UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

BIANCA DE CÁSSIA MOREIRA

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO E MAGNÉSIO EM LEITE DE MANEJO ORGÂNICO E CONVENCIONAL POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA COM CHAMA (F AES) E ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (F AAS)

JUIZ DE FORA – MG
2023

Bianca de Cássia Moreira

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO E MAGNÉSIO EM LEITE DE MANEJO ORGÂNICO E CONVENCIONAL POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA COM CHAMA (F AES) E ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (F AAS)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Fabiano Freire Costa

Juiz de Fora – MG

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Moreira, Bianca de Cássia.
Desenvolvimento de Método de Preparo de Amostras para Determinação de Sódio, Potássio, Cálcio e Magnésio em Leite De Manejo Orgânico e Convencional por Espectrometria de Emissão Atômica com Chama (F AES) e Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS) / Bianca de Cássia Moreira. -- 2023.
76 f. : il.

Orientador: Rafael Arromba de Sousa
Coorientador: Fabiano Freire Costa
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

1. Chapa de aquecimento. 2. Digestão ácida. 3. Leite orgânico. 4. Minerais. I. Sousa, Rafael Arromba de , orient. II. Costa, Fabiano Freire, coorient. III. Título.

Bianca de Cássia Moreira

Desenvolvimento de Método de Preparo de Amostras para Determinação de Sódio, Potássio, Cálcio e Magnésio em Leite de Manejo Orgânico e Convencional por Espectrometria de Emissão Atômica com Chama (F AES) e Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS)

Dissertação apresentada Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química

Aprovada em 28 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Fabiano Freire Costa - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Mirian Cristina dos Santos
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Renato Camargo Matos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 12/09/2023.

Documento assinado eletronicamente por **Rafael Arromba de Sousa**, **Professor(a)**, em 28/09/2023, às 15:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Fabiano Freire Costa**, **Professor(a)**, em 28/09/2023, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Renato Camargo Matos**, **Professor(a)**, em 28/09/2023, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Mirian Cristina dos Santos**, **Usuário Externo**, em 17/10/2023, às 14:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1464927** e o código CRC **DEF478E4**.

Dedico este trabalho aos três amores da minha vida, Mamãe, Papai e a minha irmã Rafa. E de maneira muito especial, ao meu eterno amigo Gabriel (*In memoriam*), que sempre estará vivo em meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por esta incrível experiência que é viver, aprender e se transformar.

Ao universo por ser inacreditável e fazer as coisas acontecerem no momento exato.

Ao meu pai Adilson, por ser minha fortaleza, acreditar em mim, me apoiar e sonhar meu sonho, não medindo esforços para realizá-los faça chuva ou faça sol.

A minha mãe Rogéria, por me apoiar, incentivar, torcer e rezar por mim, por acreditar no meu potencial e, mesmo com medo, me deixar ser quem sou e me deixar ser livre para escolher.

A minha irmã Rafaela, por ser minha maior incentivadora e acreditar em mim mesmo quando eu desacredito, por me ensinar, me apoiar, confiar em mim e me ajudar quando mais preciso.

Ao professor Rafael Arromba de Sousa, por ter aceitado traçar essa trajetória como meu orientador e ao professor Fabiano Freire Costa por aceitar fazer parte desta jornada como meu coorientador. Sou muito grata a vocês por todo incentivo, paciência, dedicação, amizade, e principalmente pelos ensinamentos que transcendem a área acadêmica e profissional e alcançam minha formação humana. Sem vocês nada disso seria possível, muito obrigada!

Ao Pedro Pereira, por não ser só meu IC, mas ter se tornado um grande amigo que deixou meus dias mais leves e fáceis. Sem você eu não teria conseguido! Gratidão!

Ao professor Renato Camargo Matos e as professoras Vanessa Aglaê Martins Teodoro e Mirian Cristina dos Santos por aceitarem compor a banca e colaborarem tanto para minha formação.

A Fernanda Samarini e a Embrapa pela doação das amostras de leite orgânico.

Ao Vilquer, Matheus, Donizete e ao Ique pela doação das amostras de leite convencional.

A Adrise, por ser a melhor companheira dessa jornada em JF, ouvir meus lamentos e não surtar com meus surtos. Você foi indispensável para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao Estevão por toda paciência em me ouvir, me ver surtar e me acalmar. Por entender minhas ausências, meu mau humor e ainda sim nunca deixar de se fazer presente.

Ao Marcelinho, a Vivi e ao Léo, por todas as manhãs e tardes de café, prosa e amizade, que melhoravam 100% meus dias.

Ao Garra cursinho popular, por me proporcionar grandes amigos e uma grande experiência durante essa jornada.

Ao Pedro Ignácio, por ter se tornado um grande amigo e ter sido tão solícito, me ajudando sempre que precisei.

A Regina e a Dona Gleusa pelas manhãs de café, risos e fofocas.

Aos meus colegas do laboratório de orgânica e do NUPIS que fizeram meus dias mais alegres e divertidos, e além disso colaboraram com meu trabalho.

Aos professores Júlio e Lílian pelo compartilhamento do laboratório, ótimas sugestões para meu trabalho e também pela amizade.

As técnicas de laboratório Sabrina e Taciana pelas vidrarias emprestadas, por sempre serem tão solícitas e por nossas conversas.

Aos amigos aqui feitos, obrigada por tudo, vocês fizeram os dias serem mais leves.

Aos amigos de longa data, obrigada pela amizade, por me incentivarem a estar aqui e simplesmente serem os melhores amigos que alguém pode ter.

A todos os professores do PPG química UFJF que tive o prazer de ser aluna, muito obrigada, vocês foram essenciais para minha formação.

A UFJF pelo apoio financeiro, infraestrutura e pela oportunidade incrível.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização deste trabalho e fizeram parte desta jornada.

A todos encontros e desencontros que a vida segue me proporcionando, a todos os amigos feitos, os lugares conhecidos, as lembranças criadas e o conhecimento construído. A tudo aquilo que faz a vida ser tão incrível e que me faz acreditar que nada é por acaso e é por isso que cheguei até aqui e enfim me tornei mestre. A tudo isso, meu muito obrigada!

“Esse é o ciclo da ciência: estudar, aprender, errar, aprender mais, errar, aprender mais ainda, ensinar. Sigamos evoluindo!” (Von Hohendorff, 2014, p.54).

RESUMO

No presente estudo foi desenvolvido um método para a determinação dos macrominerais Na, K, Ca e Mg em diferentes tipos de leite (cru, UHT, pasteurizado e em pó), provenientes de manejo orgânico e convencional, empregando as técnicas de Espectrometria de Emissão Atômica com Chama (F AES) e Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS). O método foi otimizado para a análise dos analitos em amostras líquidas e em pó, demonstrando desvios padrões abaixo de 4% e alta exatidão, com recuperações entre 95% e 103%, ou seja, não apresentou efeitos significativos de matriz. Além disso, foram obtidos limites de quantificação inferiores às concentrações minerais presentes nas amostras, situando-se entre 306 e 782 mg kg^{-1} para Na e K (determinados por F AES), e entre 2 e 246 mg kg^{-1} para Ca e Mg (determinados por F AAS). Posteriormente, o método desenvolvido foi aplicado na análise desses minerais em leite cru orgânico de diversas fazendas certificadas na região sudeste do Brasil, assim como em leite convencional proveniente de fazendas convencionais situadas em Minas Gerais. As concentrações médias encontradas para o leite orgânico foram de 390 mg kg^{-1} para Na, 1.099 mg kg^{-1} para K, 1.076 mg kg^{-1} para Ca e 76 mg kg^{-1} para Mg, enquanto para o leite convencional foram de 420 mg kg^{-1} para Na, 1.161 mg kg^{-1} para K, 888 mg kg^{-1} para Ca e 79 mg kg^{-1} para Mg. Esses valores variaram de acordo com os diferentes sistemas de manejo, influenciados por fatores intrínsecos e extrínsecos associados a produção de leite nas fazendas. Entretanto, em ambos os casos, as concentrações estão em conformidade com os dados encontrados na literatura. Portanto, conclui-se que o método estabelecido é adequado para a monitorização dos macrominerais Na, K, Ca e Mg em leite convencional e orgânico. Além disso, demonstrou-se eficaz na determinação desses minerais em diferentes formas de leite comercializado (cru, UHT, pasteurizado e em pó). Essa capacidade de análise permite sua utilização em estudos voltados para a caracterização mineral do leite orgânico no Brasil, bem como na avaliação da composição mineral do leite convencional e orgânico.

Palavras-chave: Chapa de aquecimento. Digestão ácida. Leite orgânico. Minerais.

ABSTRACT

In this study a method was developed for the determination of the macrominerals Na, K, Ca and Mg in different types of milk (raw, UHT, pasteurized and powdered), from organic and conventional management, using the techniques of Flame Atomic Emission Spectrometry (F AES) and Flame Atomic Absorption Spectrometry (F AAS). The analytical method was optimized for the analysis of the analytes in liquid and powder samples, presenting a precision better than 4% and high accuracy, with recoveries between 95 and 103%. This latter indicated there is no significant matrix effects under established conditions. In addition, lower quantification limits were obtained in relation to the mineral concentrations in the samples: 306 and 782 mg kg^{-1} for Na and K (analyzed by F AES), and 2 and 246 mg kg^{-1} for Ca and Mg (determined via F AAS). The method was applied to the analysis of these minerals in organic raw milk from various certified farms in the southeast of Brazil, as well as in conventional milk from conventional farms located in Minas Gerais. The average concentrations found for organic milk were 390 mg kg^{-1} for Na, 1,099 mg kg^{-1} for K, 1,076 mg kg^{-1} for Ca and 76 mg kg^{-1} for Mg, while for conventional milk they were 420 mg kg^{-1} for Na, 1,161 mg kg^{-1} for K, 888 mg kg^{-1} for Ca and 79 mg kg^{-1} for Mg. These values varied according to the different management systems, influenced by intrinsic and extrinsic factors associated with milk production on the farms. However, in both cases the concentrations are in agreement with data found in the literature. Therefore, it can be concluded that the established method is suitable for monitoring the macrominerals Na, K, Ca and Mg in conventional and organic milk. In addition, it proved to be effective in determining these minerals in different forms of marketed milk (raw, UHT, pasteurized and powdered). These analytical characteristics allow the method to be used to evaluate the mineral composition of conventional and organic milk produced in Brazil.

Keywords: Heating plate. Acid digestion. Minerals. Organic milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa com a localização das Fazendas onde as amostras foram coletadas: a) Leite Orgânico; b) Leite Convencional 32
Figura 2 – Amostra congelada e armazenada em placa de Petri previamente a liofilização 34
Figura 3 - Sistema de refluxo utilizado para digestão em chapa de aquecimento 36
Figura 4 - Otimização dos parâmetros a) Vazão de C_2H_2 e b) Altura do queimador para determinação de Ca por F AAS 40
Figura 5 - Otimização dos parâmetros a) Vazão de C_2H_2 e b) Altura do queimador para determinação de Mg 40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação das curvas de adição de padrão e curvas de calibração externa no branco de reagentes para o Na 51
Gráfico 2 - Comparação das curvas de adição de padrão e curvas de calibração externa no branco de reagentes para o K 51
Gráfico 3 - Comparação das curvas de adição de padrão e curvas de calibração externa no branco de reagentes para o Ca 56
Gráfico 4 - Comparação das curvas de adição de padrão e curvas de calibração externa no branco de reagentes para o Mg 57
Gráfico 5 - Concentração de Ca e Mg em diferentes tipos de leite 61
Gráfico 6 - Comparação das médias das concentrações totais de Na, K, Ca e Mg em leite cru convencional e orgânico 64
Gráfico 7 - Variação dos teores de Na, K, Ca e Mg entre amostras de leite orgânico cru 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição aproximada dos minerais (mg/100 mL) entre as fases solúvel e coloidal do leite de vaca fresco (pH = 6,8).....20
Tabela 2 - Composição físico-química do leite cru.....22
Tabela 3 - Classificação do leite a partir do teor de gordura.....22
Tabela 4 - Parâmetros Instrumentais para determinação de Ca e Mg por F AAS, conforme otimização e recomendações dos fabricantes dos equipamentos 41
Tabela 5 - Valores médios de Concentração de Na K em amostras de leite UHT liofilizado após digestão com diferentes misturas e proporções de reagente.....48
Tabela 6 - Recuperações obtidas por meio dos diferentes métodos de calibração em amostras de leite liofilizado. 49
Tabela 7 - Resultados estatísticos para análise de regressão linear referente as curvas de Na e K 50
Tabela 8 - LOD e LOQ instrumentais e do método para os analitos Na e K calculado a partir da Estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica.....52
Tabela 9 - LOD e LOQ instrumentais e do método para os analitos Na e K calculados a partir do desvio padrão da leitura do branco dez vezes.....52
Tabela 10 - Valores de recuperação para os testes de adição e recuperação em amostras de leite orgânico 53
Tabela 11 - Erro relativo e concentrações de Na e K obtidas para a CRM 1549.....54
Tabela 12 - Resultados estatísticos para análise de regressão linear referente às curvas analíticas de Mg e Ca.....55
Tabela 13 - LOD e LOQ instrumental e do método para a determinação de Mg e Ca por F AAS 58
Tabela 14 - Valores de recuperação para Ca e Mg em amostras de leite submetidas ao preparo de amostras 59
Tabela 15 - Comparação entre as concentrações de cálcio em leites em pó comerciais analisadas 62
Tabela 16 - Concentração de Na, K, Ca e Mg em leite cru convencional.....63
Tabela 17 - Concentrações de Na, K, Ca e Mg em leite cru orgânico 63
Tabela 19 - Concentração de Na, K, Ca e Mg em leite orgânico de diferentes países.....66
Tabela 20 - Caracterização da composição centesimal das amostras de leite orgânico cru.....67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Identificação das amostras obtidas 33
Quadro 2 - Reagentes e proporções utilizados nos testes iniciais para digestão em chapa de aquecimento 37
Quadro 3 - Volume de reagentes gastos e presença de partículas não decompostas nos digeridos após digestão em chapa de aquecimento utilizando diferentes procedimentos (testes) 45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REFERENCIAL TEÓRICO 18
2.1 LEITE: IMPORTÂNCIA SOCIAL E ECONÔMICA 18
2.2 A BIOSSÍNTESE DO LEITE 18
2.3 TIPOS DE LEITE 21
2.4 MANEJO DO GADO LEITEIRO: CONVENCIONAL *versus* ORGÂNICO 23
2.5 PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DE LEITE 25
2.6 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA 27
3 OBJETIVOS 30
3.1 OBJETIVO GERAL 30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30
4 PARTE EXPERIMENTAL 31
4.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS 31
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES 31
4.3 AMOSTRAGEM 32
4.3.1 Armazenamento das amostras 34
4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS 35
4.4.1 Pré-tratamento das amostras 35
4.4.2 Digestão das amostras 35
4.4.2.1 Digestão das amostras em chapa de aquecimento 36
4.4.2.2 Digestão das amostras em bloco digestor 37
4.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO 38
4.5.1 Espectrometria de Emissão Atômica em Chama 38
4.5.2 Condições Experimentais do Método 38
4.6 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO 39
4.6.1 Espectrometria de Absorção Atômica em Chama 39
4.6.2 Determinação de Ca e Mg nas partículas sólidas não decompostas pela digestão ácida 41
4.7 ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO 41

4.8 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITE CRU ORGÂNICO 43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
5.1 PREPARO DE AMOSTRAS 45
5.1.2 Digestão das amostras em chapa de aquecimento 45
5.1.2.1 Digestão das amostras em bloco digestor 46
5.2 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO MÉTODO 47
5.3 ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO 48
5.4 ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO MAGNÉSIO 55
5.5 DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO NAS PARTÍCULAS SÓLIDAS NÃO DECOMPOSTAS PELA DIGESTÃO ÁCIDA 59
5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO 60
5.6.1 Determinação de Ca e Mg em diferentes tipos de leite 60
5.6.2 Determinação de Na, K, Ca e Mg em leite cru orgânico e convencional 62
5.7 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITE CRU ORGÂNICO 66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

1 INTRODUÇÃO

O leite é um importante produto para economia brasileira, pois sua produção gera renda para a agricultura familiar e também para pequenos, médios e grandes produtores, além de colaborar significativamente com o produto interno bruto (PIB) nacional (Brasil, 2022). Ele é um alimento derivado da combinação de cerca de 87% de água e 13% de elementos sólidos, sendo os principais: lipídios (gordura), carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais (González; Campos, 2003), os quais são essenciais para saúde humana (Amancio *et al.*, 2015).

Os nutrientes minerais representam cerca de 0,8% dos componentes do leite, dentre os principais estão íons de cálcio, sódio, potássio e magnésio. Eles estão associados à formação e manutenção de ossos e dentes, comunicação entre as células nervosas, regulação das funções nervosas; contrações dos músculos, dentre várias outras funções (Schieferdecker; Thieme; Hauschild, 2016). Sua composição sofre influência de diversos fatores como espécie, raça, individualidade bioquímica do animal, idade, estágio e número de lactações, alimentação, condições ambientais, estresse, estação do ano, tipo de manejo e muitos outros aspectos (Rosa *et al.*, 2017).

Dentre os principais tipos de manejos estão o convencional e o orgânico. O manejo convencional apresenta como principais características a criação do gado em sistema aberto e/ou fechado, a utilização de agroquímicos na plantação para alimentação do gado, uso de rações industriais, medicamentos, dentre outros (Miranda; Diniz; Andreoli, 2008; Bratz, 2016). Já o manejo orgânico, por ser voltado para a sustentabilidade, não permite o uso de insumos externos à alimentação do gado ou o uso de produtos industriais, busca a utilização de compostos que não causem danos à saúde do animal, ao ser humano e ao meio ambiente; além do gado ter que ser criado em regime livre uma parte do dia (Brasil, 2021).

