



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

ALLANA SOBRINHO DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO
EM SISTEMA FECHADO PARA ANÁLISE ELEMENTAR DE QUEIJOS
BRANCOS**

Salvador - BA

2022

ALLANA SOBRINHO DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO
EM SISTEMA FECHADO PARA ANÁLISE ELEMENTAR DE QUEIJOS
BRANCOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadores:
Profa. Dra. Maria das Graças Andrade Korn
Prof. Dr. Rodolfo de Melo Magalhães Santana

Salvador - BA
2022



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

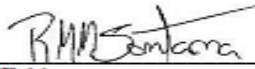



TERMO DE APROVAÇÃO


ALLANA SOBRINHO DOS SANTOS


DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO EM SISTEMA
 FECHADO PARA ANÁLISE ELEMENTAR DE QUEIJOS BRANCOS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,
 Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra Rodolfo de Melo Magalhães Santana 
 Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
 Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Maria das Graças Andrade Korn 
 Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
 Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Daniele Cristina Muniz Batista dos Santos 
 Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
 Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Kelly das Graças Fernandes Dantas 
 Doutorado em Ciências (Química Analítica), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
 Universidade Federal do Pará

Salvador, 14 de dezembro de 2022.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

S237 Santos, Allana Sobrinho dos
Desenvolvimento de procedimentos de decomposição em sistema fechado para análise elementar de queijos brancos/ Allana Sobrinho dos Santos. – Salvador, 2022.
86 f.

Orientador: Prof. Dr Rodolfo de Melo Magalhães Santana
Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Andrade Korn

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Química, 2022.

1. Química Analítica. 2. Alimentos – Teor mineral. 3. Queijos. I. Santana, Rodolfo de Melo Magalhães. II. Korn, Maria das Graças Andrade III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 543

Este trabalho é dedicado à minha mãe Eunice Sobrinho e minha avó Clidenice Sobrinho, que são os maiores exemplos de mulheres guerreiras que conheço e que apesar das dificuldades enfrentadas, sempre me deram o máximo de apoio e me ensinaram que o trunfo vem através dos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças em todos os momentos e nunca ter me deixado desistir

À Professora Dra. Maria das Graças Andrade Korn, pela orientação, contribuições, por ter me confiado a realização desse projeto e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Ao Professor Dr. Rodolfo de Melo Magalhães Santana, pela orientação, atenção, paciência, ensinamentos e confiança depositada desde a iniciação científica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Leila, Pietra, Elys, Diogo, Diego e Leonardo, pelo apoio, colaboração e momentos de descontração.

Aos demais amigos dos laboratórios do departamento de Química Analítica: Rosana, Leilane e Thaís

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e aos professores do Instituto de Química da UFBA pela contribuição para minha formação.

Aos bons amigos que fiz na UFBA e que conseguiram deixar o ambiente acadêmico mais leve.

Aos demais amigos fora da UFBA que torcem por mim e em acompanharam e me incentivaram nessa caminhada.

À minha mãe, Eunice, e minha avó, Clidenice, pelo amor, ensinamentos, por sempre terem confiado no meu potencial e por serem os exemplos de mulheres guerreiras.

Ao meu avô Bento, meu padrasto Osvaldo e meu tio Emerson, por todo apoio, dedicação e por sempre estarem torcendo pelo meu sucesso.

À minha prima, Beatriz, que alegra minha vida desde o seu nascimento, e que me acompanhava nas madrugadas que eu estava escrevendo a dissertação.

