

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)

João B. Pereira Junior, Kelly G. Fernandes* e Regina C. S. Müller

Faculdade de Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém - PA, Brasil

Joaquim A. Nóbrega

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos - SP, Brasil

Dulcidéia C. Palheta

Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, 66077-530 Belém - PA, Brasil

Recebido em 19/11/08; aceito em 19/5/09; publicado na web em 20/10/09

DIRECT DETERMINATION OF Ca, Mg, Mn AND Zn IN BUFFALO MILK OF THE MARAJÓ ISLAND BY FAAS. This work proposes an analytical procedure for direct determination of calcium, magnesium, manganese and zinc in buffalo milk by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Samples were diluted with a solution containing 10% (v/v) of water-soluble tertiary amines (CFA-C) at pH 8. For comparison, buffalo milk samples were digested with HNO₃ and H₂O₂. According to a paired t-test, the results obtained in the determination of Ca, Mg, Mn and Zn in digested samples and in 10% (v/v) CFA-C medium were in agreement at a 95% confidence level. The developed procedure is simple, rapid, decrease the possibility of contamination and can be applied for the routine determination of Ca, Mg, Mn and Zn in buffalo milk samples without any difficulty caused by matrix constituents, such as fat content, and particle size distribution in the milk emulsion.

Keywords: buffalo milk; water-soluble tertiary amines; metals.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido no Brasil a criação de búfalos (*Bubalo Bubalis*) para produção leiteira, em decorrência das características do seu leite que permitem fácil identificação sob os pontos de vista físico-químico e organoléptico.¹

O leite de búfala é um alimento altamente nutritivo e benéfico para a saúde humana, devido ao valor biológico de seus componentes. Pronunciadas diferenças são encontradas quando comparado ao leite bovino devido à presença de uma maior porcentagem de componentes como gordura, proteína, lactose, sólidos totais, cálcio, fósforo etc.² Possui menos água que o leite bovino e o teor de gordura é mais elevado (~ 8%) comparado ao leite bovino (~ 3%). A ausência quase total de β -caroteno (pró-vitamina A) em sua gordura confere ao leite de búfala a cor branca peculiar.³

O conhecimento do valor nutritivo do leite de búfala torna-se valioso para o consumo *in natura* e para a elaboração de derivados, tais como queijos, produtos fermentados, leite em pó, manteiga, doce de leite e sorvete.⁴

Apesar do maior valor nutritivo e rendimento industrial do leite de búfala quando comparado com o leite de vacas e do crescimento de sua exploração no país, pouco se tem feito para regulamentação de normas de padrão de identidade e qualidade do leite bubalino, o que dificulta a realização de medidas de controle e fiscalização aliada à falta de padrões a serem seguidos.

Verruma *et al.*⁴ determinaram os teores de Ca, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn em amostras de leite de búfala e bovino por FAAS. As amostras de leite foram digeridas com solução nitroperclórica. Os valores obtidos para Ca e Fe no leite de búfala foram superiores aos encontrados no leite bovino, enquanto que os níveis de K, Mg, Mn, P e Zn obtidos em ambas as amostras foram similares.

Benincasa e colaboradores⁵ estudaram a composição mineral (Ba, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, Ga, K, Mn, Mo, P, Rb, S, Sr, V e Zn) de 12

leites bovinos e 6 leites de búfala usando um espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). As amostras de leites foram digeridas com ácido nítrico concentrado em um forno de micro-ondas. Os resultados obtidos para os elementos determinados por ICP-MS foram submetidos à análise estatística. Através da análise discriminante linear (LDA) foi possível diferenciar entre as amostras de leite das duas espécies estudadas.

Procedimento analítico envolvendo o preparo de amostras de leite em meio alcalino foi proposto por Stürup e Büchert.⁶ Segundo os autores, as amostras foram diluídas com uma mistura de hidróxido de potássio e hidróxido de tetrametilamônio. Cobre e iodo foram determinados por análise por injeção em fluxo (FIA) associada à espectrômetro de massa com plasma acoplado indutivamente. Outros elementos, tais como Al, As, Cr, Ni, Cd, Se e Pb, não foram determinados devido às interferências poliatômicas.