Cada vez mais o consumo de produtos orgânicos, assim como o de leite sob este tipo de manejo tem aumentado, mesmo seu preço sendo maior do que o do leite convencional, isso pode estar associado a uma combinação de preocupações com a saúde pessoal, qualidade nutricional, sabor autêntico e bem-estar animal (Aryal *et al.*, 2009; Bloksma *et al.*, 2008). Logo, com o aumento do consumo de produtos orgânicos em todo mundo, é necessário entender se realmente há diferença significativa entre a composição destes alimentos e daqueles produzidos de modo convencional.

Para isto, desenvolver um método para determinar e avaliar a composição de minerais como o sódio, potássio, cálcio e magnésio em leite orgânico e também convencional se torna

necessário e, até mesmo, estratégico, uma vez que na literatura não há um consenso sobre um método para determinação destes elementos em leite, principalmente no que se refere ao preparo das amostras (Kira, 2002; Ribeiro *et al*., 2003; Rey Crespo; Miranda; López- Alonso, 2013; Oreste *et al*., 2016; Zwierzchowski; Ametaj, 2019).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção serão apresentadas as principais informações técnico-científicas que contextualizam e embasam este trabalho.

2.1 LEITE: IMPORTÂNCIA SOCIAL E ECONÔMICA

Um setor econômico e social significativo para o Brasil é o da produção de leite e seus derivados. A produção do leite ocorre em 98% dos municípios do país, em 1 milhão de propriedades, com predominância das pequenas e médias, que juntas, são capazes de produzir mais de 34 bilhões de litros de leite por ano, o que faz do Brasil o terceiro maior produtor mundial deste produto (Brasil, 2022).

Além disso, o leite está entre os dez produtos mais importantes do agronegócio para o PIB do país, gerando renda para milhões de brasileiros em toda a cadeia produtiva, sendo extremamente importante social e economicamente para o Brasil (Brasil, 2022). Esta importância se dá, pois além de ser um alimento que pode ser consumido em sua forma própria, ele também é utilizado como matéria-prima de inúmeros produtos que estão no mercado, como: queijos, iogurtes, bebidas lácteas, leite condensado, doce de leite, creme de leite, manteiga, dentre vários outros (Rossi *et al*., 2018).

Outro fator importante que colabora com seu consumo, relevância econômica e social é que sua ingestão é recomendada como forma de auxiliar no cumprimento das necessidades diárias de cálcio e proteínas, visando contribuir para a manutenção da saúde (Amancio, 2015). Isso porque ele é composto por hormônios, imunoglobulinas, citocinas, poliaminas, enzimas e peptídeos que apresentam benefícios à saúde (Pereira, 2014), além de ter impacto positivo no crescimento e manutenção da matriz óssea (FAO, 2013).

2.2 A BIOSSÍNTESE DO LEITE

A secreção do leite na vaca é um processo controlado por vários hormônios e estímulos físicos. Após o parto, a prolactina (hormônio responsável pela manutenção da lactação e da viabilidade de células secretoras de leite nos bovinos) é liberada, estimulando a produção do leite nas células secretoras, sendo armazenado nos alvéolos mamários. O processo de produção de leite dentro da vaca envolve diversas reações bioquímicas. Quando a vaca é ordenhada,

estímulos são enviados para o sistema nervoso central e, posteriormente, para a hipófise, a qual libera a oxitocina, que desencadeia o reflexo da ordenha. A oxitocina provoca a contração das células mioepiteliais que envolvem os alvéolos mamários, empurrando o leite para os ductos mamários e, finalmente, para fora do teto (Wattiaux, 2014a).

No nível fisiológico, a síntese de cada componente do leite ocorre de maneira independente. A gordura, por exemplo, tem como precursores a glicose, o acetato, o butirato e os triglicerídeos. O acetato e o butirato são produzidos no rúmen e utilizados como blocos construtores de cadeia curta de ácidos graxos. Já os triglicerídeos são formados por meio da união de três ácidos graxos, em virtude do glicerol vindo da glicose, sendo sintetizados nas células epiteliais mamárias (Wattiaux, 2014b).

Já as proteínas, estas podem ser divididas em dois grupos: as caseínas e as proteínas do soro. As primeiras são produzidas a partir de aminoácidos originários do sangue e antes de serem liberadas no lúmen são organizadas em grandes micelas. As proteínas do soro, por sua vez, são sintetizadas pelo sistema imune, sendo originárias do sangue e migrando para o leite (Wattiaux, 2014b).

A lactose é formada pela união entre uma molécula de glicose e outra de galactose, sendo que esta união é catalisada pela enzima lactose-sintetase. Ela é considerada o principal carboidrato do leite e é responsável pelo seu fator osmótico, pois quando é sintetizada ela atrai a água para as células epiteliais mamárias (González; Campos, 2003).

As vitaminas do leite são sintetizadas pelas bactérias do rúmen, pois não podem ser produzidas pelas glândulas mamárias, desse modo elas podem ser originadas pelas fontes alimentares ou convertidas por precursores no fígado, intestino delgado ou na pele (Moraes, 2016). Os minerais, por outro lado, não são sintetizados por organismos vivos, mas são transferidos do sangue para o leite. Além disso, vale ressaltar que as concentrações minerais no sangue e as proporções de transferência para o leite são desconhecidas, mas acredita-se que possa haver a seletividade na sua captação, retornando para o sangue o que não foi selecionado (Park, Lindberg, 2006).

Os elementos minerais em maior quantidade no leite são potássio, cálcio, cloro e fósforo, porém, nem todos eles se encontram em sua forma solúvel, estando também na forma coloidal. Cálcio e fósforo são os mais abundantes na fase coloidal, os demais elementos presentes em maior quantidade estão distribuídos entre as duas fases (Ordónez *et al.*, 2004). Na Tabela 1 é possível observar a distribuição dos minerais presentes nas diferentes fases do leite.

Tabela 1 - Distribuição aproximada dos minerais (mg/100 mL) entre as fases solúvel e coloidal do leite de vaca fresco (pH = 6,8)

Minerais	Total	Fase solúvel	Fase coloidal
Sódio	50	45 (92%)	4 (8%)
Potássio	145	133(92%)	12 (8%)
Cálcio Ionizado	120	40 (33%) 12 (100%)	80 (67%)
Magnésio	13	9 (67%)	4 (33%)
Fósforo	95	41 (43%)	54 (57%)
Cloretos	100	100 (100%)	
Sulfatos	10	10 (100%)	
Citratos	175	164 (94%)	11 (6%)

Fonte: Adaptado de Ordónez *et al.* (2004).

Os principais minerais encontrados no leite de vaca são cálcio, fósforo, magnésio, potássio e sódio, os quais são denominados macrominerais e considerados essenciais à saúde, visto que são capazes de colaborar com a necessidade das doses diárias de minerais recomendadas de ingestão para o ser humano (Zwierzchowski; Ametaj, 2019; Vahčić, 2010; Pietrzak-Fieniako; Kamelska-Sadowska, 2020). Essas doses são, em média: Cálcio 1.300 mg/dia, Magnésio 320 mg/dia, Sódio 1.500 mg/dia e Potássio 3.000 mg/dia (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2009).

Esta necessidade de ingestão diária é devido a função que estes minerais desempenham em nosso corpo. O potássio é considerado essencial para saúde porque atua como um eletrólito no corpo humano, regulando a pressão osmótica das células, equilibrando a água e a acidez do sangue. Ele também é necessário para o funcionamento normal dos nervos, músculos e metabolização de proteínas e carboidratos. Sua ausência no organismo pode gerar fadiga, reflexos lentos, fraqueza muscular e pele seca (Schieferdecker; Thieme; Hauschild, 2016; Belitz; Grosh; Schiberle, 2004).

O cálcio é considerado essencial porque além de exercer funções como formação e manutenção da estrutura óssea e dentária, também atua no sistema nervoso como sinalizador, controlando canais de sódio e a secreção de neurotransmissores (Schieferdecker; Thieme; Hauschild, 2016). Ele colabora com o funcionamento correto do cérebro, nervos, os músculos

e o coração, além disso, ele tem sido associado à prevenção da osteoporose, câncer intestinal e hipertensão (Belitz; Grosh; Schiberle, 2004; Marenjak; Poljičak-Milas; Delaš, 2006).

A concentração de sódio no leite é quase toda solúvel, sendo também um elemento mineral bastante importante no organismo humano. Atua na comunicação entre as células nervosas, além de desencadear contrações musculares, regular a pressão arterial, participar do transporte de nutrientes para o intestino delgado e rins e na manutenção do equilíbrio ácido-base (Schieferdecker; Thieme; Hauschild, 2016).

Por fim, o magnésio também merece destaque. Em sua maioria, na forma solúvel, é importante para a metabolização da glicose e também em outros processos de produção de energia, na formação dos ossos, na síntese do DNA e RNA. Além disso, colabora na recuperação celular e combate a radicais livres (Schieferdecker; Thieme; Hauschild, 2016). Sua deficiência altera o metabolismo do cálcio e também o hormônio regulador de cálcio (Lukaski, 2004).

É importante citar que a concentração desses minerais no leite pode variar de acordo com vários aspectos, principalmente a alimentação do gado leiteiro, devido a forma como os minerais são transferidos para o leite (Zwierzchowski; Ametaj, 2019; Fišera *et al.*, 2018). Em um estudo realizado com leite de éguas foi comprovado que o leite daquelas alimentadas com uma forragem de alta qualidade manteve a composição de cálcio, sódio e magnésio em uma quantidade 1,5 a 2 vezes maior do que o leite das éguas alimentadas a pasto e com uma ração de baixa qualidade (Fišera *et al.,* 2018). Em outro estudo, analisando a concentração de cálcio, magnésio, potássio, fósforo e sódio do leite de vacas de uma província no Canadá, comprovou-se que, em média, obtinha-se maiores concentrações desses minerais no leite deste local que no restante do mundo (Zwierzchowski; Ametaj, 2019).

2.3 TIPOS DE LEITE

O leite pode ser classificado de diversas formas, levando em consideração diferentes critérios, como por exemplo conteúdo de sólidos, teor de gordura e tratamento térmico. Assim, o leite cru fluido - aquele obtido diretamente das glândulas mamárias das vacas – pode passar por diferentes processos, sendo capaz de gerar os diferentes tipos de leites (Medeiros, 2018).

De acordo com a Instrução Normativa 76 (Brasil, 2018a), o leite cru deve ter a composição físico-química apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição físico-química do leite cru

Parâmetros físico-químicos de leite	Limites e características
Gordura	≥3,0 g/100 g
Proteína	≥2,9 g/100 g
Lactose	≥ 4,3 g/100 g
ESD*	8,4 g/100 g.
EST**	11,4 g/100 g

*Extrato seco desengordurado. **Extrato seco total.
Fonte: Adaptado de Brasil (2018a).

A composição do leite cru pode sofrer alteração, principalmente o percentual de seus componentes (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e extrato seco), isso se deve a fatores intrínsecos, como a espécie e genética dos animais, condições ambientais e sazonais, estágio de lactação, fatores nutricionais, patológicos e até mesmo o manejo ao qual as vacas são submetidas (Leira *et al.*, 2018).

Logo, para ser comercializado, este leite cru é submetido a diferentes processos para padronizá-lo e/ou garantir sua segurança alimentar e nutricional. O processo de desnate é um deles. Ele é feito com o intuito de realizar a remoção do creme presente no leite, de maneira parcial ou total. Essa prática é realizada para obter leite desnatado, padronizar a quantidade de gordura no leite integral e para a obtenção do creme do leite. Assim, o leite é classificado de acordo com seu teor de gordura, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação do leite a partir do teor de gordura

Tipo de leite	Porcentagem de gordura
Integral	≥ 3% m/m
Semidesnatado	0,6 a 2,9% m/m
Desnatado	≤ 0,5% m/m

Fonte: Adaptado de Brasil (2018a).

A classificação do leite também pode ser feita de acordo com o tratamento térmico ao qual ele é submetido. De maneira geral, o tratamento térmico garante a segurança alimentar do leite, eliminando bactérias patogênicas e microrganismos deteriorantes, além disso, ajuda a preservar nutrientes e prolonga a vida útil do produto (Brasil, 2018a). Os processos de

tratamento térmico mais comuns aos quais o leite é submetido são a pasteurização e o tratamento à temperatura ultra alta (UHT).

A pasteurização pode ser rápida, o leite é aquecido a 72 °C por 15 segundos; ou a lenta, ele é aquecido a 65 °C por 30 minutos (Mulinari; Rosolen; Adami, 2017). Já no tratamento UHT, o leite é submetido a temperaturas contínuas de 130 °C a 150 °C, de 2 a 4 segundos e, em seguida, é resfriado a 32 °C. Logo após, ele é envasado assepticamente em recipientes especiais de papelão (por exemplo, Tetra Pak®) e depois fechado com calor, permanecendo em condições aceitáveis vários meses, sem necessitar de refrigeração (Vidal-Martins; Rossi Júnior; Rezende-Lago, 2005). É importante ressaltar que tanto o leite pasteurizado, quanto o UHT podem ser integrais, semidesnatados ou desnatados (Brasil, 2018a).

Por fim, o leite em pó, o qual é obtido por desidratação do leite de vaca, sendo também classificado de acordo com seu teor de gordura, integral (com 26% ou mais de gordura), parcialmente desnatado (com mais de 1,5% e menos de 26% de gordura) e desnatado (com menos de 1,5% de gordura) (Brasil, 2018b).

2.4 MANEJO DO GADO LEITEIRO: CONVENCIONAL *versus* ORGÂNICO

O manejo do gado é de extrema importância para a garantia da saúde animal e da produção de leite de qualidade. Para isso, a dieta deve ser balanceada, adequada às condições de criação e os cuidados com o bem-estar animal devem ser aplicados. Tudo isso porque a produção de leite é reflexo direto da alimentação e da maneira como o gado é tratado (Netto; Brito; Figueiró, 2006). Dessa forma, o manejo racional, valorizando o animal, é essencial para a obtenção de leite (Miranda; Diniz; Andreoli, 2008).

Atualmente, os tipos de manejo são variados, podendo o gado ser criado em um sistema aberto, confinado, ou até em ambos, variando de acordo com a raça, o espaço disponível e o tipo de manejo escolhido pelo produtor. No manejo convencional o gado pode ser criado tanto confinado quanto em sistema aberto, podendo ter uma mistura de ambos, sem limitações (Miranda; Diniz; Andreoli, 2008). Geralmente, neste tipo de manejo onde a agricultura convencional é utilizada, há uso de insumos externos à plantação de alimentação do gado, como fertilizantes ou outros agroquímicos. Esse fator pode gerar a presença de diferentes tipos de resíduos químicos no leite. Além disso, utiliza-se medicamentos diversos, rações industrializadas, além de ser permitido o uso de ureia na alimentação. Em resumo, o foco neste

tipo de manejo é a produção leiteira, sem considerar as questões de sustentabilidade (Bratz, 2016).

No manejo orgânico, o bem-estar animal é uma das principais preocupações, sendo extremamente valorizado. Este tipo de manejo é mais benéfico para os animais e também para as questões ambientais, do que o manejo convencional (Nicholas *et al.,* 2004). Ele é voltado para a sustentabilidade, sem a utilização de agroquímicos, sendo permitida somente a utilização de alimentos cultivados na própria propriedade de produção ou em outras sob manejo orgânico. Para o cultivo desses alimentos é permitido o uso de compostos que auxiliem na produção, e que não causem danos à saúde e ao meio ambiente, como alguns biofertilizantes, adubo verde, algas marinhas provenientes de produção legalizada, fosfato de rochas, dentre vários outros, conforme apresentado na Portaria nº 52, de 15 de março de 2021 (Brasil, 2021).

A suplementação alimentar com minerais e vitaminas não pode conter resíduos de contaminantes acima do permitido pela legislação específica. Também não são permitidos o uso de suplementos e compostos nitrogenados não-protéicos e nitrogênio sintético na alimentação. O gado deve ser criado, preferencialmente, em total regime livre. Mas, caso não seja possível, deve haver a possibilidade de que ele saia para área externa com forragem verde por um período mínimo de seis horas, durante o dia (Brasil, 2021).

Logo, no manejo orgânico a alimentação do gado ocorre, na maior parte do tempo, em pastagens, no qual, a composição e seu valor nutricional, incluindo a quantidade de elementos minerais, são muito influenciadas pelo estágio de crescimento da planta e podem mudar significativamente em períodos relativamente curtos. Assim, é difícil manter um aumento contínuo da produção de leite com base na alimentação em pasto, mesmo quando a qualidade da pastagem é alta e as condições do solo e da água são adequadas para sua produção (Gabryszuk *et al*., 2010; Sakowski *et al.,* 2015).

Isto gera um desânimo da parte dos produtores, para aderir a este tipo de manejo. No Brasil por exemplo, sua produção acontece em poucas unidades. Até 2022, existiam apenas 144 produtores de leite orgânico, em 89 unidades de produção (Souza *et al*., 2022). Além disso, quando comparadas ao leite de manejo convencional, há uma grande carência de estudos sobre a composição deste alimento no Brasil.

Logo, enquanto alguns países apresentam a caracterização mineral do leite orgânico e avaliam as diferenças entre a composição mineral deste e do leite convencional (Gabryszuk; Słoniewski; Sakowsk, 2008; Rey-Crespo; Miranda; López-Alonso, 2013; Zwierzchowski; Ametaj, 2019; Qin *et al*., 2021), no Brasil ainda não há estudos conhecidos sobre estes

componentes no leite orgânico. Visto isso, é necessário que haja um método confiável que possibilite a caracterização mineral do leite orgânico e convencional no país e uma avaliação crítica dos teores de seus constituintes minerais.

2.5 PREPARO DE AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DE LEITE

O preparo de amostras para a determinação da composição mineral de uma matriz pode ser feito através das vias úmida ou seca, sendo que a escolha dependerá do tipo de amostra e do objetivo pretendido (Krug; Rocha, 2019).

