIUS, A. J.; RIBEIRO, A. S. Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in fresh and processed meat treated with tetramethylammonium hydroxide by atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 10, p. 1850-1857, 2011.

OKUMURA, F.; CAVALHEIRO, É. T.; NÓBREGA, J. A. Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 832-836, 2004.

OLIVEIRA, J. S. de. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. Campinas: UNICAMP, 146p., 1986.

OLIVEIRA, M. B. de. **Avaliação de queijos ricota comercializados em Goiânia-GO e queijos processados com diferentes concentrações de leite e adicionados de proteínas de soja e cálcio**. 2012. 109 p. Dissertação de mestrado. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

OLIVEIRA, R. M. DE; ANTUNES, A. C. N.; VIEIRA, M. A.; MEDINA, A. L.; RIBEIRO, A. S. Evaluation of sample preparation methods for the determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 402-409, 2016.

OLIZ, C. M.; PEREIRA, C. C.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; MEDEIROS, A. Avaliação de tratamentos da amostra em microescala para a determinação de K, Mg, Na. **Quim. Nova**, v. 36, n. 7, p. 972-977, 2013.

ORESTE, E. Q.; DE JESUS, A.; DE OLIVEIRA, R. M.; DA SILVA, M. M.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. New design of cold finger for sample preparation in open system: determination of Hg in biological samples by CV-AAS. **Microchemical Journal**, v.109, p. 5-9, 2013.

ORESTE, E. Q.; DE SOUZA, A. O.; PEREIRA, C. C.; LISBOA, M. T.; CIDADE, M. J. A.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Evaluation of Sample Preparation Methods for the Determination of Ca, Cu, Fe, K, and Na in Milk Powder Samples by ICP-OES. **Food Analytical Methods**, p. 1-8, 2015.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Microwave plasma atomic emission spectrometric determination of Ca, K and Mg in various cheese varieties. **Food chemistry**, v. 192, p. 295-298, 2016.

OZBEK, Nil; AKMAN, Suleyman. Determination of boron in Turkish wines by microwave plasma atomic emission spectrometry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 532-535, 2015.

PAES, L. C. **Determinação de cobre, manganês e cádmio em mel por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 2007. 71 p. Dissertação de mestrado. Instituto de química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

POLLONIO, M. A. R. Redução de Sódio em Produtos Cárneos Processados. **Anais do V Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo, 2009. p. 115 – 122.

PROJAHN, H.-D.; STEEG, U.; SANDERS, J.; VANCLAY, E. Application of the reference-element technique for fast sequential flame atomic-absorption spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 378, p. 1083–1087, 2004.

REDDY, K. A.; MARTH, E. H. Reducing the sodium content of foods: A review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 2, p. 138-150, 1991.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A. S.; MORETTO, A. L.; ARRUDA, M. A.; CADORE, S. Analysis of powdered coffee and milk by ICP OES after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. **Microchimica Acta**, v. 141, p. 149-155, 2003.

RODRIGUES, J. F.; GONÇALVES, C. S.; CORRÊA, R.; PEREIRA, A.; SANTOS, R. S. Aceitação sensorial de queijos mussarela com reduzido teor de sódio. **XXII CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**. Lavras, 2013.

SA, F. **O leite e seus produtos**. 1978. Acesso em 30 de nov de 2014. Disponível em <http://www.cienriadoleite.com.br/termosabc.htm>

SANTOS, D. M.; PEDROSO, M. M.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. A new procedure for bovine milk digestion in a focused microwave oven: gradual sample addition to pre-heated acid. **Talanta**, v. 65, n. 2, p. 505-510, 2005.

SILVA, R. G.; SANTELLI, R. E.; WILLIE, S. N.; STURGEON, R. E.; SELLA, S. M. Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analyst**, v. 124, n. 12, p. 1843-1846, 1999.

SILVA, C. S. D.; NUNES, A. M.; ORESTE, E. Q.; ACUNHA, T. S.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Evaluation of sample preparation methods based on alkaline and acid solubilization for the determination of Na and K in meat samples by atomic spectrometric techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 9, p. 1623-1629, 2012.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. 8.ed., Porto Alegre: Bookman, 2002

Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 89, n. 3, p. 24-79, 2007.

SOUSA, R. A.; LISBOA, T. P. Determination of Fe and Zn in Petit Suisse cheese: analytical aspects and levels found in commercial samples. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 1, p. 35-43, 2015.

SOUZA, A. O.; PEREIRA, C. C.; JADO, B. M.; ORESTE, E. Q.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; NUNES, A. M. Determinação de Cd e Pb em amostras de goma xantana por GF AAS. **Quim. Nova**, v. 38, n. 2, p. 209-213, 2015.

SPELLMEIER, J. G. **Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para posterior determinação de As, Cd e Pb em carne e produtos cárneos**. 2011. 123 p. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Química Analítica. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

TUZEN, M.; SILICI, S.; MENDIL, D.; SOYLAK, M. Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. **Food chemistry**, v. 103, n. 2, p. 325-330, 2007.

United States Food and Drug Administration (US-FDA) - **A Laboratory Guide to Method Validation**, 2014.

VAN DENDER, A. G. F. **Requeijão cremoso e outros queijos fundidos: tecnologia de fabricação, controle do processo e aspectos de mercado**. Fonte Comunicações e Editora, 2006.

VAN DENDER, A.G.F; SPADOTI, L.M. **Probióticos e prebióticos em queijo**. Campinas: Tecnolat, 2009.

VAN DENDER, A. G.; SPADOTI, L. M.; ZACARCHENCO, P. B.; TRENTO, F. K.; ORMENESE, R. C.; MORGANO, M. A. Efeito dos sais fundentes nas características do requeijão cremoso sem adição de gordura e com teor reduzido de sódio. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 387, p. 38-47, 2012.

VAN DENDER, A. G. F.; ZACARCHENCO, P. B.; SILVA, A. T.; SPADOTI, L. M.; MOSQUIM, C. A. U. **O teor de sódio reduzido em queijos processados ou fundidos**. 2015. Disponível em: m.milkpoint. com.br. Acessado em: 13-08-15.

VASSILEVA, E.; DOČEKALOVÁ, H.; BAETEN, H.; VANHENTENRIJK, S.; HOENIG, M. Revisitation of mineralization modes for arsenic and selenium determinations in environmental samples. **Talanta**, v. 54, n. 1, p. 187-196, 2001.

VIEGAS, C. Consumo de sal numa escola de hotelaria. **Segurança e Qualidade Alimentar**. Lisboa, 2009.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3^a ed. comp. rev. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.

WILLIAMS, S. R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 144-169.

WÜRFLES, M.; JACKWERTH, H.; STOEPPLE, M. On the composition of biological materials after pressure digestion with nitric acid. **Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie**, v. 330, n. 2, p. 160-161, 1988.

ZACARCHENCO, P.B. et al. Desafio Tecnológico na Fabricação de queijos e requeijão cremoso de baixo teor de sódio. **Indústria de Laticínios**, v. 14, n. 80, p. 82-85, 2009.