Um reagente alcalino, conhecido como CFA-C (mistura de aminas terciárias solúveis em água), foi utilizado com sucesso no preparo das amostras de leite por Nóbrega e colaboradores.⁷ As amostras foram diluídas na proporção de 0,1 g/10 mL de solução de CFA-C 10% v/v (pH = 8) ou 1,0 mL leite + 9,0 mL de solução de CFA-C 10% v/v (pH = 8) para determinação de Ca, K, Mg, Na, P e Zn por ICP OES e Al, Ba, Cu, I, Mn, Mo, Pb, Rb, Se, Sr, e Zn por ICP-MS. Após a diluição, foram obtidas suspensões límpidas e incolores para amostras de leite desnatado. O reagente CFA-C promoveu a dissociação parcial ou total das micelas de caseína e estabilização dos cátions na fase líquida. As soluções de referência foram preparadas em meio contendo CFA-C 10% v/v (pH = 8).

Aleixo e Nóbrega⁸ estudaram a determinação direta de Fe e Se em leite bovino por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS). As amostras foram diluídas 1+19 (v/v) e 1+4 (v/v) com solução CFA-C 10% v/v (pH = 8) para determinação de ferro e selênio. Segundo os autores, o reagente foi empregado para facilitar a ação do amostrador automático, evitando o acúmulo de gordura no capilar e para melhorar a repetibilidade do sinal analítico.

*e-mail: kdfernandes@ufpa.br

Recentemente, um trabalho de revisão de Nóbrega e colaboradores⁹ apontou que o reagente comercial CFA-C contém trietanolamina e trietilenotetra-amina. De acordo com esses autores, a solução de CFA-C vem sendo utilizada no preparo de amostras para dissolver e neutralizar fluoretos, e em procedimentos envolvendo extração, diluição e digestão de amostras.

Este trabalho descreve um procedimento analítico para análise direta de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite de búfala da Ilha de Marajó por FAAS usando como diluente uma solução de CFA-C 10% v/v (pH=8). Com relação aos trabalhos anteriores empregando esse mesmo reagente, a principal diferença reside no maior teor de gordura do leite de búfala, que pode causar dificuldades na introdução da emulsão por nebulização pneumática.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentos e acessórios

Um espectrômetro de absorção atômica com chama, Varian AA 220 (Mulgrave, Victoria, Austrália) equipado com corretor de fundo com lâmpada de deutério foi usado para a determinação de cálcio, magnésio, manganês e zinco.

Os parâmetros instrumentais, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) estabelecidos para a determinação de Ca, Mg, Mn e Zn por FAAS em HNO₃ 0,9 mol/L e CFA-C 10% v/v (pH= 8) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para a determinação de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite bubalino por FAAS

Parâmetro	Ca	Mg	Mn	Zn
Comprimento de onda (nm)	422,7	285,2	279,5	213,9
Corrente da lâmpada (mA)	10	4,0	5,0	5,0
Resolução espectral (nm)	0,5	0,5	0,2	0,5
LOD/ LOQ ^a	25,3/85,0	5,9/19,7	44,3/147,7	14,6/48,7
LOD/ LOQ ^b	9,3/30,9	0,12/15,6	36,8/122,5	6,1/20,3

^aµg L⁻¹; ^bHNO₃ 0,9 mol/L; ^cCFA-C 10% v/v

Na determinação de Mg, Mn e Zn foi utilizada chama ar/acetileno. Para cálcio foi usada chama acetileno/óxido nítrico.

Para a digestão das amostras foi utilizado um bloco digestor Tecnal (Modelo TE-040/25-1).

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Empregou-se água destilada-desionizada (resistividade 18,2 MΩ cm) purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Uma mistura de aminas terciárias solúveis em água denominada CFA-C (Spectrasol, Warwick, NY, EUA) foi utilizada como diluente para estabilizar as emulsões de leite durante a introdução direta das amostras.

As soluções de referência de Ca, Mg, Mn e Zn foram preparadas em meio HNO₃ 0,9 mol/L e CFA-C 10% v/v (pH = 8).