A metodologia utilizando a via seca consiste na decomposição dos materiais inorgânicos em altas temperaturas e pressão ambiente ou na decomposição de materiais orgânicos pela combustão da amostra na presença do oxigênio do ar, como agente oxidante (Sousa; Campos; Orlando, 2015). Esta metodologia tem como vantagem a facilidade no preparo, exigindo pouco tempo de atenção do operador e a não necessidade de emprego de reagentes durante o processo, somente para dissolução da amostra obtida. Em contrapartida, são necessárias muitas horas até o preparo de amostras ser concluído, pois a amostra permanece na mufla, por exemplo, até a sua completa combustão. Além disso, neste tipo de preparo pode haver a perda de minerais juntamente com a matéria orgânica (na forma de aerossol sólido) e maior probabilidade de contaminação da amostra (Kira, 2002).

Já o preparo de amostras por via úmida, este pode ser feito de várias maneiras e as suas condições operacionais podem ser controladas e monitoradas mais facilmente. O método escolhido dependerá dos objetivos e do tipo de análise que será realizada para a determinação dos minerais. Este tipo de preparo é muito utilizado para determinação de minerais em matrizes de leite e se baseia na decomposição da matéria orgânica por ácidos e/ou reagentes oxidantes, podendo ser combinados ou não (Amaro-López, 1996). Dentre os principais métodos utilizados para preparo de amostras por via úmida, pode-se citar a digestão ácida com aquecimento por convecção (blocos digestores, chamas ou fornos convencionais) e por micro-ondas (Nogueira, 2003).

Para este tipo de preparo, um dos ácidos empregados comumente, de acordo com Krug e Rocha (2019), é o ácido nítrico, devido ao seu baixo ponto de ebulição (em torno de 122 °C) e porque sua utilização na digestão da matéria orgânica libera os elementos minerais na forma de nitratos solúveis. Ademais, quando ocorre o aumento da pressão e temperatura (situação em

que se usa o forno de micro-ondas com vaso fechado), ou é combinado com ácido clorídrico e/ou peróxido de hidrogênio, este ácido adquire um poder oxidante ainda maior. Além disto, tal ácido é compatível com aspectos instrumentais de várias técnicas espectrométricas de análise.

O ácido clorídrico não apresenta propriedades oxidantes e reage com boa parte dos cátions metálicos de transição, o que torna seu uso não tão viável para determinação de alguns minerais. Se utilizado em baixas concentrações, é indicado para espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES) (Krug, 2000). Diferentemente dos ácidos citados anteriormente, o ácido sulfúrico deve ser evitado no processo de digestão, devido a sua alta viscosidade, pois pode gerar interferências físicas ou poliatômicas e/ou degradação do cone de amostragem, quando utilizados em determinadas técnicas, como ICP OES e espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS) (Hoening, 2001), além disso, pode formar sulfatos de baixa solubilidade (Krug, 2000). Apesar disso, este ácido é utilizado combinado com outros ácidos, para aumentar o ponto de ebulição de reação de decomposição e aumentar a eficiência do processo no caso de amostras muito complexas (Kira, 2002).

Kira (2002) em seu trabalho para determinação de minerais e elementos traços no leite, utilizou a metodologia de digestão por via úmida em chapa de aquecimento, sendo o ácido clorídrico utilizado como reagente para a determinação de cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo e zinco por ICP OES. Além deste método para digestão, a autora também utilizou o ácido clorídrico e o peróxido de hidrogênio como reagente na digestão ácida em forno de micro-ondas focalizado, visando determinar os mesmos minerais citados anteriormente e usando a mesma técnica (ICP OES). Ambos métodos apresentaram sobras de partículas sólidas não decompostas nos digeridos finais, sendo necessário filtrar o digerido para posterior análise. Apesar disso eles foram eficientes para a digestão, pois quando se comparou os resultados obtidos por eles com as concentrações médias obtidas pela digestão por via seca, cuja matéria orgânica foi totalmente destruída, as médias de concentração consideradas foram estatisticamente comparáveis.

Rey-Crespo, Miranda e López-Alonso (2013) utilizaram o ácido nítrico combinado ao peróxido de hidrogênio como reagentes para a digestão ácida em forno de micro-ondas para determinar cádmio, cobalto, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel, chumbo e zinco por ICP-MS. Lima (2009) também utilizou ácido nítrico combinado com peróxido de hidrogênio como reagente, mas combinado, também, com ácido sulfúrico para a digestão ácida em bloco digestor para determinação de cálcio, magnésio, fósforo, sódio e zinco em ICP OES.

Oreste e colaboradores (2016) utilizaram uma mistura de proporção 3:1 de ácido nítrico/ácido sulfúrico para determinar cálcio, cobre, ferro e potássio em amostras de leite. A análise consistiu em pesar cerca de 1 g da amostra em um tubo digestor e, em seguida, adicionar 10 mL da mistura de reagentes. Acoplou-se um sistema de refluxo ao tubo e aqueceu-se a mistura à 350°C por 4 horas. Após o resfriamento em temperatura ambiente o volume final foi completado com água ultrapura para posterior análise (Oreste *et al.*, 2016).

Além desta, o mesmo autor fez adaptações ao método de Ribeiro e demais autores (2003), utilizando 3 mL de ácido nítrico 65% (v/v), 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v), e 1 mL de água deionizada como reagentes para o preparo de amostras de leite em forno micro-ondas. Após este preparo, o carbono orgânico total nas amostras foi quantificado e as amostras obtidas foram analisadas por ICP OES para determinação dos metais supracitados (Oreste *et al.*, 2016).

Desse modo, é possível observar que a utilização do ácido clorídrico ou ácido nítrico para o preparo de amostras é uma prática comum, além da sua mistura com outros ácidos ou peróxido, apresentando eficiência adequada para analitos como aqueles que serão estudados no presente projeto (Kira, 2002; Rey-Crespo; Miranda; López-Alonso, 2013; Lima, 2009; Oreste *et al.*, 2016; Ribeiro, 2003). Por outro lado, esses artigos raramente citam se nos procedimentos estabelecidos restam partículas sólidas não decompostas após digestão ou se as partículas sólidas não decompostas que são filtradas, podem conter ou não alguma fração dos analitos. Esses aspectos foram considerados no desenvolvimento do método proposto neste trabalho.

2.6 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA

As técnicas espectroquímicas de análise geralmente são utilizadas para determinação quantitativa de minerais e se baseiam na "medida da interação entre a radiação eletromagnética e os átomos ou as moléculas do analito, ou ainda na produção de radiação pelo analito" (Skoog *et al.*, 2007, p. 4). Dentre estas técnicas podemos citar Espectrofotometria UV-Vis, ICP OES, ICP-MS e as técnicas de interesse deste trabalho, Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS) e Espectrometria de Emissão Atômica com Chama (F AES).

A F AES é baseada na emissão de radiação eletromagnética pelos átomos constituintes da amostra. A amostra na forma líquida – previamente tratada ou apenas solubilizada – é aspirada e passa para fase gasosa, na qual as moléculas são atomizadas. Na chama do queimador os átomos dos analitos também são excitados e estes têm elétrons da camada de valência

deslocados para níveis eletrônicos de energia superior e, em seguida, retornam ao seu estado fundamental, emitindo fótons de radiação características dos elementos constituintes da amostra (Skoog; Holler; Nieman, 2002).

A partir disso, as medições espectrais são baseadas na escolha e isolamento de uma região do espectro eletromagnético do elemento a ser determinado. A F AES, é uma das técnicas de espectrometria de emissão atômica, onde a temperatura de sua chama depende do gás utilizado, variando de 1.700 a 1.800 °C, a qual promove a emissão radiante de alguns átomos que são mais facilmente excitáveis, como Na, K e Li. Porém, alguns equipamentos também tem a capacidade de determinar Ca (Ewing, 1972). Neste trabalho a técnica de F AES foi utilizada para determinar Na e K nas amostras de leite após digestão ácida.

A Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) é uma técnica que permite a determinação de elementos metálicos, semimetálicos e até alguns não-metálicos em diferentes matrizes. Para a determinação de elementos na faixa de $\mu g\ L^{-1}$ utiliza-se o forno de grafite como atomizador, técnica denominada Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS). Já para medidas em $mg\ L^{-1}$, utiliza-se a chama como atomizador, correspondendo a técnica F AAS (Welz; Sperling, 2008), utilizada neste trabalho para quantificação dos elementos minerais Ca e Mg.

Essa técnica fundamenta-se na radiação eletromagnética oriunda de uma fonte de radiação primária, que é absorvida pelos átomos dos constituintes químicos das amostras, de forma que para cada analito utiliza-se um comprimento de onda específico. Assim, uma alíquota da amostra é transformada em aerossol, por meio de um nebulizador e este é levado à chama, a qual deve ter energia suficiente para atomizar a amostra. É importante ressaltar que a composição química da chama é fundamental para a atomização eficiente dos analitos. Por exemplo, chamas que utilizam Ar-acetileno podem atingir até 2.250 °C, já quando se utiliza óxido nitroso-acetileno a chama atinge cerca de 2.850 °C (Welz; Sperling, 2008).

A partir disso, é importante avaliar a amostra, assim como os elementos a serem determinados, para que seja utilizado a chama com os comburentes corretos e também evitar qualquer tipo de interferência no sinal resposta.

Vale ressaltar que a escolha da técnica de análise é feita de acordo com o elemento a ser determinado, a concentração de analito e o tipo de amostra que se deseja analisar, sendo que a técnica a ser escolhida deve ter a capacidade de fornecer resultados precisos e exatos sobre a amostra. Neste contexto, este trabalho utilizou das técnicas instrumentais F AES para

determinação de sódio e potássio, e F AAS para a determinar cálcio e magnésio em amostras de leite provenientes tanto de manejo orgânico como convencional.

3 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados os objetivos deste trabalho, os quais foram divididos em objetivo geral e objetivos específicos.

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de preparo de amostras para leite, que seja adequado para determinar sódio e potássio por F AES, e cálcio e magnésio por F AAS, em leite bovino de manejo orgânico e convencional.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para o preparo das amostras de leite, utilizando a chapa de aquecimento, que seja adequado para a determinação dos minerais cálcio, potássio, sódio e magnésio por técnicas espectrométricas de análise;
- Avaliar a aplicabilidade do método de preparo de amostras desenvolvido para determinação de Ca e Mg por F AAS, em diferentes tipos de leite;
- Otimizar métodos espectrométricos para determinação por F AES (sódio e potássio) e por F AAS (cálcio e magnésio) em amostras de leite após o preparo estabelecido;
- Investigar a composição de Na, K, Ca e Mg de leites produzidos no Brasil tanto de forma convencional como orgânica;

4 PARTE EXPERIMENTAL

Nesta seção serão apresentados todos os materiais utilizados para realização deste trabalho, assim como todas as informações acerca do desenvolvimento e otimização do método.

4.1 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram usados os seguintes equipamentos e acessórios: Fotômetro de chama (*Digimed*, modelo DM-61) e Espectrômetro de Absorção Atômica (*ThermoScientific*, modelo *Solaar série M5*), disponíveis no Departamento de Química da UFJF, Liofilizador (LJJ0, CIENTÍFICA JJ) a - 44,4 °C e vácuo de 176 mmHg e Bloco Digestor (*Tecnal* modelo TE – 040125), disponíveis na Faculdade de Farmácia da UFJF. Balança analítica (Mettler Toledo), Deionizador de água (Elga Purelab Option), geladeira (Electrolux, modelo DoubleDC33), micropipetas de volumes variáveis (LabMate Pro®), chapa de aquecimento (Quimis, modelo K261-22) e dessecador a vácuo.

Também foram utilizadas vidrarias em geral, como béqueres de volumes variados, vidros de relógio, tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL, pipetas de *pasteur*, colheres de plástico, placas de Petri com diâmetro de 90 mm e vidrarias de precisão (balões volumétricos de volumes variados). Tais vidrarias e/ou materiais foram higienizados com água e sabão neutro e, em seguida, descontaminados em ácido nítrico 10% (v/v), durante 24h. Por fim eles foram enxaguados com água deionizada e secos a temperatura ambiente.

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram utilizadas soluções padrão de 1000 mg L^{-1} de Na, K, Ca e Mg (SpecSol, São Paulo, SP, Brasil) e preparou-se, a partir do sal LiCl 99 % (m/m) (Sigma Aldrich, St. Louis - EUA), solução padrão de Li 1000 mg L^{-1}. Utilizou-se, também, HNO_3 65 % (v/v) (Fmaia, Diadema – SP e Alphatec), H_2O_2 35% (v/v) (Fmaia, Diadema – SP), Ácido sulfúrico 98% (v/v) (Ragen, Rio de Janeiro – RJ) e água deionizada com resistividade de 18 MΩ.cm.

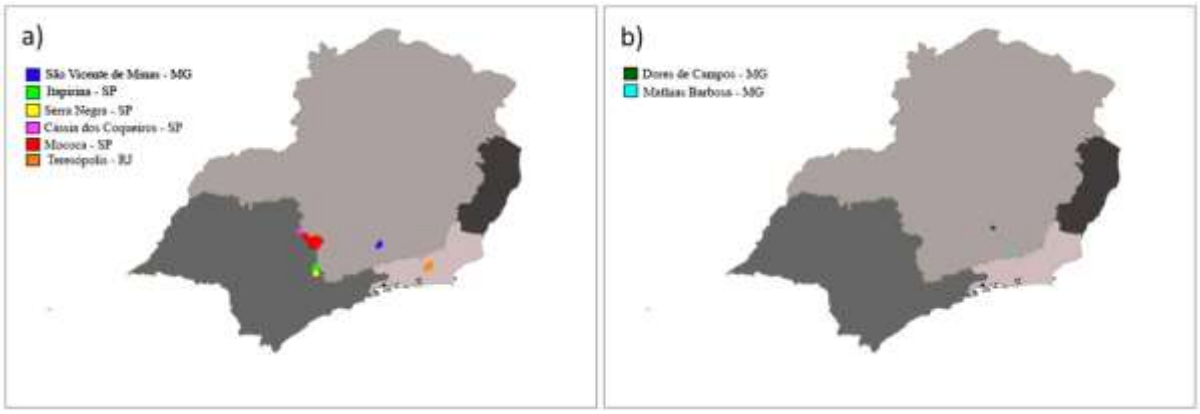
4.3 AMOSTRAGEM

As amostras utilizadas neste trabalho foram de leite cru; UHT integral e desnatado; em pó integral e desnatado; e pasteurizado integral. Dentre estas, as amostras de leite cru, UHT (integral e desnatado) e em pó (integral) foram de origem convencional e orgânica, já o leite pasteurizado e o leite em pó (desnatado) foram somente de origem convencional.

O leite UHT, tanto integral como o desnatado, convencional e orgânico, o leite pasteurizado e o leite em pó integral e desnatado convencional foram adquiridos no comércio local da cidade de Juiz de Fora – MG. Já o leite em pó integral orgânico foi comprado *on line*, de uma drogaria na cidade de Belo Horizonte – MG.

As amostras de leite cru foram obtidas entre os meses de março e maio do ano de 2022, em fazendas de manejo de gado leiteiro convencional e orgânico. Aquelas de leite orgânico foram adquiridas através de uma parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) "Gado de Leite", situada em Juiz de Fora - MG. A coleta foi realizada em 7 fazendas localizadas no Sudeste. Já aquelas de leite cru convencional foram de cinco fazendas do estado de Minas Gerais, conforme pode ser visto na Figura 1.

Figura 1 - Mapa com a localização das Fazendas onde as amostras foram coletadas: a) Leite Orgânico; b) Leite Convencional



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Todas essas amostras foram coletadas de tanques de expansão de aço inox – onde foram armazenados após a ordenha – com o auxílio de um coletor convencional de amostras de leite, também de aço inox, e colocadas em frascos plásticos devidamente higienizados. Após coletadas, as amostras foram congeladas para serem conservadas até o momento de seu preparo.

Todas as amostras obtidas foram corretamente identificadas, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Identificação das amostras obtidas

Amostra	Código
Mistura de Leite Liofilizado Cru Convencional e Orgânico	LLMIXCRUCO
Mistura de Leite Liofilizado Cru Convencional	LLMIXCRUC
Mistura de Leite Liofilizado Cru Orgânico	LLMIXCRUO
Mistura de leite Fluido Pasteurizado Integral Convencional	LFPIC
Mistura de Leite Liofilizado UHT Integral Convencional	LLUHTIC
Mistura de Leite Fluido UHT Integral Convencional e Orgânico	LFMIXUHTICO
Mistura de Leite Fluido UHT Desnatado Convencional e Orgânico	LFMIXUHTDCO
Leite Fluido UHT Integral Convencional	LFUHTIC
Leite Fluido UHT Desnatado Convencional	LFUHTDC
Leite Fluido UHT Integral Orgânico	LFUHTIO
Leite Fluido UHT Desnatado Orgânico	LFUHTDO
Mistura de Leite em pó Integral Convencional e Orgânico	LPÓMIXICO
Leite em Pó Integral Convencional	LPÓIC
Leite em Pó Desnatado Convencional	LPÓDC
Leite em Pó Integral Orgânico	LPÓIO
Leite Fazenda Orgânica 01	LFZ2903O
Leite Fazenda Orgânica 02	LVP3103O
Leite Fazenda Orgânica 03	LNS2604O
Leite Fazenda Orgânica 04	LT2704O
Leite Fazenda Orgânica 05	LRSS2704O
Leite Fazenda Orgânica 06	LFAF1105O
Leite Fazenda Orgânica 07	LFTL1105O
Leite Fazenda Convencional 01	LFS2305C
Leite Fazenda Convencional 02	LV2305C
Leite Fazenda Convencional 03	LD2305C
Leite Fazenda Convencional 04	LS2305C
Leite Fazenda Convencional 05	LI2305C

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.3.1 Armazenamento das amostras

As amostras de leite UHT foram armazenadas em geladeira. O leite em pó foi armazenado em local fresco e arejado. Já o leite pasteurizado foi adquirido e o preparo de amostras foi realizado imediatamente, não sendo necessário seu armazenamento.