RESUMO

O queijo é o derivado lácteo mais consumido e sua popularidade é atribuída ao seu sabor, versatilidade de uso, preço, ampla variedade e valor nutritivo. Recentemente, os consumidores estão preferindo os queijos brancos em vez dos amarelos, devido ao menor teor calórico, no entanto, estudos sobre determinação de seus elementos essenciais são ainda escassos no Brasil. Nesse sentido, este trabalho tem-se por objetivo propor estratégias analíticas para determinação do teor total de Ca, Cu, K, P, Na e Zn em amostras de queijos brancos empregando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), afim de contribuir para o estabelecimento de seus teores nutricionais. Foram propostos os seguintes procedimentos de decomposição ácida: i) por aquecimento condutivo em bloco digestor com sistema fechado; ii) assistida por radiação micro-ondas. Em ambos, os parâmetros de decomposição, a concentração de HNO_3 , tempo e temperatura de decomposição foram otimizados, empregando planejamentos fatoriais completos de dois níveis, para assegurar a máxima eficiência de digestão. Para tanto, 6 mL de HNO_3 foram adicionados as amostras de queijo branco ($m \approx 0,250 \text{ g}$) na presença de 2 mL de H_2O_2 30% ($m \text{ m}^{-1}$). A eficiência da decomposição foi avaliada pelo aspecto visual e teor de carbono dissolvido, além do uso da resposta múltipla. Foi estabelecida como condição ótima de decomposição no bloco digestor: concentração de HNO_3 de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e aquecimento na temperatura de $180 \text{ }^\circ\text{C}$ por 80 minutos. Para o procedimento no forno de micro-ondas foi: concentração de HNO_3 de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e irradiação por 30 minutos na temperatura de $140 \text{ }^\circ\text{C}$. Sob as condições otimizadas, os teores de DOC determinados nos digeridos com o bloco digestor e forno de micro-ondas foram, respectivamente, $1,35 \pm 0,11$ e $1,04 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$. Os procedimentos propostos foram validados pela determinação dos parâmetros de desempenho de acordo com guia validação ANVISA. Eles apresentaram boa exatidão com resultados concordantes ($p < 0,05$) com os certificados no material certificado de referência (NIST 1549a). Ademais, foi constatada boa precisão ($\text{RSD} < 10\%$), com faixas lineares de trabalho adequadas e boa linearidade ($R \geq 0,999$) e ausência de efeito matriz. Os limites de detecção variaram entre 2 (P) a $16 \mu\text{g g}^{-1}$ (Ca) (forno micro-ondas) e 0,3 (Cu) a $14 \mu\text{g g}^{-1}$ (Na) (bloco fechado). Os procedimentos validados foram aplicados na análise de 9 amostras queijos brancos de distintos tipos (mussarela de búfala, minas frescal, ricota, coalho e cottage). Observou-se que as maiores concentrações foram para Ca, seguido por P, Na e K. As menores concentrações foram observadas para o microelemento Cu, seguido por Zn. Foi verificado que o tipo de queijo influenciou na variação dos teores de nutrientes. Ademais, para todos os tipos de queijos, observou-se uma discrepância ($p < 0,05$) entre as concentrações para pelo menos um analito, constatando a falta de uniformidade na composição nutricional. A avaliação da ingestão diária recomendada (IDR), demonstrou que todas as amostras de queijos mussarela de búfala e minas frescal analisadas, podem ser consideradas tanto como fontes de Ca, P e Zn. Em relação ao sódio, apenas a ricota da marca F apresentaram concentrações abaixo do recomendado pela legislação ($>80 \text{ g } 30 \text{ g}^{-1}$), além disso, os maiores desses teores foram significativamente superiores aos declarados nos rótulos.

Palavras-chaves: Queijos brancos, bloco digestor fechado, decomposição assistida por micro-onda, ácido diluído, análise elementar, preparo de amostras, ICP OES

ABSTRACT

Cheese is the most consumed dairy product, and its popularity is attributed to its flavor, versatility of use, price, wide variety, and nutritional value. Recently, consumers have preferred white cheeses over yellow ones because of the lower caloric content. However, studies on determining its essential elements are still scarce in Brazil. In this sense, this work aims to propose analytical strategies for determining the total content of Ca, Cu, K, P, Na, and Zn in white cheese samples using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) in order to contribute to the establishment of their nutritional contents. The following acid decomposition procedures were proposed: i) by conductive heating in a closed digester block; ii) assisted by microwave radiation. In both, the decomposition parameters, HNO₃ concentration, decomposition time, and temperature were optimized, employing two-level full factorial designs, ensuring maximum digestion efficiency. For this purpose, 6 mL of HNO₃ was added to samples of white cheese ($m \approx 0.250$ g) in the presence of 2 mL of 30% H₂O₂ (w w⁻¹). The decomposition efficiency was evaluated by visual appearance and dissolved carbon content, in addition to using multiple responses. The optimal condition for decomposition in the digester block was established: HNO₃ concentration of 2.0 mol L⁻¹ and heating at a temperature of 180 °C for 80 minutes. For the microwave oven procedure, the optimal condition was: HNO₃ concentration of 2.0 mol L⁻¹ and irradiation for 30 minutes at a temperature of 140 °C. Under the optimized conditions, the DOC contents determined in digested with the digester block and microwave oven were 1.35 ± 0.11 and 1.04 ± 0.06 g L⁻¹. The proposed procedures were validated by determining the figures of merit as recommended by ANVISA. They showed good accuracy with concordant results ($p < 0.05$) with the certificates in the certified reference material (SRM NIST 1549a – Powdered milk). Furthermore, good precision was found (RSD < 10%), with acceptable linear working ranges and good linearity ($R \geq 0.999$), and no matrix effect. Limits of detection ranged from 2 (P) to 16 µg g⁻¹ (Ca) (MW procedure) and 0,3 (Cu) to 14 µg g⁻¹ (Na) (closed block). The validated procedures were applied to analyze nine white cheese samples of different types (buffalo mozzarella, minas fresh cheese, ricotta, curd, and cottage cheese). It was observed that the highest concentrations were for Ca, followed by P, Na, and K. The lowest concentrations were observed for the microelement Cu, followed by Zn. It was found that the type of cheese influenced the variation in nutrient content. Furthermore, for all types of cheese, a discrepancy ($p < 0.05$) was observed between concentrations for at least one analyte, confirming the lack of uniformity in nutritional composition. The recommended daily intake (RDI) evaluation showed that all samples of buffalo mozzarella cheese and Minas fresh cheese analyzed could be considered sources of Ca, P, and Zn. Regarding sodium, only the ricotta of F brand had concentrations below the recommended by law (> 80 g 30 g⁻¹). Additionally, these contents were significantly higher than those declared on the labels.