Métodos

Preparo das amostras

As amostras de leite de búfala foram coletadas na região da Ilha de Marajó no Estado do Pará. Um volume de 1,0 mL de cada amostra de leite de búfala em triplicata foi transferido para um tubo de digestão e, em seguida, foram adicionados 2,0 mL HNO₃ 14 mol/L e 1,0 mL H₂O₂ 30% (m/m). As amostras foram digeridas em bloco digestor em uma temperatura de 130 °C durante 2 h até o clareamento da solução. Após a digestão, os digeridos foram deixados na capela até resfriamento à temperatura ambiente. Depois os digeridos foram transferidos para um frasco volumétrico de 15 mL e o volume foi ajustado com água desionizada. Os brancos analíticos foram preparados pelo mesmo procedimento sem a adição da amostra.

Para determinação direta de Ca, Mg, Mn e Zn, as amostras de leite de búfala foram diluídas com a solução de CFA-C 10% v/v (pH = 8) nas proporções de 0,1 + 49,9; 0,1 + 19,9; 1 + 14 e 1 + 9 v/v, respectivamente. A concentração final de CFA-C na emulsão de leite foi 10% v/v (pH = 8).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido à complexidade da matriz do leite de búfala, os experimentos preliminares foram focalizados na possibilidade de introdução do leite no nebulizador do FAAS com a mínima diluição com solução de CFA-C 10% v/v (pH = 8). Para se estabelecer o fator de diluição adequado para a introdução das amostras de leite de búfala por nebulização pneumática em um FAAS, o procedimento de diluição das amostras foi adaptado de Nóbrega *et al.*⁷ Os experimentos com as amostras de leite de búfala mostraram que uma diluição 1+9 (v/v) foi adequada para evitar problemas no processo de nebulização. Esse fator de diluição foi adequado para a determinação de Zn, mas diluições mais elevadas foram necessárias para determinação de Ca, Mg e Mn, devido aos maiores teores desses elementos nas amostras. Para comparação, as amostras de leite de búfala foram submetidas ao procedimento convencional de digestão ácida.

Os resultados obtidos para determinação de Ca, Mg, Mn e Zn nas amostras de leite de búfala são apresentados na Tabela 2.

Os teores de cálcio foram próximos dos valores obtidos por Verruma e Salgado.¹⁰

Para magnésio, os valores obtidos foram maiores que os teores obtidos por Verruma e Salgado.¹⁰ Por outro lado, os teores determinados para manganês e zinco foram mais baixos comparados aos obtidos por esses autores.¹⁰ Isso pode estar relacionado com a individualidade, espécie, raça e alimentação dos animais; fatores que geralmente influenciam a composição do leite.¹¹

As determinações usando CFA-C foram efetuadas sem nenhum problema. Não foi observada nenhuma impregnação de partículas de gordura no nebulizador ou na câmara de nebulização, mesmo após uma sessão ininterrupta de trabalho de 8 h.

As equações das curvas analíticas obtidas para Ca, Mg, Mn e Zn em HNO₃ 0,9 mol/L foram $Q_{Ca} = 0,2059 c_{Ca} + 0,0180$ ($r = 0,9947$), $Q_{Mg} = 1,2588 c_{Mg} + 0,0286$ ($r = 0,9905$), $Q_{Mn} = 0,1545 c_{Mn} + 0,0083$ ($r = 0,9974$) e $Q_{Zn} = 0,3355 c_{Zn} - 0,0099$ ($r = 0,9929$), onde Q é a absorbância e c a concentração do analito. Para o meio CFA-C 10% v/v (pH = 8), as equações das curvas analíticas foram $Q_{Ca} = 0,2293 c_{Ca} + 0,0285$ ($r = 0,9950$), $Q_{Mg} = 1,3219 c_{Mg} - 0,0075$ ($r = 0,9986$), $Q_{Mn} = 0,1546 c_{Mn} + 0,0127$ ($r = 0,9978$) e $Q_{Zn} = 0,3465 c_{Zn} + 0,0136$ ($r = 0,9990$). As curvas analíticas obtidas experimentalmente em HNO₃ 0,9 mol/L e CFA-C 10% v/v (pH = 8) apresentaram coeficientes angulares similares.