Os testes iniciais para desenvolvimento do método foram realizados utilizando leite UHT integral convencional, com 3% (m/v) de gordura, que foram submetidos a liofilização. Inicialmente, foi feita uma mistura das amostras de leite UHT integral convencional de 3 marcas diferentes, utilizando 100 mL de cada uma das amostras. Em seguida, esta mistura foi particionada em porções de 30 mL em placas de petri, que foram vedadas com plástico filme de PVC, lacradas com fita crepe, identificadas e pesadas. Por fim, elas foram armazenadas em congelador até a liofilização, como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Amostra congelada e armazenada em placa de Petri previamente a liofilização



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

As amostras de leite cru já estavam congeladas quando foram recebidas, mas estavam em frascos de 200 mL, logo foi necessário descongelá-las para que fossem corretamente armazenadas para liofilização. Assim, para que descongelassem sem alterar suas características, elas foram colocadas em geladeira a 3 °C por cerca de 24 horas. Após esse tempo, já descongeladas, foi necessário agitá-las manualmente por cerca de 2 minutos para ficarem homogêneas e, em seguida, foram divididas e armazenadas da mesma maneira que as amostras de leite UHT.

4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

O preparo de amostras utilizado usou como princípio a via úmida, sendo a digestão ácida do leite realizada para todas as amostras. Porém, algumas amostras foram submetidas a um pré-tratamento, para que elas pudessem ser conservadas por mais tempo, até que o método de digestão fosse otimizado, como pode ser visto a seguir.

4.4.1 Pré-tratamento das amostras

Antes de serem submetidas ao preparo de amostras as amostras de leite cru e aquelas de leite UHT, utilizadas inicialmente, foram submetidas à liofilização, com o objetivo de retirar a água livre do leite e serem conservadas sem perder suas propriedades. Assim, as amostras de leite congeladas em placas de petri, foram liofilizadas por cerca de 24 horas.

Após este tempo, elas foram retiradas do liofilizador, e as diferentes porções da mesma amostra foram transferidas para almofariz e maceradas até se tornarem um pó de aparência característica de leite em pó. Em seguida foram colocadas em tubos Falcom de 50 mL e acondicionadas em congelador. Logo após liofilização foi feito o cálculo da água perdida durante o processo e da amostra restante.

4.4.2 Digestão das amostras

Para o desenvolvimento de um método adequado para determinação dos elementos minerais Na, K, Ca e Mg em leite orgânico e convencional, foi necessário submeter as amostras a digestão por via úmida. Desse modo, foram realizados diferentes testes utilizando somente a chapa de aquecimento e o bloco digestor, o micro-ondas não foi utilizado, pois estava com defeito. Os reagentes utilizados e suas proporções foram escolhidos com base nos trabalhos de Lisboa e Sousa (2020), Ribeiro *et al*. (2003), Oreste *et al*. (2016) e Rey-crespo, Miranda, López-Alonso (2013). Já o volume dos reagentes foi baseado na observação visual do processo de digestão. A massa e o volume de amostra utilizados para digestão foram embasados no trabalho de Rey-crespo, Miranda e López-Alonso (2013).

4.4.2.1 Digestão das amostras em chapa de aquecimento

Para avaliar a eficiência de diferentes reagentes e proporções para a digestão das amostras de leite UHT, inicialmente utilizadas para o desenvolvimento do método, foram realizados testes em chapa de aquecimento e em bloco digestor. Primeiramente fizeram-se os testes em chapa de aquecimento. Para eles, aproximadamente 0,1300 g de amostra foram pesados em um béquer, em seguida os reagentes foram adicionados e o béquer tampado com um vidro de relógio, para possibilitar o refluxo dos reagentes, e colocado sobre a chapa de aquecimento a 100 ± 5 °C, conforme a Figura 3.

Figura 3 - Sistema de refluxo utilizado para digestão em chapa de aquecimento



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Ao longo do tempo, adições sucessivas dos agentes oxidantes foram feitas até que a liberação de vapores nitrosos parasse ou diminuísse significativamente. É importante ressaltar que diferentes testes foram realizados, variando os reagentes e proporções utilizados para digestão, conforme mostra o Quadro 2.

Quadro 2 - Reagentes e proporções utilizados nos testes iniciais para digestão em chapa de aquecimento

Teste	Reagentes	Proporção
1	HNO_3	---
2	HNO_3:H_2O_2	2:1
3	HNO_3:H_2O_2	3:1
4	HNO_3:H_2O_2[1]	3:1
5	HNO_3:H_2O_2:H_2SO_4	6:1:1

[1]As amostras foram submetidas a pré-digestão com HNO_3 por 12 horas.
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Após digestão da amostra, aguardou-se o resfriamento do digerido. Em seguida, o digerido era observado, logo, quando se notava que a solução de digerido não apresentava partículas sólidas, ela era transferida para um balão volumétrico de 25,00 mL e seu volume aferido com água deionizada. Porém, em casos nos quais notou-se partículas sólidas não decompostas, o digerido total era filtrado em papel filtro, com auxílio de água deionizada, no momento da transferência para o balão volumétrico de 25,00 mL.

Desse modo, os ensaios mais bem-sucedidos em chapa de aquecimento – aqueles em que a digestão se mostrou eficiente – tiveram os reagentes e proporções utilizados em testes com o bloco digestor.

4.4.2.2 Digestão das amostras em bloco digestor

Baseado nos testes realizados em chapas de aquecimento, foram realizados dois testes em bloco digestor, o primeiro utilizando como reagentes HNO_3 e H_2O_2 na proporção 3:1, e o segundo usando HNO_3, H_2O_2 e H_2SO_4 na proporção 6:1:1.

Assim, cerca de 0,1300 g de amostra foram pesados em tubos digestores, em seguida os reagentes foram adicionados e os tubos foram levados ao bloco digestor. A temperatura do bloco foi aumentada gradativamente de 40 °C até 115 °C – temperatura abaixo do ponto de ebulição do HNO_3.

Esta temperatura ficou constante durante o processo de digestão, o qual foi interrompido somente quando houve diminuição significativa dos vapores nitrosos, totalizando 4 horas. A digestão, para ambos os testes em bloco digestor, teve restos de partículas sólidas não

decompostas. Logo, realizou-se o mesmo procedimento de filtração do sólido residual das digestões em chapa de aquecimento.

A partir disso os testes de digestão em chapa de aquecimento e em bloco digestor foram comparados, com o objetivo de selecionar o melhor procedimento.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO

Com o intuito de determinar Na e K nas amostras de leite convencional e orgânico, o método foi otimizado conforme descrito nesta seção.

4.5.1 Espectrometria de Emissão Atômica com Chama

Para determinação dos analitos Na e K foi empregada a técnica F AES, também conhecida como como fotometria de chama. Foi utilizado o fotômetro de chama da Digimed (modelo DM-61), com câmara de nebulização para introdução de GLP (gás liquefeito de petróleo) como gás combustível e ar comprimido como gás oxidante, possibilitando a leitura simultânea dos analitos com resolução de 0,1 ppm e tempo de resposta de 8 segundos. Assim, as soluções de amostra foram aspiradas com uma vazão média de (5,77 ± 0,12) mL/min.

4.5.2 Condições Experimentais do Método

A partir da comparação dos testes realizados, optou-se pela utilização da chapa de aquecimento para o preparo das amostras por digestão ácida. Com o intuito de selecionar os melhores reagentes e proporções dentre os testes avaliados (Teste 3 - HNO_3 e H_2O_2 na proporção 3:1; e Teste 5 - H_2SO_4, HNO_3 e H_2O_2 na proporção 6:1:1) foram realizados ensaios de curva de calibração por adição de padrão em amostras de leite UHT integral convencional liofilizado – tanto para Na quanto para K – submetidos aos diferentes preparos de amostras. Em seguida as concentrações dos analitos (Na e K) na amostra foram determinadas e comparadas estatisticamente por meio de um teste *t* a 95% de confiança.

Enquanto para o Na utilizou-se a solução do digerido obtido diluído em balão de 25,00 mL com água deionizada, para o K, uma alíquota de 5,00 mL desta solução inicial foi transferida, com o auxílio de uma pipeta de volume variável (0,50 – 5,00 mL), para outro balão volumétrico de 25,00 mL e seu volume foi completado com com água deionizada.

Após determinar as melhores condições e reagentes para o preparo de amostras, foi necessário avaliar o tipo de calibração instrumental mais adequada para determinação de Na e K por F AES. Os procedimentos de calibração comparados foram a calibração externa e a calibração externa com padrão interno e, analogamente, a calibração externa e calibração externa com padrão interno preparados no branco dos reagentes (casamento de matriz). Estas últimas foram estudadas com o intuito de diminuir os efeitos gerados pelos agentes oxidantes na matriz.

A comparação dentre as calibrações foi realizada por meio da resposta de testes de adição e recuperação dos analitos em amostras de leite UHT liofilizados, a partir das diferentes curvas.

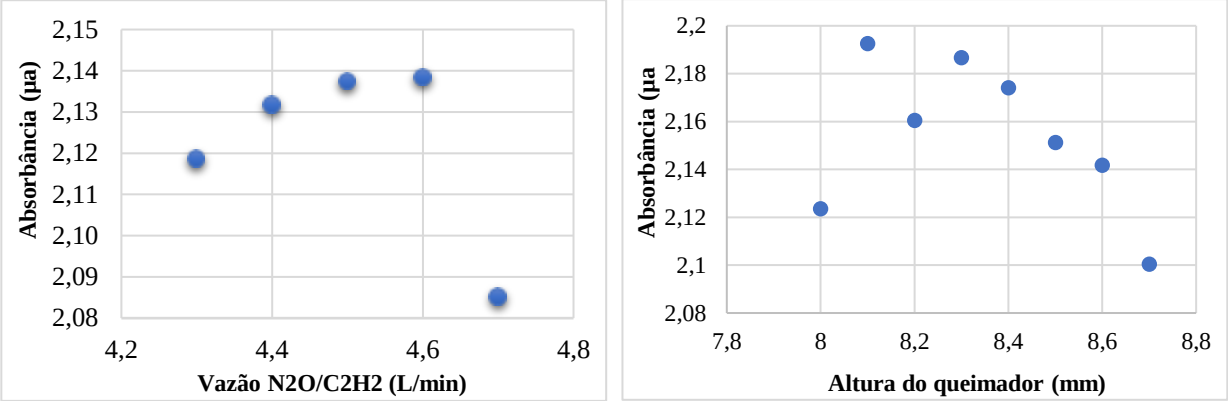
4.6 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO

Com o objetivo de determinar Ca e Mg nas amostras de leite, o procedimento instrumental também foi otimizado para a técnica de F AAS. Logo, entendendo que os princípios das técnicas de F AES e F AAS são semelhantes e assumindo uma condição de compromisso, o método de calibração selecionado para determinação de Na e K por F AES também foi utilizado para determinação de Ca e Mg por F AAS.

4.6.1 Espectrometria de Absorção Atômica com Chama

A determinação de Ca e Mg foi realizada via F AAS. Para esse fim, anteriormente às análises e otimização do método, fez-se a otimização univariada dos parâmetros altura do queimador, vazão dos gases e posição da pérola de impacto, utilizando soluções padrões preparadas no branco de reagentes na concentração de 10 mg L^{-1} para ambos analitos. As respostas obtidas durante as otimizações podem ser vistas na Figura 4 e Figura 5.

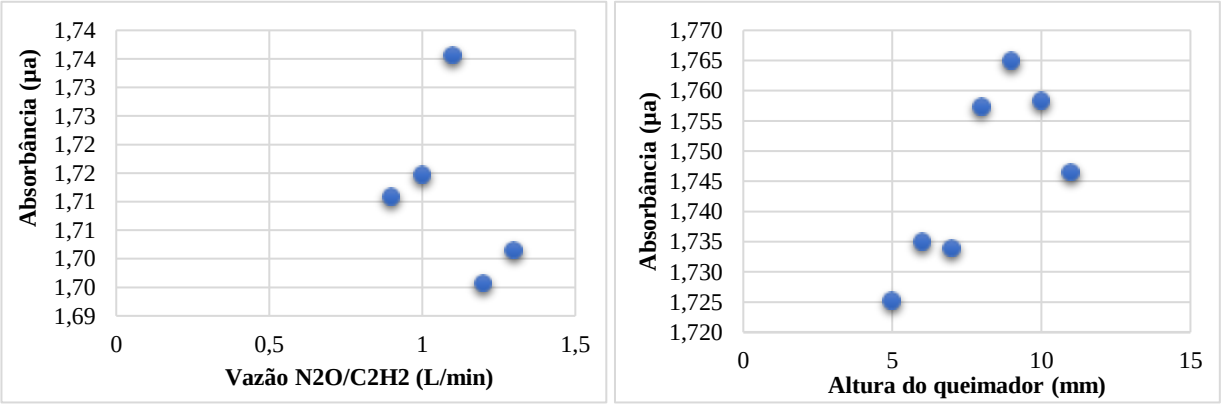
Figura 4 - Otimização dos parâmetros a) Vazão de C_2H_2 e b) Altura do queimador para determinação de Ca por F AAS



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Conforme pode ser observado na Figura acima, foi estabelecido que a melhor altura do queimador a ser utilizada para determinação de Ca seria 8,1 mm. Já a vazão dos gases escolhida foi a de 4,5 L/min, pois a absorbância obtida quando a vazão do gás aumentou de 4,5 para 4,6 L/min, sofreu uma pequena variação, como pode ser visto na Figura 3. Logo, isto não justificaria o uso de uma maior vazão, pois resultaria em um maior gasto de combustível para um ganho mínimo de sinal analítico.

Figura 5 - Otimização dos parâmetros a) Vazão de C_2H_2 e b) Altura do queimador para determinação de Mg



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para a determinação de Magnésio, o melhor sinal resposta para a vazão do gás foi a de 1,1 L/min e a altura do queimador foi de 9 mm, conforme apresentado na Figura 5.

Deste modo, estes e os demais parâmetros instrumentais do equipamento, que estavam de acordo com as recomendações do fabricante, foram utilizados para determinação de Ca e Mg por F AAS, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros Instrumentais para determinação de Ca e Mg por F AAS, conforme otimização e recomendações dos fabricantes dos equipamentos

Parâmetros Instrumentais	**Elementos**	
	Ca	**Mg**
Comprimento de Onda (nm)	422,7	285,2
% da Corrente da Lâmpada (mA)	100%	75%
Resolução espectral (nm)	0,5	0,5
Mistura gasosa	N_2O/C_2H_2	Ar/C_2H_2
Vazão do Gás (L/min)	4,5	1,1
Altura da Chama (mm)	9,0	8,3

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.6.2 Determinação de Ca e Mg nas partículas sólidas não decompostas pela digestão ácida

Após a digestão das amostras, o digerido era filtrado no momento da transferência para o balão volumétrico, com auxílio de um papel filtro e água deionizada. O papel contendo as partículas sólidas retidas durante a filtração era levado para o dessecador em temperatura ambiente, e após seco, era reservado para posterior análise.

Com o intuito de avaliar se existiam analitos retidos neste sólido, realizaram-se testes da solubilidade do sólido em álcool etílico 20, 30 e 40% (v/v). A partir disso, a solução que apresentou melhor desempenho na solubilização do sólido foi analisada por F AAS e a concentração de Ca e Mg nestes sólidos foi determinada.

4.7 ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Foram feitos os ensaios de validação do método para os parâmetros linearidade, efeito matriz, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), tendência, exatidão e precisão.

A faixa linear de trabalho foi definida por meio de testes da linearidade da curva. Para isto, foram feitas curvas analíticas, considerando a faixa ótima de trabalho do fotômetro utilizado e a concentração esperada dos analitos, com cinco níveis e em triplicatas, as quais foram preparadas e lidas de maneira aleatória (Inmetro, 2020). Em seguida, foi verificada a homocedasticidade dos dados, ou seja, a homogeneidade da variância dos resíduos, pelo teste

de *Cochran* (ISO 5725-3:1994) e a linearidade foi avaliada pelo teste F (F-*Snedecor)* na análise da variância (ANOVA) da regressão (Inmetro, 2020).

O efeito matriz foi investigado a partir do estudo da comparação de curvas de calibração externa e de adição de padrão na amostra. Logo, os coeficientes de inclinação de ambas curvas foram comparados por um teste *t* a 95% de confiança (Inmetro, 2020).

Com o intuito de confrontar os LOD e LOQ para determinação Na e K por F AES e avaliar qual método obteria os limites mais próximos da realidade, os quais fossem condizentes com a literatura, LOD e LOQ foram calculados de dois métodos diferentes. O primeiro, através da estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica (Equação 1 e Equação 3, respectivamente) e o segundo, por meio do desvio padrão da leitura do branco dez vezes (Equação 2 e Equação 4, respectivamente) (Anvisa, 2017; Inmetro, 2020), conforme as fórmulas abaixo.

$$LOD = \frac{3{,}3\ S}{a} \quad [1]$$

$$LOD = \frac{3{,}3\ s}{a} \quad [2]$$

$$LOQ = \frac{10\ S}{a} \quad [3]$$

$$LOQ = \frac{10\ s}{a} \quad [4]$$

Sendo:

S = Estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica;

s = desvio padrão da resposta do branco

a = sensibilidade da calibração.

Já para determinação de Ca e Mg por F AAS, o LOD e LOQ foram obtidos através do cálculo utilizando a Estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica, conforme as fórmulas 1 e 3 (Inmetro, 2020).

É importante ressaltar que por questões logísticas (disponibilidade de amostras) o método para determinação de Na e K foi validado apenas para o leite liofilizado. Já para determinação de Ca e Mg, foram feitos ensaios de validação para o leite orgânico e convencional de diferentes tipos e estados físicos (fluido e sólido), pois neste momento as amostras de leite proveniente de manejo orgânico já estavam disponpiveis

.