Keywords: White cheeses, closed digester block, microwave-assisted digestion, dilute acid, elemental analysis, sample preparation, ICP OES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Percentual de artigos da área de química analítica nos últimos 5 anos aplicando técnicas multivariadas no preparo de amostra.	25
Figura 2 - Gráfico de Pareto para DOC do planejamento fatorial 2^3 com ponto central para decomposição assistida por micro-ondas.....	43
Figura 3 - Gráfico de superfície de resposta para o DOC para decomposição assistida por micro-ondas em função de (a) temperatura e tempo (b) concentração e tempo e (c) concentração e temperatura.....	44
Figura 4 - Gráfico de Pareto para resposta múltipla do planejamento fatorial 2^3 com ponto central para decomposição assistida por micro-ondas.	45
Figura 5 - Perfis para valores previstos e desejabilidade para o planejamento fatorial 2^3 com DOC e RM para decomposição assistida por micro-ondas.	46
Figura 6 - Gráfico de Pareto para DOC do planejamento fatorial 2^3 com ponto central para decomposição no bloco digestor fechado.	49
Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta para o DOC para decomposição no bloco digestor fechado em função de (a) temperatura e tempo (b) tempo e concentração e (c) temperatura e concentração.	50
Figura 8 - Gráfico de Pareto para RM do planejamento fatorial 2^3 com ponto central para decomposição no bloco digestor fechado.	51
Figura 9 - Perfis para valores previstos e desejabilidade para o planejamento fatorial 2^3 com DOC e RM para decomposição no bloco digestor fechado.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos de decomposição para determinação elementar em amostras de queijo.	22
Tabela 2 - Parâmetros instrumentais para as determinações por ICP OES.	34
Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis (2^3) para otimização do procedimento de decomposição no forno de micro-ondas com cavidade.	36
Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial completo dois níveis (2^3) para otimização do procedimento de decomposição no bloco digestor fechado.	36
Tabela 5 - Programa de aquecimento da decomposição das amostras de queijo em forno de micro-ondas com cavidade.	37
Tabela 6 - Planejamento fatorial 2^3 com a valor de DOC e resposta múltipla para cada procedimento da decomposição assistida por micro-ondas.	42
Tabela 7 - Planejamento fatorial 2^3 com a valor de DOC e resposta múltipla para cada procedimento da decomposição no bloco digestor fechado.	48
Tabela 8 - Coeficientes angulares das curvas analíticas de calibração para o estudo do efeito de matriz dos procedimentos propostos usando soluções padrão em ácido diluído e no meio da amostra.	55
Tabela 9 - Valores de Limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) dos procedimentos propostos de decomposição de queijos no forno de micro-ondas e no bloco digestor fechado comparado com os declarados na literatura.	57
Tabela 10 - Curvas analíticas, faixa de trabalho e coeficiente de correlação após decomposição assistida no micro-ondas e no bloco digestor fechado para a amostra de queijo.	59
Tabela 11 - Resultados do teste de repetitividade (média \pm desvio padrão, n=8) após aplicação dos procedimentos propostos de decomposição assistida por micro-ondas e por aquecimento condutivo.	60
Tabela 12 – Concentração dos analitos ($\mu\text{g g}^{-1}$) após decomposição pelo método de referência e pelos procedimentos propostos (média \pm desvio padrão, n = 3).	61
Tabela 13 - Composição do material de referência certificado, em $\mu\text{g g}^{-1}$, CRM NIST 1549a, após digestão ácida nos procedimentos propostos (média \pm intervalo de confiança, n=3).	62