A exatidão dos resultados analíticos obtidos para o procedimento proposto foi confirmada aplicando-se o teste t-Student pareado com

Tabela 2. Teores médios (mg/L) e respectivos desvios padrão para Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite bubalino nos meios CFA-C 10% (pH= 8) e HNO₃ 0,9 mol/L (n = 3)

Amostra	Ca		Mg		Mn		Zn	
	CFA-C	HNO ₃	CFA-C	HNO ₃	CFA-C	HNO ₃	CFA-C	HNO ₃
A1	1080 ± 52	1099 ± 35	106,3 ± 7,7	102,5 ± 3,8	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,04	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,8
A2	1015 ± 59	993 ± 90	73,8 ± 6,0	78,1 ± 5,3	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,01	3,8 ± 0,1	4,5 ± 0,2
A3	1543 ± 78	1573 ± 41	85,0 ± 8,8	89,2 ± 5,3	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,01	3,9 ± 0,1	4,2 ± 0,2
A4	1236 ± 84	1249 ± 62	72,5 ± 3,5	86,3 ± 2,0	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	3,7 ± 0,2	3,9 ± 0,5
A5	1047 ± 62	1112 ± 51	72,5 ± 2,0	70,9 ± 5,5	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02	3,7 ± 0,2	3,8 ± 0,2

nível de confiança de 95% comparado com o procedimento convencional de digestão ácida.

CONCLUSÃO

O procedimento analítico desenvolvido neste trabalho utilizando introdução de emulsões empregando solução de CFA-C 10% diminuiu acentuadamente o tempo gasto no preparo de amostras. A introdução direta da amostra evitou perdas do analito devido à retenção por resíduos insolúveis ou volatilização, menor uso de reagentes, menor produção de resíduos e diminuição dos custos analíticos.

Adicionalmente, a análise direta de emulsões por espectrometria de absorção atômica com chama pode ser implementada sem dificuldades para emulsões, uma vez que não foi observado o entupimento do capilar que conduz a amostra à câmara de nebulização.

O procedimento desenvolvido neste trabalho pode ser facilmente implementado em análises de rotina, apresenta-se mais atrativo, mais rápido e gera resultados mais confiáveis que a digestão por via úmida (digestão em meio ácido), que ainda é adotada em laboratórios de controle de qualidade de produção industrial.

AGRADECIMENTOS

À Secretaria de Estado de Desenvolvimento, Ciência e Tecnologia (SEDECT) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pelo auxílio financeiro (Projeto PPP nº 024/2008). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica (PIBIC-CNPq/2007-2008) de J. B. Pereira Jr.. Ao aluno do curso de veterinária B. B. Pinto da Universidade Federal Rural do Amazonas (UFRA) pela coleta e fornecimento das amostras de leite de búfala.

REFERÊNCIAS

1. Nader Filho, A.; Schoken-Iturrino, R. P.; Rossi Júnior, O. D.; Cavagliano, C. P. G.; *Rev. ILCT* **1984**, *39*, 25.
2. Patel, R. S.; Mistry, V.V.; *J. Dairy Sci.* **1997**, *80*, 812.
3. Hühn, S.; Ferreiro, L.; *Rev. ILCT* **1980**, *35*, 33.
4. Verruma, M. R.; Oliveira, A. J.; Salgado, J. M.; *Sci. Agric.* **1993**, *50*, 438.
5. Benincasa, C.; Lewis, J.; Sindona, G.; Tagarelli, A.; *Food Chem.* **2008**, *110*, 257.
6. Stürup, S.; Büchert, A.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1996**, *354*, 323.
7. Nóbrega, J. A.; Gélinas, Y.; Krushevska, A.; Barnes, R. M.; *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, *12*, 1243.
8. Aleixo, P. C.; Nóbrega, J. A.; *Food Chem.* **2003**, *83*, 457.
9. Nóbrega, J. A.; Santos, M. C.; de Sousa, R. A.; Cadore, S.; Barnes, R. M.; Tatro, M.; *Spectrochim. Acta Part B* **2006**, *61*, 465.
10. Verruma, M. R.; Salgado, J. M.; *Sci. Agric.* **1994**, *51*, 131.
11. Sá, E.; *Revista Leite & Derivados* **2004**, *81*, 67.