A tendência foi avaliada por meio do desempenho do método na digestão de material de referência certificado (CRM) de leite em pó desengordurado (Standard Reference Material

1549) e determinação de Na e K por F AES. A partir disso, os valores obtidos de concentração dos analitos foram comparados com os valores de concentração certificados do material de referência, e fez-se o cálculo do erro relativo – de acordo com a Equação 5 – para as concentrações de K e Na (Inmetro, 2020).

$$ER = \frac{Xlab - Xv}{Xv} \quad [5]$$

Onde:

X_{lab} = valor obtido ou média aritmética de valores obtidos experimentalmente;

X_v = valor admitido como verdadeiro (valor certificado do CRM).

A exatidão foi determinada por meio de ensaios de adição e recuperação dos analitos. Para isto, diferentes níveis de concentrações dos analitos de interesse foram adicionados na amostra antes do preparo e, em seguida, estas foram submetidas a todo o procedimento analítico (Inmetro, 2020). Por fim, foi feito o cálculo para obter o valor de recuperação, em porcentagem, o qual foi obtido pela Equação 6.

$$\text{Recuperação (\%)} \frac{(C_1-C_2)}{(C_3)} \text{x100} \quad [6]$$

Onde:

C1: concentração do analito na amostra fortificada

C2: concentração do analito na amostra não fortificada

C3: concentração do analito adicionado à amostra fortificada (Inmetro, 2020).

A precisão foi determinada pela repetibilidade e precisão intermediária, conforme a Equação 7 (Inmetro, 2020).

$$\text{CV=DPR=} \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \text{x100} \quad [7]$$

Sendo:

CV: Coeficiente de variação

DPR: Desvio padrão relativo

DP: desvio padrão

CMD: concentração média determinada.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITE CRU ORGÂNICO

A caracterização da composição centesimal foi realizada somente para o leite cru orgânico liofilizado. As análises foram feitas no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Juiz de Fora, sendo elas, determinação de gordura, extrato seco total, lactose e proteína bruta pelo princípio de Kjeldahl, de acordo com a Federação Internacional do Leite (IDF) (ISO,

2021); extrato seco desengordurado e cinzas, conforme o recomendado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (MAPA, 2022).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a execução deste trabalho.

5.1 PREPARO DE AMOSTRAS

Os preparos de amostras realizados por chapa de aquecimento e bloco digestor foram comparados entre si, e aquele que obteve o melhor desempenho foi escolhido para ser utilizado na análise das amostras coletadas.

5.1.2 Digestão das amostras em chapa de aquecimento

Para avaliar a viabilidade do preparo de amostras utilizando chapa de aquecimento, foram realizados cinco diferentes testes. Os resultados do volume de reagentes gasto ao fim das digestões e a observação sobre presença de sobras de partículas sólidas não decompostas nos digeridos finais, podem ser vistos no Quadro 3.

Quadro 3 - Volume de reagentes gastos e presença de partículas não decompostas nos digeridos após digestão em chapa de aquecimento utilizando diferentes procedimentos (testes)

Teste	**Reagentes**	**Proporção**	**Volume total de reagentes gasto (mL)**	**Presença de partículas não decompostas**
1	HNO_3		13	Sim
2	HNO_3:H_2O_2	2:1	10,5	Sim
3	HNO_3:H_2O_2	3:1	9	Sim
4	HNO_3:H_2O_2[1]	3:1	9	Sim
5	HNO_3:H_2O_2:H_2SO_4	6:1:1	9	Não

[1]As amostras foram submetidas a pré-digestão com HNO_3 por 12 horas.
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A partir do Quadro 3, foi possível notar que quando se utiliza apenas HNO_3 a digestão da amostra ocorre de maneira incompleta, restando partículas sólidas não decompostas nos digeridos finais. Isso ocorre devido a difícil oxidação da matéria orgânica utilizando somente

este ácido, uma vez que seu ponto de ebulição é baixo e, provavelmente, limitando a eficiência da decomposição (Krug, Rocha, 2019). Visto isso, optar pela mistura de outros agentes oxidantes têm a capacidade de aprimorar a dissolução da amostra (Krug, Rocha, 2019), podendo levar, consequentemente, a diminuição do volume de reagentes gasto.

Logo, com o intuito de melhorar o poder oxidante do ácido nítrico, foram feitos testes utilizando a mistura dos reagentes HNO_3 e H_2O_2 em diferentes proporções. Foi possível notar que realmente houve a diminuição do gasto de reagentes ao fim da digestão, assim como a melhora na digestão, mas em todos os casos ela foi incompleta, restando partículas sólidas não decompostas. Assim, quando se comparou as diferentes proporções utilizadas de HNO_3 e H_2O_2 (2:1 e 3:1) foi possível notar que esta última foi mais eficiente, pois a proporção favoreceu a oxidação da matéria orgânica, além de que a quantidade de reagentes gastos ao final da digestão foi menor do que a primeira. Sendo assim, devido a sua viabilidade e eficiência, optou-se pela digestão utilizando 3 partes de ácido nítrico para uma de peróxido de hidrogênio.

Comparando as digestões que utilizaram a proporção 3:1 de HNO_3:H_2O_2 não houve diferença quanto ao processo de digestão, a pré-digestão não "aumentou" a oxidação da amostra, gastou-se o mesmo volume de reagentes e também restaram partículas sólidas não decompostas. Deste modo, devido ao tempo gasto entre o início e fim dos dois processos, é válido optar por aquele sem a pré-digestão.

Por fim, ao realizar outro teste utilizando a mistura de HNO_3, H_2O_2 e H_2SO_4, não houve partículas sólidas residuais do processo de digestão, o que pode ser explicado pelo efeito sinérgico do ácido sulfúrico como agente oxidante. Logo, é possível afirmar que potencializou o poder oxidante da mistura reagente, levando a sua completa mineralização (pelo menos do ponto de vista macroscópico). No entanto, é essencial destacar que mesmo sem a presença de partículas sólidas visíveis a olho nu, isso não indica uma oxidação cem por cento eficiente da matéria orgânica, uma vez que diversos compostos orgânicos podem sofrer uma decomposição apenas parcial, mantendo-se dissolvidos na solução (Krug; Rocha, 2019).

Baseando-se nisto, dentre os cinco ensaios realizados o teste 3 e o 5 foram selecionados para serem submetidos a outros testes de digestão, com o intuito de compará-los e avaliar qual seria mais adequado para o preparo de amostras, para determinação de Na, K, Ca e Mg por F AES e F AAS.

5.1.2.1 Digestão das amostras em bloco digestor

Os testes em bloco digestor foram realizados com o intuito de comparar e avaliar se eles seriam melhores do que aqueles feitos em chapa. Após a digestão, ambos digeridos, testes 3 (9,0 mL de reagentes, proporção 3:1, HNO_3:H_2O_2) e 5 (9,0 mL de reagentes HNO_3:H_2O_2:H_2SO_4, proporção 6:1:1), tiveram coloração amarela intensa e foi possível observar a presença de partículas sólidas não decompostas após digestão.

Diferentemente do que ocorreu para a chapa de aquecimento, no bloco digestor, a digestão da amostra a partir da mistura de reagentes contendo H_2SO_4 levou à restos de partículas sólidas não decompostas nos digeridos finais. Isso pode ser explicado pelo fato de que no bloco digestor a temperatura é totalmente controlada e o volume dos reagentes foi todo adicionado no início da digestão, não favorecendo a evaporação do HNO_3. Já na chapa de aquecimento, alíquotas de reagentes eram adicionadas ao longo da reação, isso pode ter levado a evaporação do HNO_3 mais facilmente, restando apenas H_2SO_4 no béquer, possibilitando a carbonização das partículas sólidas mais difíceis de digerir (Oreste *et al*., 2016).

Logo, concluiu-se que a melhor técnica para digestão foi utilizando a chapa de aquecimento, visto que além do tempo gasto ter sido menor – cerca de 40 minutos em chapa de aquecimento e 4 horas em bloco digestor – ela se mostrou mais eficiente.

5.2 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO MÉTODO

De acordo com a literatura (Fox; Mcsweeney, 1998; Qin *et al*., 2021), a concentração de Na e K esperadas para as amostras de leite (orgânico e convencional) seriam muito diferentes entre si, sendo entre 344 e 500 mg kg^{-1} para Na e entre de 1.373 e 1.450 mg kg^{-1} para K. Apoiando-se nisto e considerando que as faixas ótimas de trabalho no fotômetro de chama utilizado variam de 10 a 60 mg L^{-1} para Na e de 5-50 mg L^{-1} para K, optou-se por diluições diferentes das soluções de leitura, previamente a determinação destes analitos.

Para avaliar qual método de digestão seria mais viável, foi feita a digestão ácida em chapa de aquecimento de amostras de leite UHT liofilizado, conforme os testes 3 e 5. Em seguida, para os ensaios de determinação de Na e K por F AES foram utilizados os métodos de calibração por adição de padrão para ambos os testes, em triplicatas. Por fim, o teste *t* a 95% de confiança foi utilizado para comparar se os valores obtidos diferiam ente si, conforme apresenta a Tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios de Concentração de Na K em amostras de leite UHT liofilizado após digestão com diferentes misturas e proporções de reagente

Testes	Concentração Na (mg/kg)[1]	Valor de *t* calculado	Concentração K (mg/kg)[1]	Valor de *t* calculado
HNO_3:H_2O_2	5.612±151	1,32[2]	16.136±327	2,23[3]
HNO_3:H_2O_2: H_2SO_4	6.056±353		16.658±206	

[1]Concentração determinada = média ± intervalo de confiança = $\frac{t*s}{\sqrt{n}}$, em que s é o desvio-padrão, n é o número de replicatas e t é o parâmetro de Student (α=0,05; n=3); [2]$t_{tabelado}$= 2,78; [3]$t_{tabelado}$= 2,45
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Apesar de restar um sólido residual na digestão utilizando HNO_3 e H_2O_2, não houve diferença significativa entre as concentrações obtidas de Na e K em ambos os testes, conforme apresenta a *Tabela 5*. Assim, este método foi escolhido para realizar o preparo de amostras a serem estudadas, porque além da mistura de HNO_3 e H_2O_2 ser compatível com o princípio instrumental de ambas técnicas utilizadas neste trabalho – F AES e F AAS –, eles podem ser encontrados comercialmente em alta pureza e os produtos formados em sua reação são, em sua maioria, nitratos metálicos solúveis em meio aquoso (Sousa; Campos; Orlando, 2015). Além disso, o uso de ácidos como HNO_3, sem misturas com H_2SO_4 é favorável, visto que este último, devido sua alta viscosidade, pode gerar interferências físicas na análise (Hoening, 2001).

Outro fator importante que foi considerado para sua escolha, foi o tempo total de digestão. Enquanto o tempo gasto deste método foi cerca de 40 minutos, aquele no qual a mistura de agentes oxidantes utilizou H_2SO_4 gastou cerca de 65 minutos para concluir a digestão.

5.3 ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE SÓDIO E POTÁSSIO

Após definição do melhor método a ser utilizado, foram realizados testes para avaliação de sua adequação para determinação de K e Na por F AES. Logo, foram feitos testes de adição e recuperação utilizando as amostras de leite UHT integral convencional liofilizado. A partir disso foi feita a comparação das exatidões obtidas para os analitos, pelos diferentes métodos de calibração, conforme a Tabela 6.

Tabela 6 - Recuperações obtidas por meio dos diferentes métodos de calibração em amostras de leite liofilizado.

Método de Calibração utilizado	Recuperação obtida (%)	
	Na	K
Calibração externa	115	100
Calibração externa com padrão interno	125	92
Calibração externa no branco de reagente	99	94
Calibração externa no branco de reagente com padrão interno	82	111

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A escolha do método de calibração mais adequado foi embasada nos valores críticos de recuperação aceitáveis, considerando a concentração de analito na amostra de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (2016) e também nos valores de recuperação encontrados em trabalhos que desenvolveram métodos para determinação destes minerais em leite (Oreste *et al.*, 2016).

Dentre os valores de recuperação obtidos para o Na e K, apenas o do método de calibração externa no branco de reagente apresentou valores de recuperação dentro do intervalo encontrado na literatura para ambos analitos (AOAC, 2016; Oreste *et al.*, 2016), visto que as recuperações podem sofrer pequenas variações devido a erros experimentais, mas mesmo assim serem adequadas do ponto de vista quantitativo. Baseando-se nisto, este método de calibração foi estabelecido para este trabalho.

Para avaliação da linearidade, foi realizado o teste de homocedasticidade dos dados das curvas analíticas, ou seja, se existe igualdade entre suas variâncias, para isto foi realizado o teste de Cochran. Para análise da variância da regressão (ANOVA) foi feito o teste F. Na Tabela 7 é possível ver os resultados obtidos.

Tabela 7 - Resultados estatísticos para análise de regressão linear referente as curvas de Na e K

Na		
Faixa Linear de trabalho	10 – 50 mg L^{-1}	
Teste de Cochran	Qcalc= 0,460	Qtab= 0,616
Falta de Ajuste	Ffaj-calc= 0,219	Ffaj-tab= 9,12
Regressão	Freg-calc= 4835	Freg-tab= 4,49
R^2 -Ajustado	0,996	
Equação da Reta	y= (0,7861±0,0113) x + (4,0698±0,3423)	
K		
Faixa Linear de trabalho	5 – 25 mg L^{-1}	
Teste de Cochran	Qcalc= 0,3413	Qtab= 0,6838
Falta de Ajuste	Ffaj-calc= 0,317	Ffaj-tab= 9,12
Regressão	Freg-calc= 3837	Freg-tab= 4,67
R^2 -Ajustado	0,996	
Equação da Reta	y= (1,0040±0,0162) x + (0,9067±0,2688)	

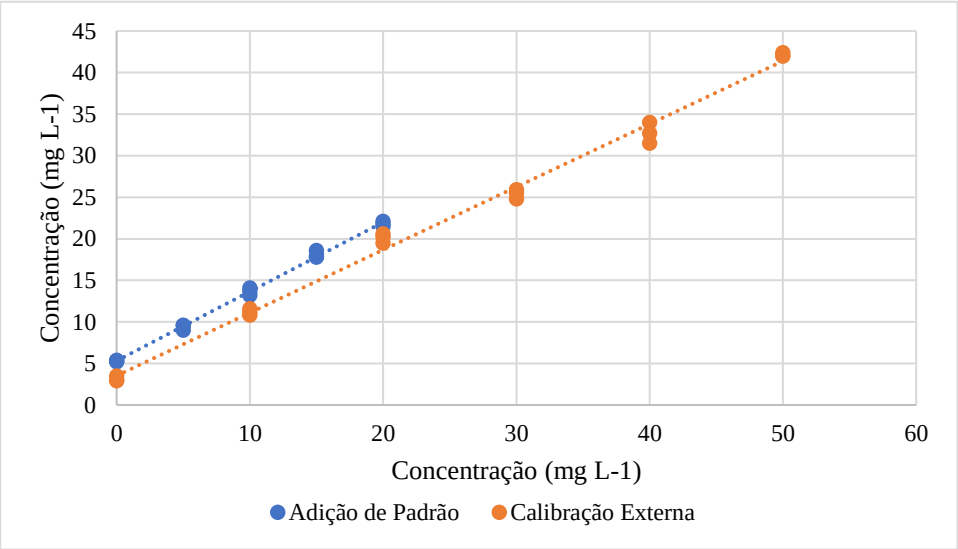
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Através da comparação dos valores de Q do teste de Cochran, tanto para K quanto para Na, os valores obtidos para $Q_{calculado}$ foram menores do que os para $Q_{tabelado}$. Logo, conclui-se que não existe diferença significativa entre as variâncias, comprovando que são homogêneas, portanto homocedásticas.

Na análise de regressão, os valores de $F_{calculado}$ foram menores do que $F_{tabelado}$, visto isso, não há falta de ajustes dos métodos. Já para a avaliação da significância da regressão, os valores de $F_{calculado}$ foram extremamente superiores ao $F_{tabelado}$, o que demonstra a existência de relação linear entre as variáveis analisadas, de acordo com a estatística. Valores de $F_{calculado}$ 10 vezes maiores indicam que a regressão é altamente significativa (Barros Neto; Scarminio; Bruns, 2001).

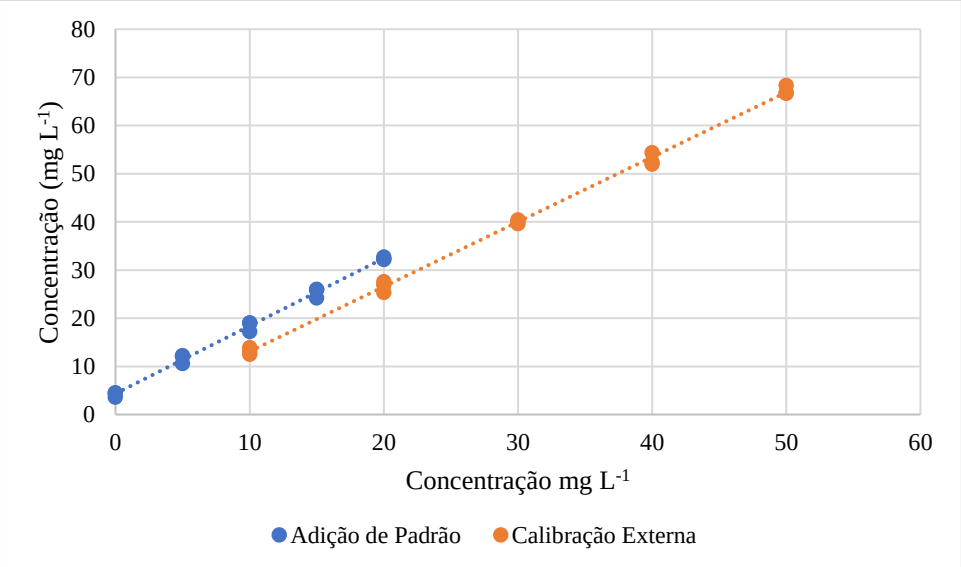
Em seguida foi feito o estudo do efeito matriz, por meio da comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração externa no branco de reagentes e curva de adição de padrão em amostras leite cru orgânico liofilizado, para ambos analitos. As curvas obtidas podem ser vistas no Gráfico 1 e Gráfico 2.

Gráfico 1 - Comparação das curvas de adição de padrão e curvas de calibração externa no branco de reagentes para o Na



Equação da reta de calibração externa: y = 0,834 x + 5,31; R^2 = 0,997;
Equação da reta de adição de padrão: y = 0,757 x + 3,52; R^2 = 0,994;
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Gráfico 2 - Comparação das curvas de adição de padrão e curvas de calibração externa no branco de reagentes para o K



Equação da reta de calibração externa: y = 1,41x + 4,34; R^2 = 0,995;
Equação da reta de adição de padrão: y = 1,35x - 0,3667; R^2 = 0,998;
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

As curvas de calibração avaliadas tiveram diferentes faixas de trabalho tanto para Na como para K. Estas foram diferentes devido a uma escolha logística e não técnica, causada pela indisponibilidade do equipamento a partir de determinado momento do trabalho. Para o Na as

faixas de trabalho de ambas curvas coincidiram entre as concentrações de 0 a 20 mg L^{-1}, enquanto para o K as concentrações coincidiram numa faixa menor (de 10 a 20 mg L^{-1}). Nestas faixas, entretanto, é possível perceber que as inclinações das curvas não diferiram significativamente entre si.

Além disso, as faixas de trabalho das curvas analíticas foram comparadas por meio do teste *t* a 95% de confiança. Os testes indicaram que os coeficientes angulares de ambos os métodos não diferiram entre si (Na*:* $t_{tabelado} = 12,71 > t_{calculado} = 1,41$*; K:* $t_{tabelado} = 12,71 > t_{calculado=} 1,41$). Isto sugere que não há efeito matriz significativo.

Através dos ensaios de detectabilidade, os LOD e LOQ instrumental e do método foram definidos, conforme apresentam os dados da Tabela 8 e Tabela 9

Tabela 8 - LOD e LOQ instrumentais e do método para os analitos Na e K calculado a partir da Estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica

Analito	**LOD instrumental (mg L^{-1})**	**LOD método (mg kg^{-1})**	**LOQ instrumental (mg L^{-1})**	**LOQ método (mg kg^{-1})**
Na	3,44	661	10,42	2.004
K	1,46	1.403	4,42	4.285

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Tabela 9 - LOD e LOQ instrumentais e do método para os analitos Na e K calculados a partir do desvio padrão da leitura do branco dez vezes

Analito	**LOD instrumental (mg L^{-1})**	**LOD método (mg kg^{-1})**	**LOQ instrumental (mg L^{-1})**	**LOQ método (mg kg^{-1})**
Na	0,48	92	1,59	306
K	0,24	47	0,81	782

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Analisando as Tabelas acima é possível observar que os cálculos dos limites de modos diferentes podem gerar valores divergentes. Por isso é necessário fazer uma avaliação criteriosa que corresponda a realidade do método em desenvolvimento.

Quando se compara os limites do método obtidos pelos dois cálculos, nota-se que a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica proporciona

valores muito maiores, cerca de seis vezes, do que pelo Desvio padrão do branco. A consideração do primeiro cálculo como verdadeiro, levaria então, a conclusão de que este método poderia não ser utilizado para determinação destes mesmos minerais, em amostras líquidas, por exemplo. Uma vez que a concentração média de Na e K em leite fluido variam, respectivamente, entre 344 a 500 mg kg^{-1} e 1.373 a 1.450 mg kg^{-1} (Fox; Mcsweeney, 1998; Qin *et al*., 2021). Isto poderia, então, subestimar o método, a partir de uma informação que não condiz com a realidade dos dados obtidos experimentalmente.

Com isto, para este método, os LOD e LOQ estabelecidos foram aqueles calculados através do desvio padrão da leitura do branco dez vezes. Os limites de detecção e quantificação obtidos estão abaixo da concentração dos analitos determinados nas soluções das amostras, o que demonstra que o método é qualificado para determinação de Na e K em leite orgânico e convencional. Além disso, os desvios padrões residuais obtidos para precisão e a precisão intermediária foram inferiores a 2% para Na e K, demonstrando que o método tem uma baixa dispersão de dados. Isto é extremamente positivo, visto que para estas concentrações de analito o desvio padrão relativo encontrado pode ser até de 5,6% (Wood, 1999). Além disso, as concentrações encontradas para os analitos Na e K em leite estão condizentes com o que se poderia esperar para essas amostras, com base no que já está reportado na literatura (Fox; Mcsweeney, 1998; Hermansen *et al.*, 2005; Quin. *et al.*, 2021).

Os ensaios de adição e recuperação para avaliação da exatidão foram feitos em dois níveis para as amostras de leite cru orgânico liofilizado e para o branco, conforme

Tabela *10*. A indisponibilidade do equipamento de F AES também impossibilitou que os testes de exatidão fossem realizados para amostras de leite cru convencional liofilizado, para uma mistura das amostras e para amostras de outros tipos de leite, como o leite UHT, leite em pó e leite pasteurizado.

Tabela 10 - Valores de recuperação para os testes de adição e recuperação em amostras de leite orgânico

Amostras	**Nível 1[1]**		**Nível 2[2]**	
	Na	**K**	**Na**	**K**
LT0204O	99%	98%	104%	97%
LFAF1105O	102%	98%	105%	96%
Branco	95%	95%	99%	99%

[1]Nível 1 das amostras: Na: 5 mg L^{-1}, K: 5 mg L^{-1}; Nível 1 do branco: Na:20 mg L^{-1}, K: 10 mg L^{-1}.
[2]Nível 2 das amostras: Na: 10 mg L^{-1}, K: 10 mg L^{-1}; Nível 1 do branco: Na:40 mg L-1, K: 20 mg L^{-1}.
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Os valores de recuperação encontrados para o Na e K em todas as amostras estavam de acordo com os valores de recuperações encontrados na literatura (AOAC, 2016; Oreste *et al.*, 2016). Logo é possível afirmar que o método tem boa exatidão.

Por fim, o desempenho do método foi avaliado através do cálculo do erro relativo, utilizando as concentrações obtidas pela digestão da amostra certificada e comparando-as com as concentrações do certificado da CRM, como é apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Erro relativo e concentrações de Na e K obtidas para a CRM 1549

Testes	Concentração Na (%)[1]	Erro Relativo (%)	Concentração K (%)[1]	Erro Relativo (%)
Teórico	0,497 ± 0,010[(a)]		1,69 ± 0,03[(a)]	
Método	0,444 ± 0,030	-12,05	1,49 ± 0,034	-11,76%

[1]Concentração determinada = média ± intervalo de confiança = $\frac{t*s}{\sqrt{n}}$, em que s é o desvio-padrão, n é o número de replicatas e t é o parâmetro de *Student* (α=0,05; n=3).
Fonte: (a) National Institute of Standards & Technology (2006) (adaptado pela autora). Elaborado pela autora (2022).

Estes valores de erro, um pouco acima do desejado para o método, podem ser justificados devido ao fato de que a massa utilizada para o preparo da amostra certificada foi abaixo da massa recomendada pelo fabricante. Inclusive, a amostra certificada estava com a validade ultrapassada. Logo, devido a massa menor as características da amostra podem não ter correspondido a realidade da amostra original, afetando as concentrações encontradas dos seus constituintes. Por isso, optou-se por estimar a exatidão do método com base nos testes de adição e recuperação de analito, nos quais foram utilizadas as amostras coletadas.

É importante ressaltar que, com o intuito de reavaliar o erro relativo, buscou-se refazer o preparo de amostras da CRM utilizando a massa indicada pelo seu fabricante, porém, devido a logística de uso equipamento, essa reanálise não foi possível. Ademais, é importante destacar que a amostra certificada utilizada não é composta por gordura e ao fim da sua digestão não houve partículas sólidas residuais. Isto corrobora com o fato de que o sólido residual das amostras em estudo seja proveniente gordura, a qual, por estar em concentrações altas, não pôde ser completamente decomposta nas condições de digestão estabelecida.

5.4 ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO

Considerando as concentrações esperadas para Ca (1.200 mg kg^{-1}) e Mg (130 mg kg^{-1}) em leite fluido (Fox; Mcsweeney, 1998) e Ca (9.000 mg kg^{-1}) e Mg (400 mg kg^{-1}) em leite em pó (Oreste *et al*., 2016; Augusto *et al*., 2017), e as faixas de trabalho estabelecidas para ambos analitos, a diluição da solução amostral para determinação dos minerais de leite em pó e liofilizados foram feitas do mesmo modo que aquelas para determinação de K. Já para as amostras de leite fluido utilizou-se o digerido concentrado, assim como para determinação de Na.

A Faixa de trabalho dos métodos para determinação de Ca e Mg foram ajustadas a partir de testes iniciais com diferentes concentrações dos analitos. A partir disso, foram realizados os testes para análise da linearidade da curva, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados estatísticos para análise de regressão linear referente às curvas analíticas de Mg e Ca

Mg		
Faixa Linear de Trabalho	0,3 - 1,5 mg L^{-1}	
Teste de Cochran	Qcalc= 0,478	Qtab= 0,616
Falta de Ajuste	Ffaj-calc= 2,176	Ffaj-tab= 3,26
Regressão	Freg-calc= 8926	Freg-tab= 4,49
R^2 -Ajustado	0,998	
Equação da Reta	y = (0,4718 ± 0,0050) x + (0,1105 ± 0,0045)	
Ca		
Faixa Linear de Trabalho	4 - 16 mg L^{-1}	
Teste de Cochran	Qcalc= 0,400	Qtab= 0,616
Falta de Ajuste	Ffaj-calc= 0,631	Ffaj-tab= 3,26
Regressão	Freg-calc= 6230	Freg-tab= 4,49
R^2 -Ajustado	0,997	
Equação da Reta	y = (0,838 ± 0,0016) x + (0,0556 ± 0,0108)	

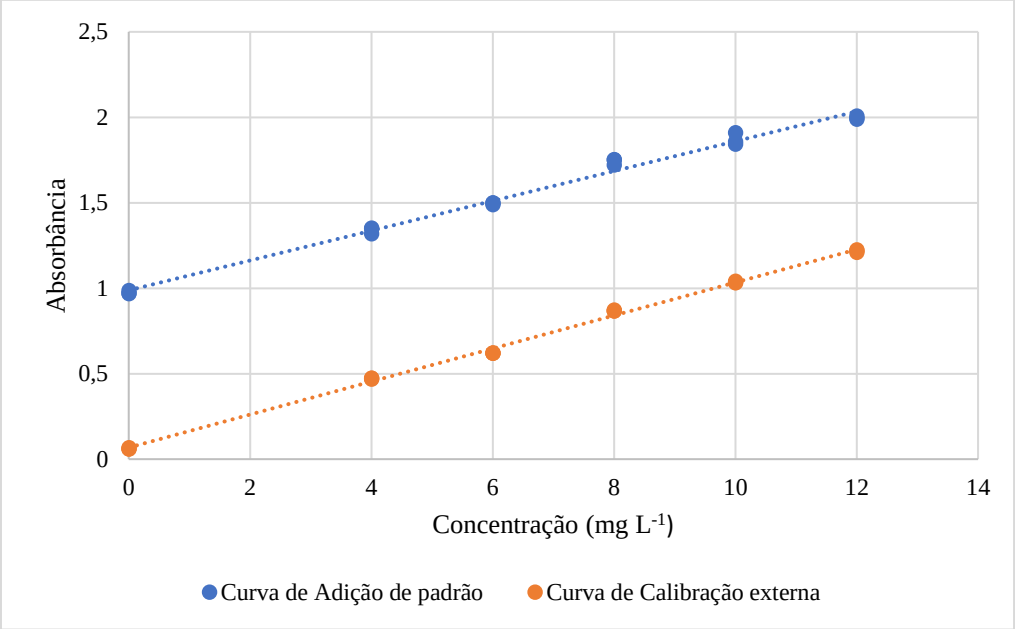
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Assim, através da comparação dos valores de Q do teste de Cochran, tanto para Ca quanto para Mg, foi possível concluir que não existe diferença significativa entre as variâncias,

pois os valores obtidos para $Q_{calculado}$ foram menores do que os para $Q_{tabelado}$, o que ressalta a homocedasticidade dos dados. Além disso, para ambos analitos, os resultados dos testes ANOVA concluíram que não há falta de ajuste do método ($F_{calculado} < F_{tabelado}$) e que a regressão é altamente significativa ($F_{calculado} >>> F_{tabelado}$).

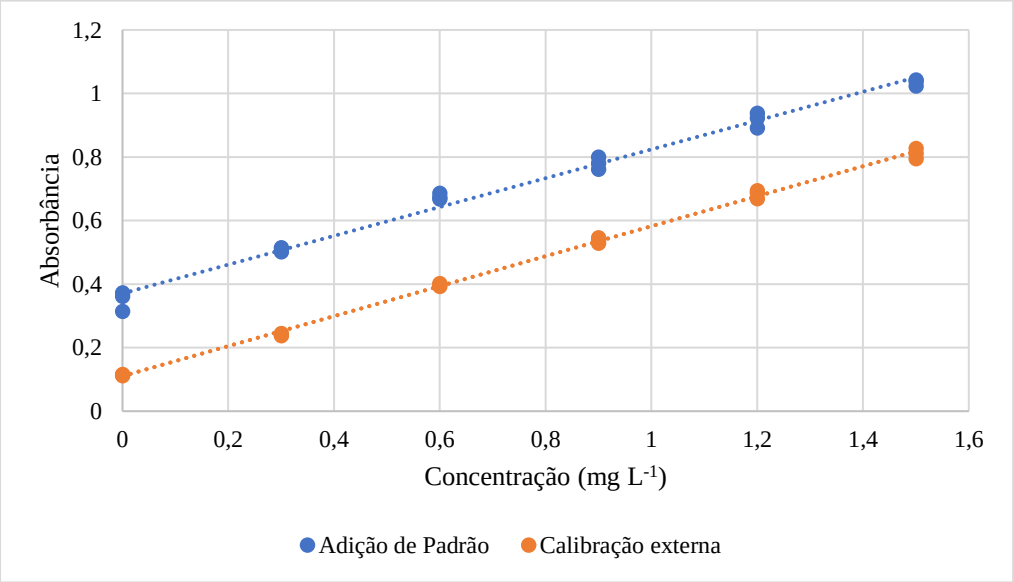
Para o efeito matriz, foram comparadas as curvas de calibração externa no branco de reagentes e a curva de adição de padrão em amostras misturas de leite cru orgânico e convencional liofilizado, como mostra o Gráfico 3 e o Gráfico 4.

Gráfico 3 - Comparação das curvas de adição de padrão e curvas de calibração externa no branco de reagentes para o Ca



Equação da reta de calibração externa: y = 0,0966x + 0,0677; R^2 = 0,9977
Equação da reta de adição de padrão: y = 0,0872x + 0,988; R^2 = 0,991
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Gráfico 4 - Comparação das curvas de adição de padrão e curvas de calibração externa no branco de reagentes para o Mg



Equação da reta de calibração externa: y = 0,4718x + 0,1105; R^2 = 0,9982
Equação da reta de adição de padrão: y = 0,4535x + 0,3706; R^2 = 0,9902
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A partir de um teste *t* a 95% de confiança, comparou-se os coeficientes angulares das curvas de calibração externa e adição de padrão para Ca e Mg *(*Ca*:* $t_{tabelado}$= 12,71 > $t_{calculado}$ = 1,41*;* Mg: $t_{tabelado}$= 12,71 > $t_{calculado=}$ 1,41), concluindo que não há diferenças

significativas entre elas. Sendo assim, não há interferência no sinal reposta, o que comprova que não há efeito matriz.

O LOD e LOQ instrumental foram calculados para o método desenvolvido e a partir deles o LOD e LOQ do método para amostras no estado líquido e sólido foram obtidos, como mostra a Tabela 13.

Tabela 13 - LOD e LOQ instrumental e do método para a determinação de Mg e Ca por F AAS

LOD			
	Instrumental (mg L^{-1})	Método (mg kg^{-1})	
		Amostra Sólida	Amostra Líquida
Ca	0,08	9	16
Mg	0,01	10	2
LOQ			
	Instrumental (mg L^{-1})	Método (mg kg^{-1})	
		Amostra Sólida	Amostra Líquida
Ca	0,26	246	49
Mg	0,03	30	6

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os limites de detecção e quantificação do método quando as amostras estão em estado sólido e líquido são diferentes, pois os fatores de diluição são distintos. Em todos os casos os limites calculados estão abaixo das concentrações dos analitos nas amostras, o que demonstra que o método é adequado para determinação de Ca e Mg em amostras de leite fluido ou em pó.

A exatidão do método para determinação de Na e K em leite por F AES foi realizado apenas para amostras de leite cru convencional e orgânico liofilizado, devido a indisponibilidade do equipamento. Já a exatidão do método para determinação de Ca e Mg em leite por F AAS, foi feita para amostras de leite cru convencional e orgânico liofilizado; leite UHT integral e desnatado, convencional e orgânico; leite em pó integral convencional e orgânico; leite em pó desnatado convencional; e leite pasteurizado integral convencional. A exatidão do método foi avaliada por meio de testes de adição e recuperação das amostras com o analito em diferentes concentrações, conforme apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de recuperação para Ca e Mg em amostras de leite submetidas ao preparo de amostras

Amostra	Nível 1[1]		Nível 2[2]	
	Mg	Ca	Mg	Ca
LLMIXCRUCO	100%	97%	98%	98%
LFPIC	105%	102%	103%	100%
LFMIXUHTICO	103%	98%	101%	99%
LFMIXUHTDCO	103%	102%	103%	98%
LPÓMIXICO	97%	101%	102%	98%
LPÓDC	102%	102%	101%	103%
BRANCO	96%	103%	95%	99%

[1]Nível 1 das amostras: Mg: 0,3 mg L^{-1}, Ca: 1,0 mg L^{-1}; Nível 1 do branco: Mg:0,5 mg L^{-1}, Ca: 6,0 mg L^{-1}.
[2]Nível 2 das amostras: Mg: 0,6 mg L^{-1}, Ca: 3,0 mg L^{-1}; Nível 2 do branco: Mg:0,8 mg L^{-1}, Ca: 10,0 mg L^{-1}.
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os resultados obtidos para recuperação de ambos analitos em todas as amostras estão de acordo com os valores encontrados na literatura utilizando métodos semelhantes (AOAC, 2016; Oreste *et al*., 2016). Os desvios padrões obtidos tanto para precisão quanto para precisão intermediária para Ca e Mg foram abaixo de 4%, estando de acordo com os padrões aceitos (AOAC, 2016). A partir disso conclui-se que o método estabelecido tem boa exatidão e alta precisão.

5.5 DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E MAGNÉSIO NAS PARTÍCULAS SÓLIDAS NÃO DECOMPOSTAS PELA DIGESTÃO ÁCIDA

As partículas sólidas não decompostas nos digeridos finais provém de digestões incompletas, que de acordo com Krug e Rocha (2019), quando em sistemas abertos, proteínas e gorduras podem gerar resíduos orgânicos que não conseguem ser decompostos pelo HNO_3 em temperaturas abaixo de 200 °C. Logo esta matéria orgânica que não consegue ser digerida pelo processo de digestão utilizado, gera um teor de carbono residual, o qual pode ser visível a olho nu ou pode estar dissolvido na solução digerida (Krug; Rocha, 2019).

Logo, com o intuito de avaliar se existiam analitos retidos no sólido, estes sólidos foram solubilizados em etanol a 40 % (v/v), uma vez que que a gordura do leite é solúvel neste tipo

de álcool (Brasil, 2006). Porém não foi possível determinar a concentração de minerais presentes neles, pois as concentrações estavam abaixo dos limites de detecção do método para determinação de Ca e Mg. A partir disto é possível concluir que não há uma concentração de Ca e Mg significativa retida (ou presente) no sólido residual.

Deste modo é possível concluir também que mesmo a digestão sendo incompleta, ela é adequada para determinar, quantitativamente, os teores de Na, K, Ca e Mg em leite.

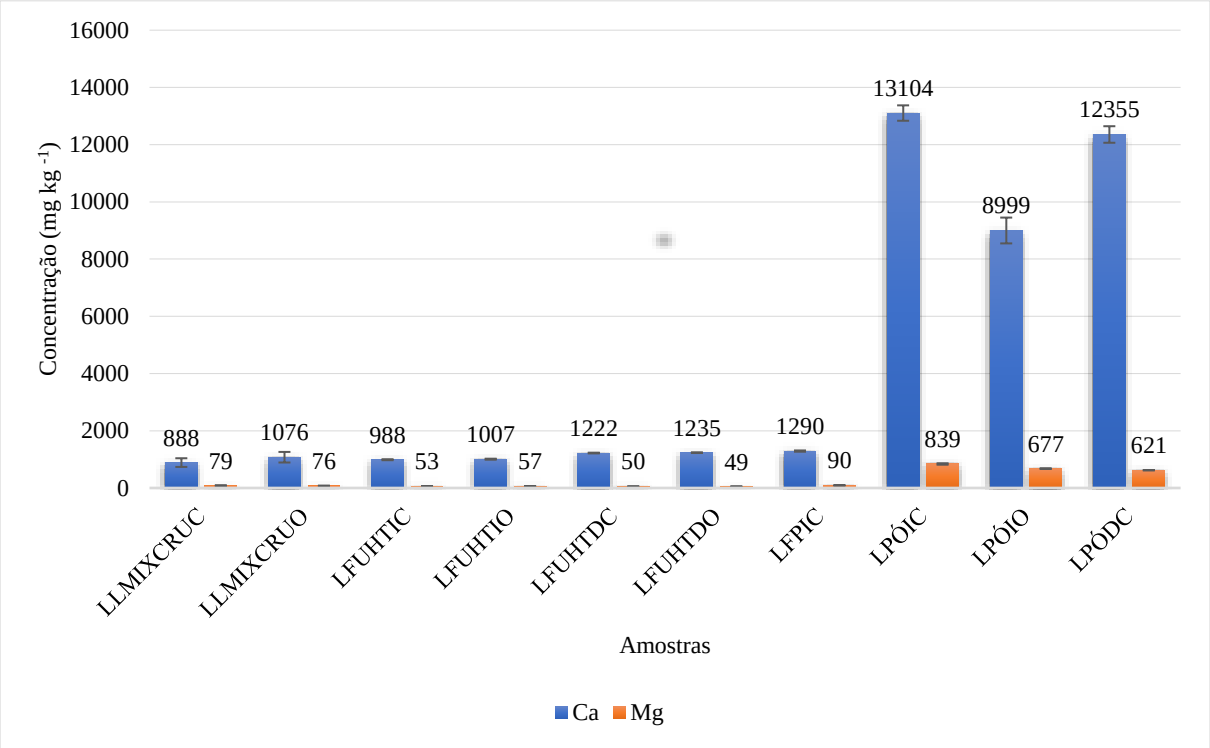
5.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após validação do método estabelecido, ele foi aplicado para todas as amostras coletadas. A determinação de Na e K ocorreu apenas para as amostras individuais de leite cru liofilizadas, enquanto para Ca e Mg a determinação ocorreu para todas as amostras. É importante considerar que foi feita a conversão das concentrações das amostras liofilizadas, considerando a quantidade de água perdida durante o processo de liofilização, para o leite em sua constituição original.

5.6.1 Determinação de Ca e Mg em diferentes tipos de leite

As concentrações de Ca e Mg nos diferentes tipos de leite analisados por F AAS podem ser vistas no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Concentração de Ca e Mg em diferentes tipos de leite



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As amostras apresentam diferentes níveis de concentração destes minerais, visto que estão em diferentes estados, leite fluido e sólido. A partir disso é possível concluir que o método é eficiente para determinação de Ca e Mg em amostras de leite cru, pasteurizado, UHT e em pó, sendo estes dois últimos integrais ou desnatados.

Comparando-se a concentração de Ca e Mg de todas as amostras, não é possível afirmar que exista uma diferença entre as concentrações dos diferentes analitos nos leites de diferentes tipos de manejo (orgânicos e convencional). Apesar disso, como o método se mostrou adequado para determinação de Ca e Mg nestas amostras, ele poderá ser utilizado para determinação destes analitos em um estudo mais representativo da comparação da composição do leite orgânico e convencional. Estudo no qual, além de um número maior de amostras, também poderia incluir um número maior de variáveis, ou seja, de parâmetros analíticos a serem investigados.

Quando se compara as concentrações de cálcio e magnésio de leite em pó integral convencional (LPÓIC) e orgânico (LPÓIO) é possível observar uma variação de cálcio (DPR=26%) maior do que a de Magnésio (DPR=15%), isto pode ser explicado pelo fato de que o LPÓIC, assim como LPÓDC, diferentemente de LPÓIO, é fortificado com este mineral, sendo assim rico em cálcio. Enquanto isso, a concentração de magnésio em ambas amostras, assim como em LPÓDC não passa pelo processo de fortificação.

Dentre os leites fluidos, os que apresentaram maiores concentrações de Ca foram o leite pasteurizado (LPIC), seguido pelo leite UHT desnatado orgânico (LFUHTDO) e desnatado (LFUHTDC), seguido pelo leite cru orgânico (LLMIXCRUO), leite UHT Integral Orgânico (LFUHTIO), leite UHT Integral convencional (LFUHTIC) e Leite cru convencional (LLMIXCRUC). Já para Mg, o leite pasteurizado apresentou maior concentração, seguido pelo leite cru de ambos manejos e leite UHT integral e desnatado de ambos manejos. Isto demonstra que o tratamento térmico não tem a capacidade de alterar a concentração destes minerais no leite.

Ademais, quando se compara as concentrações de Ca do leite em pó, determinadas neste trabalho, com aquela dos rótulos – conforme apresenta a Tabela 15 – foi possível perceber que os valores de concentração encontrados estão próximos aos indicados nos respectivos rótulos, evidenciando que as concentrações reportadas são confiáveis.

Tabela 15 - Comparação entre as concentrações de cálcio em leites em pó comerciais analisadas

Amostra de Leite em pó	**Concentração de Ca (mg kg^{-1}) no rótulo**	**Concentração de Ca (mg kg^{-1})[1] determinada**
Integral Convencional	15.200	13.104 ± 602
Integral Orgânico	9.800	8.999 ± 452
Desnatado Convencional	13.000	12.355 ± 289

[1]Expresso como Média ± DP; DP=desvio-padrão (n= 3 replicatas);
**Todos os DPR das amostras individuais foram menores do que 6 %.
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.6.2 Determinação de Na, K, Ca e Mg em leite cru orgânico e convencional

Na Tabela 16 e Tabela 17 são apresentadas as concentrações de Na, K, Ca e Mg em leite cru de diferentes fazendas de manejo convencional.

Tabela 16 - Concentração de Na, K, Ca e Mg em leite cru convencional

Amostra	Na (mg kg^{-1})[1]	K (mg kg^{-1})	Ca (mg kg^{-1})	Mg (mg kg^{-1})
LFS2305C	459 ± 20	1.299 ± 13	1.020 ± 49	96 ± 2
LV2305C	349 ± 19	895 ± 10	697 ± 12	59 ± 2
LD2305C	451 ± 14	1.288 ± 43	946 ± 15	82 ± 3
LS2305C	-	-	744 ± 20	52 ± 1
LI2305C	-	-	1.008 ± 3	55 ± 3
Total	420 ± 62	1.161 ± 230	888 ± 152	79 ± 19

[1]Expresso como Média ± DP; DP=desvio-padrão (n= 3 replicatas);
**Todos os DPR das amostras individuais foram menores do que 6 %.
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 17 - Concentrações de Na, K, Ca e Mg em leite cru orgânico

Amostra	Na (mg kg^{-1})[1]	K (mg kg^{-1})	Ca (mg kg^{-1})	Mg (mg kg^{-1})
LFTL1105O	430 ± 7	915 ± 20	1.040 ± 8	80 ± 3
LFAF1105O	370 ± 5	1.117 ± 14	1.019 ± 3	79 ± 1
LT2704O	414 ± 6	1.316 ± 14	949 ± 16	69 ± 1
LFZ2903O	465 ± 6	1.149 ± 21	956 ± 22	71 ± 1
LVP3103O	336 ± 7	978 ± 43	1.041 ± 50	76 ± 4
LNSO2604O	331 ± 4	946 ± 40	1.487 ± 56	68 ± 1
LRSS2704O	386 ± 3	1.210 ± 50	1.039 ± 4	91 ± 5
Total	390 ± 49	1.099 ± 152	1.076 ± 185	76 ± 8

[1]Expresso como Média ± DP; DP=desvio-padrão (n= 3 replicatas);
**Todos os DPR das amostras individuais foram menores do que 6 %.
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

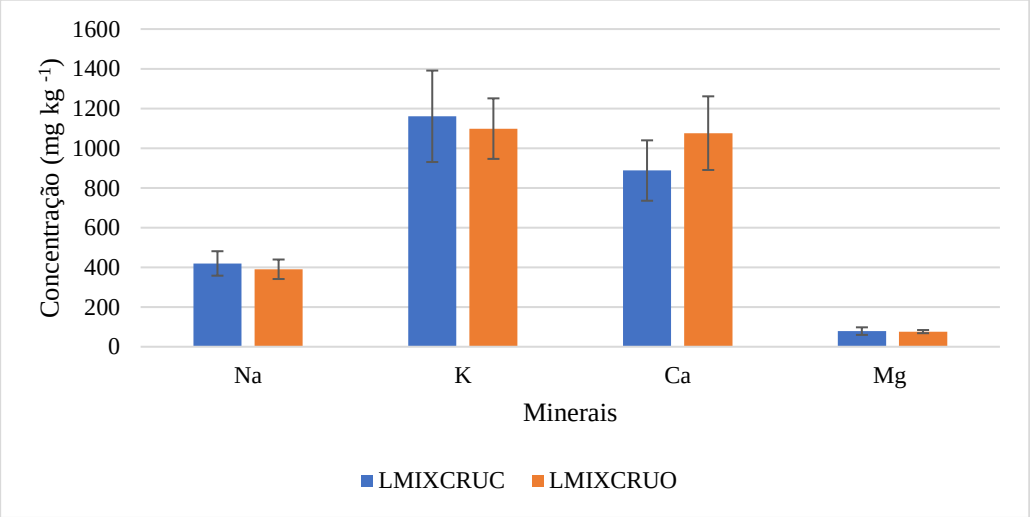
A partir da determinação de Na, K, Ca e Mg nas amostras de leite liofilizado, foi possível notar que o método é qualificado para quantificação destes minerais em leite, uma vez que as concentrações obtidas para ambos tipos de leite estão de acordo com a faixa de valores encontradas na literatura (Fox; Mcsweeney, 1998; Hermansen *et al*., 2005; Gabryszuk; Słoniewski; Sakowsk, 2008; Qin *et al*., 2021).

Ademais, a liofilização das amostras se mostrou adequada à conservação das características minerais das mostras. Além disto, ela pode ser uma aliada no preparo de amostras para determinação de outros minerais em nível traço (por GF AAS, por exemplo), uma vez que para esta técnica a amostra na forma de suspensão e até mesmo sólida pode ser inserida

diretamente no equipamento, sem necessidade de ser submetida a um preparo prévio, como na técnica de F AAS.

Por meio de uma observação e comparação preliminar das médias das concentrações totais de Na, K, Ca e Mg, conforme apresenta o Gráfico 6, é possível notar que as médias de Ca nos leites convencional e orgânico variam entre sim. Logo, torna-se interessante um estudo mais representativo, com um maior número de amostras e também variáveis, para que assim seja possível avaliar a composição mineral do leite orgânico como a do leite convencional no Brasil, de forma mais sistemática e conforme já vem sendo realizado em outros países.

Gráfico 6 - Comparação das médias das concentrações totais de Na, K, Ca e Mg em leite cru convencional e orgânico



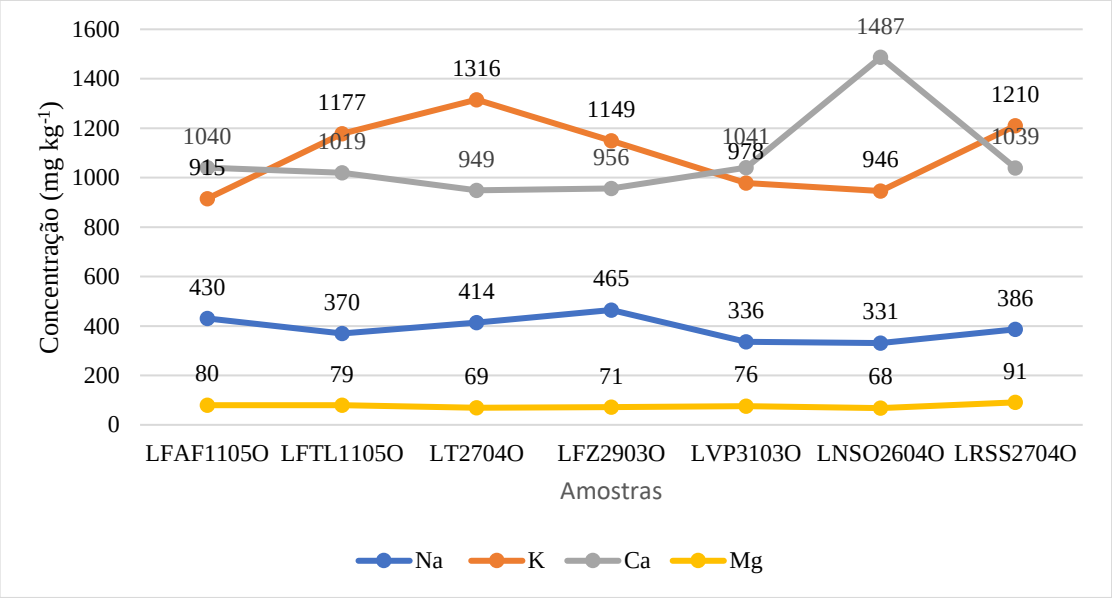
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Por exemplo, Qin e colaboradores (2021), em seu estudo realizado na Inglaterra, observaram que o leite orgânico continha maiores concentrações médias de Ca, K e P do que o leite de manejo convencional, já para outros macrominerias como Na e Mg, não foram encontradas diferenças significativas. Diferentemente disto, Gabryszuk, Słoniewski e Sakowsk (2008) em estudo desenvolvido na Polônia, concluíram através de seu estudo, que a concentração de Ca e P era maior no leite de manejo convencional, já para Na, K e Mg não houve diferença significativa. Rey-Crespo, Miranda e López-Alonso (2013), na Espanha, observaram que o leite orgânico apresentou concentrações estatisticamente significativas menores de cobre, selênio e zinco em comparação ao leite convencional.

Devido ao fato de não haver estudos relacionados à concentração mineral de leite orgânico cru no Brasil e com o intuito de avaliar, de forma preliminar, a variação das

concentrações dos minerais Na, K, Ca e Mg neste tipo de leite, construiu-se o Gráfico 7. Esse gráfico foi baseado nos valores das médias das concentrações dos minerais para as amostras individuais apresentadas na Tabela 17.

Gráfico 7 - Variação dos teores de Na, K, Ca e Mg entre amostras de leite orgânico cru



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Através do gráfico e dos DPR obtidos para a média de todas as amostras (Na= 13%; K= 14%; Ca= 17%; Mg= 10%) percebe-se que as concentrações dos elementos variam, na ordem de 14%, entre as fazendas onde foram feitas as coletas. Dentre os minerais, o Ca teve a maior variação de concentração, seguido pelo K, Na e Mg.

A concentração de cálcio no leite é a que sofre maior variação devido a fatores como a fase de lactação, demanda do filhote, regulação hormonal, dieta da vaca leiteira e influências genéticas. Esse mineral é mais concentrado no início da lactação para atender às necessidades de crescimento dos filhotes. Em contraste, as concentrações de magnésio, sódio e potássio no leite tendem a ser mais estáveis, embora ainda possam ser afetadas por fatores dietéticos e genéticos (Gozález *et al*., 2011; Rosa *et al.*, 2017).

Além disso, a variação das concentrações dos minerais pode ocorrer devido as diferentes condições ambientais, tipo de alimentação e manejo ao qual o gado é submetido, pois as fazendas se localizam em diferentes estados do Brasil. Além, também, do fato de que as coletas foram realizadas em diferentes meses, colaborando com uma pequena alteração das concentrações (Rosa *et al.*, 2017).

Em adição, os dados da Tabela 16 e *Tabela 17* também demonstram que o método desenvolvido neste trabalho é eficiente na determinação destes minerais, uma vez que as concentrações obtidas para os diferentes minerais, estão dentro da faixa esperada para estes analitos (Fox; Mcsweeney, 1998). Quando comparado com outros estudos realizados em outros países utilizando leite orgânico, conforme apresentado na Tabela 18 é possível concluir que as variações ocorrem regionalmente, o que vai de encontro aos valores encontrados neste trabalho.

Tabela 18 - Concentração de Na, K, Ca e Mg em leite orgânico de diferentes países

	Minerais				
País	**Na** (mg kg^{-1})	**K** (mg kg^{-1})	**Ca** (mg kg^{-1})	**Mg** (mg kg^{-1})	**Referência**
Inglaterra	345	1.384	1.050	95	Qin *et al.*, 2021
Dinamarca	410	1.130	1.150	120	Hermansen *et al.*, 2005
Polônia	472	920	700	66	Gabryszuk; Słoniewski; Sakowsk, 2008
Brasil	390	1.099	1.076	76	Este estudo

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As concentrações dos minerais obtidas para o leite orgânico neste trabalho estão concordantes com aqueles encontrados na literatura, conforme mostrado na Tabela acima. Porém, é importante ressaltar que para que um estudo da caracterização da composição do leite orgânico no Brasil possa ser representativo, além de um número de amostras maior, necessita-se aumentar também o número de variáveis, ou seja, de parâmetros analíticos a serem investigados.

5.7 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE LEITE CRU ORGÂNICO

As amostras de leite orgânico cru liofilizados também foram submetidas a caracterização de sua composição centesimal. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Caracterização da composição centesimal das amostras de leite orgânico cru

Amostras	Gordura (%) m/m	Proteína (%) m/m	Cinzas (%) m/m	Extrato Seco (%) m/m	Extrato Seco Desengordurado (%) m/m
LFSNO	4,34	2,99	0,73	13,38	9,03
LFO105O	3,83	2,96	0,73	13,37	9,53
LT2704O	3,02	2,85	0,67	12,29	9,28
LFZ2903O	3,50	2,67	0,73	12,32	8,82
LVP3103O	3,22	2,68	0,69	11,65	8,43
LNSO2604O	3,23	3,01	0,65	11,63	8,39
LRSS2704O	3,40	3,03	0,68	12,27	8,89

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Apesar da caracterização da composição centesimal das amostras terem sido realizadas utilizando leite liofilizado, as concentrações encontradas para os diferentes componentes do leite estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (Fox; Mcsweeney, 1998).

Garcia, Couto e Ferreira (2014), em seu estudo realizado com leite orgânico proveniente de uma propriedade do Distrito Federal, encontraram teores de gordura (3,66%), extrato seco desengordurado (9,1%) e proteína (3,4%) semelhantes a este trabalho. Logo, isto demonstra que a liofilização é eficiente para conservar as amostras de leite, sem que elas percam suas características físico-químicas, podendo ser utilizada para conservar amostras de leite a longo prazo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método estabelecido utilizou de duas técnicas espectrométricas bem estabelecidas para determinação dos minerais Na, K, Ca e Mg, a F AES e a F AAS. Este método apresentou figuras de mérito adequadas para a quantificação dos analitos como boa exatidão, precisão, LOD e LOQ abaixo das concentrações a serem determinadas e não teve efeito de matriz significativo. Possibilitando a determinação, de maneira eficiente, destes macrominerais em leite fluído ou sólido de diferentes tipos (cru, UHT, pasteurizado e em pó), provenientes de manejos convencionais.

Em relação ao preparo de amostra, o procedimento otimizado apresentou como principais vantagens a utilização da chapa de aquecimento, equipamento acessível e o uso da mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio em quantidades otimizadas. Além disso, a digestão das amostras levou cerca de 30 minutos, um tempo relativamente curto quando comparado a métodos que utilizam o bloco digestor.

A alta concentração de gordura e proteínas nas amostras não interferiram na eficiência do preparo de amostras desenvolvido, pois o método estabelecido foi capaz de determinar os minerais presentes nas amostras de leite, estando as concentrações encontradas de acordo com a literatura e respaldadas por ensaios de validação. Sendo assim, o método se mostra confiável para quantificação destes minerais em leite orgânico e convencional, sejam fluidos ou na forma sólida, integral ou desnatado.

O desenvolvimento deste método para avaliação da composição de Na, K, Ca e Mg em leite, se destaca devido sua adequação comprovada tanto para leites convencionais como orgânicos. E como no Brasil ainda não existem trabalhos que abordem o estudo da composição mineral do leite oriundo do manejo orgânico, este método pode ser utilizado para auxiliar na sua caracterização mineral.

Por fim, por meio deste estudo foi possível ter um conhecimento preliminar sobre a concentração de Na, K, Ca e Mg no leite orgânico produzido no Brasil, porém é necessário ressaltar que para ser representativo, é necessário que seja feito um estudo mais abrangente, se possível, considerando todas as unidades produtoras de leite orgânico reconhecidas no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANCIO, O. M. S. **A importância do consumo de leite no atual cenário nutricional brasileiro**. Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN). São Paulo: SBAN, 2015.

AMARO-LÓPEZ, M. A. *et a*l. Tratamiento de las matrices lácteas para la determinación de trazas metálicas por absorción atómica. **Alimentaria,** p. 71-78, 1996.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017**. Ministério da Saúde. Brasília, 2017.

AOAC - International, Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F). Gaithersburg: AOAC International, 2016.

ARYAL, K. P. et al. Consumers' willingness to pay for organic products: a case from Kathmandu valley. **Journal of Agriculture and Environment**, v. 10, p. 15-26, 2009.

AUGUSTO, A. S. *et al*. Calibration strategies for the direct determination of Ca, K, and Mg in commercial samples of powdered milk and solid dietary supplements using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS). **Food research international**, v. 94, p. 72-78, 2017.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer Experimentos**: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e Indústria. 2 ed. Campinas: ABEU, 2001.

BELITZ, H. D.; GROSH, W.; SCHIBERLE, P. **Food Chemistry**. 3 ed. Heidelberg: Springer, 2004.

BLOKSMA, J. *et al*. Comparison of organic and conventional raw milk quality in the Netherlands. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 26, n. 1, p. 69-83, 2008.

BRASIL **Instrução Normativa nº 53, de 1° de outubro de 2018**. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Brasília 01 out. 2018b. Disponível em:< https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/45374372/do1-2018-10-16-instrucao-normativa-n-53-de-1-de-outubro-de-2018-45374042>. Acesso em 02 ago. 2023.

BRASIL. **Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018**. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Brasília 30 nov. 2018a. Disponível em:< https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076>. Acesso em 16 maio 2021.

BRASIL. Mapa do Leite: Políticas públicas e privadas para o Leite. MAPA – Ministério da agricultura e Pecuária. 2022. Disponível em:<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/portal-do-leite/mapa-do-leite/>. Acesso em: 08 dez. 2022.

BRASIL. **Instrução Normativa n° 68, de 12 de dezembro de 2006**. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p. 8, 14 dez. 2006.

BRASIL. **Portaria nº 52, de 15 de março de 2021**. Brasília, ano 2021. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA). Brasília 15 mar. 2021. Disponível em:< https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-52-de-15-de-marco-de-2021-310003720>. Acesso em 25 maio 2021.

BRATZ, V. F. **Avaliação de pastos com capim elefante sob os sistemas de produção orgânico e convencional**. Orientador: Clair Jorge Olivio. 2016. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.

EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química.** 1 ed. São Paulo: Blucher, 1972.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**. Roma: FAO, 2013.

FIŠERA, M. *et al*. Influence of composition of feed and lactation period on mineral composition of Mare's. **Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences**, vol. 12, n 1, p. 216-225, fev. 2018.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. Irlanda: Blackie Academic & Professional, 1998.

GABRYSZUK, M. *et al*. Content of mineral elements in milk and hair of cows from organic farms. **Journal of Elementology**, Wólka Kosowska, v. 15, n. 2, p. 259-267, 2010.

GABRYSZUK, M.; SŁONIEWSKI, K.; SAKOWSK, T. Macro-and microelements in milk and hair of cows from conventional vs. organic farms. **Animal Science Papers and Reports**, v. 26, n. 3, p. 199-209, 2008.

GARCIA, M. E. T. A.; COUTO, E. P.; FERREIRA, M. de A. Leite orgânico produzido no distrito federal: avaliação da qualidade físico-química e microbiológica. **Atas de Saúde Ambiental-ASA**, v. 2, n. 3, p. 16-24, 2014.

GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. *In*: Anais do **Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre, v. 1, p. 31-47, 2003.

GONZÁLEZ, F. D. *et al*. **Qualidade do Leite Bovino: variações no trópico e no subtrópico:** Variações na composição do leite no subtrópico brasileiro. Passo Fundo: UFP Editora, 2011.

HERMANSEN, J. E. *et al.* Major and trace elements in organically or conventionally produced milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 3, p. 362-368, 2005.

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

INMETRO - Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos: Documento de caráter orientativo. Coordenação Geral de Acreditação. DOQ-CGCRE-OO8. 2020.

ISO- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. International Dairy Federation (IDF). 2021. Disponível em:<https://www.iso.org/organization/9509.html>. Acesso em 06 out. 2021.

ISO- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. 1994. Disponível em:<iso.org/standard/11835.html>. Acesso em 10 out. 2022.

KIRA, C. S. **Estudo da composição mineral e dos elementos traço essenciais em amostras de leite e produtos lácteos por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido e análise por ativação com nêutrons**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências em Tecnologia Nuclear) - Autarquia associada a Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

KRUG, F. J., ed., **III Workshop sobre preparo de Amostras - Métodos de Decomposição de Amostras**, São Carlos, 23-27/10/2000. 149 p.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar. São Paulo: *Edit*SBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2 ed., 2019.

LEIRA, M. H.; *et al*. Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão. **PUBVET**, v. 12, n. 05, p.1-13, maio 2018.

LIMA, J. F. O. **Composição mineral do leite humano em diferentes estágios de lactação**. 2009. Trabalho de conclusão de curso (Pós graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

LISBOA, T. P.; SOUSA, R. A. de. Sodium and potassium content in sports supplements based on whey protein. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 1, p. 34-44, 2020.

LUKASKI, H. C. Vitamin and mineral status: effects on physical performance. **Nutrition**, v. 20, n. 7-8, p. 632-644, 2004.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal.** 1 ed., Brasília, 2022.

MARENJAK, T. S.; POLJIČAK-MILAS, N.; DELAŠ, I. Biološki aktivne tvari u kravljem mlijeku i njihov učinak na zdravlje. **Mljekarstvo:** časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, v. 56, n. 2, p. 119-137, 2006.

MEDEIROS, F. C. **Caracterização Físico-Química do Leite UHT Desnatado comercializado em um Supermercado na cidade de Campina Grande - Paraíba**. 2018. Monografia (Bacharelado em Química Industrial) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina grande, Paraíba, 2018.

MIRANDA, J. E. C. de; DINIZ, F. H.; ANDREOLI, A. F. Planejamento da atividade leiteira: sugestões para os produtores iniciantes. **Embrapa-Comunicado técnico 56**, Juiz de Fora, ano 2008, n. 1, p. 1-12, 1 dez. 2008.

MORAES, I. A. Fisiologia da glândula mamária. **Fisiovet**, 2016. Disponível em:<http://www.uff.br/fisiovet/lactacao.pdf>. Acesso em 05 jun. 2021.

MULINARI, E. L.; ROSOLEN, M. D.; ADAMI, F. S. Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado produzido no Rio Grande do Sul. **Revista Caderno Pedagógico,** v. 14, n. 1, p. 28-35, 2017.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for sodium and potassium**.Washington, DC: The National Academies Press, 2019.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS & TECHNOLOGY. Certificate of Analysis - Standard Reference Material® 1549 - Non-Fat Milk Powder. 2012.

NETTO, F. G.; BRITO, L. G.; FIGUEIRÓ, M. R. Manejo da vaca leiteira. **Embrapa Rondônia**. Comunicado Técnico 318, 1 ed., Porto velho, 2006.

NICHOLAS, P. K. *et al*. Organic Dairy Production: A review. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 22, n. 3, p. 217-249, 2004.

NOGUEIRA, AR de A. Preparo de amostras. ***In*:VIII Encontro Nacional sobre métodos dos Laboratórios da Embrapa**. Jaguariúna, 2003.

ORDÓNEZ, J. A,*et al*. **Tecnologia de Alimentos**: Alimentos de Origem Animal. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ORESTE, E. Q. *et al*. 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**, v. 9, n. 3, p. 777-784, 2016.

PARK, C.S.; LINDBERG, G.L. Glândula mamária e lactação. *In:* REECE, W.O. **Dukes, Fisiologia dos animais domésticos**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, v. 30, n. 6, p. 619-627, 2014.

PIETRZAK-FIEĆKO, R.; KAMELSKA-SADOWSKA, A. M. The comparison of nutritional value of human milk with other mammals' milk. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1404, 2020.

QIN, N. *et al*. Macromineral and trace element concentrations and their seasonal variation in milk from organic and conventional dairy herds. **Food Chemistry**, v. 359, p. 129865, 2021.

REY-CRESPO, F.; MIRANDA, M.; LÓPEZ-ALONSO, M. Essential trace and toxic element concentrations in organic and conventional milk in NW Spain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 513-518, 2013.

RIBEIRO, A. S. *et al*. Analysis of powdered coffee and milk by ICP OES after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. **Microchimica Acta**, v. 141, n. 3, p. 149-155, 2003.

ROSA, P. P.et al. Fatores etiológicos que afetam a qualidade do leite e o Leite Instável Não Ácido (LINA). **REDVET:** Revista Electrónica de Veterinaria, v. 18, n. 12, p. 1-17, 2017.

ROSSI, G. A. M. *et al*. Fluxograma de Produção de Leite e Derivados. *In*: VIDAL, A. M. C; NETTO, A. S. **Obtenção e Processamento de Leite e Derivados**. Pirassununga: [*s. n.*], 2018. cap. 06, p. 174-220.

SAKOWSKI, T. Z. *et al*. Influence of Lactation Stage on Selected Blood Parameters and Biological value of Cow Milk during Pasture Season in Organic System of Production.**.** **Animal Science**, v. 54, n. 1, 2015.

SCHIEFERDECKER, M. E. M.; THIEME, R. D.; HAUSCHILD, D. B. **Vitaminas, Minerais e Eletrólitos**: Aspectos fisiológicos, Nutricionais e Dietéticos. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.

SKOOG, D. A.*et al*. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. Thomson, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**, ed. 5, Bookman, São Paulo, 2002.

SOUSA, R. A.; CAMPOS, N. S.; ORLANDO, R. Preparação de amostras para análise elementar. **Apostila da disciplina de Química Analítica Avançada –** Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Juiz de Fora, 2015.

SOUZA, G. C. *et al.* Observatório do Leite Orgânico: contribuições para o desenvolvimento da cadeia, da inteligência territorial e de subsídios à elaboração de políticas públicas. *In:* Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado De Leite-PIBIC/CNPq 2021/2022, 2022, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2022.

VAHČIĆ, N. et al. Essential minerals in milk and their daily intake through milk consumption. **Mljekarstvo:** časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, v. 60, n. 2, 2010.

VIDAL-MARTINS A. M. C., ROSSI JÚNIOR O. D., REZENDE-LAGO N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do Bacillus cereus em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

VON HOHENDORFF, J. Como escrever um artigo de revisão de literatura. *In*: KOLLER, S. H.; DE PAULA COUTO, M. C. P; VON HOHENDORFF, J. **Manual de Produção Científica**. Porto Alegre: Penso, 2014. cap. 2, p. 39-54.

WATTIAUX, M. A. Composição do leite e seu valor nutricional. **Universidade do Leite: Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional.** University of Wisconsin-Madison, 2014b.

WATTIAUX, M. A. Secreção do leite no úbere da vaca de leite. **Universidade do Leite: Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional.** University of Wisconsin-Madison, 2014a.

WELZ, Bernhard; SPERLING, Michael. **Atomic absorption spectrometry**. John Wiley & Sons, 2008.

WOOD, Roger. How to validate analytical methods. **TrAC:** Trends in Analytical Chemistry, v. 18, n. 9-10, p. 624-632, 1999.

ZWIERZCHOWSKI, G.; AMETAJ, B. N. Mineral elements in the raw milk of several dairy farms in the Province of Alberta**. Foods**, v. 8, n. 8, p. 345, 2019.