Tabela 14 - Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) dos analitos nas amostras de queijo após aplicação dos procedimentos propostos (média \pm desvio) (n=3).	64
Tabela 15 - Intervalo de concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de macros e microelemento nos queijos analisados.....	66
Tabela 16 - Teores de nutrientes inorgânicos ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) em amostras dos queijos brancos analisadas e valores declarados na literatura (Continuação).....	68
Tabela 17 - Comparação dos teores de sódio do rótulo e o quantificado no bloco digestor fechado e o percentual de diferença entre eles.	70
Tabela 18 - Faixa de contribuição no IDR para os queijos analisados.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CID - Dispositivo de Injeção de Carga do inglês: “Charge Injection Device”

CRM - Material de Referência Certificado do inglês: “Certified Reference Material”

CV - Coeficiente de variação

DOC - Carbono orgânico dissolvido do inglês: “Dissolved organic carbon”

F AAS – Espectrometria de Absorção Atômica em Chama

GF AAS – Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite do inglês: “Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry”

ICP OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado do inglês: “Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry”

ICP-MS – Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado do inglês: “Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”

IDR - Ingestão diária recomendada

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

HG-AAS - Geração de Hidretos Acoplada à Espectrometria de Absorção Atômica do inglês: “Hydride Generation Atomic Absorption Spectroscopy”

HS-SPME – Microextração em fase sólida por headspace do inglês: “Headspace Solid Phase Microextraction”

LOD – Limite de Detecção do inglês “*Limit of Detection*”

LOQ – Limite de Quantificação do inglês “*Limit of Quantification*”

MP-AES - Espectrômetro de emissão atômica de plasma de microondas do inglês: “Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy”

MRC – Material de referência certificado

PTFE – Politetrafluoretileno

RM – Resposta Múltipla

RSD – Desvio Padrão Relativo do inglês “*Relative Standard Deviation*”

TBCA – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 QUEIJO.....	15
1.2 PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA QUEIJOS.....	17
1.3 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS E OTIMIZAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	24
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
3. EXPERIMENTAL	31
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES.....	31
3.2 AMOSTRAS	32
3.3 INSTRUMENTAÇÃO	32
3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	34
3.4.1 Procedimentos de otimização dos parâmetros dos procedimentos propostos	34
3.4.2. Determinação da acidez residual	37
3.5 VALIDAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS	37
3.5.1. Procedimento do método de referência	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO PROPOSTOS.....	41
4.2 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE DECOMPOSIÇÃO NO MICRO-ONDAS	53
4.2.1 Efeito matriz	54
4.2.2 Limite de detecção e de quantificação	55
4.2.3 Linearidade e faixa linear de trabalho	58
4.2.4 Precisão	60
4.2.5 Exatidão	60
4.3 APLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS PROPOSTOS NAS AMOSTRAS DE QUEIJO BRANCO	62
5. CONCLUSÃO	76
6. REFERÊNCIAS	79

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 QUEIJO

O queijo é um derivado lácteo amplamente consumido mundialmente e que ocupa um espaço cada vez maior no mercado brasileiro, alcançando em 2020 um consumo de cerca de 5,5 quilos por habitante por ano, e estima-se que a demanda em 2021 aumentou aproximadamente 2,6% em comparação com o ano anterior. O Brasil é o quinto maior fornecedor do derivado e Minas Gerais é o maior estado brasileiro produtor, visto que, representa 25% da produção nacional (EMBRAPA, 2021; SOARES; RODRIGO, 2019).

A produção de queijo é uma prática bem antiga, tendo relatos que o consumo vem desde de 7000 a.C. e achados arqueológicos mostram que a fabricação existe há mais de 6000 a.C. (PERRY, 2004). Alguns historiadores alegam que o surgimento desse derivado lácteo adveio do contato do leite com enzimas coagulantes presentes no tecido animal. Isto ocorreu devido a utilização de bolsas de pele ou estômago de animais para a estocagem do líquido, provocando a coagulação e posteriormente a liberação do soro, resultando em uma massa (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

Atualmente, o procedimento de obtenção desse derivado lácteo é normalmente mecanizado e com alta tecnologia, sendo que as etapas do processo envolvem a coagulação do leite através da separação da colhada e do soro, e em seguida ocorre a maturação durante tempos variados de acordo com o tipo. Há também uma adição de aditivos como o sal de cozinha para aperfeiçoar o sabor e o cloreto de cálcio para melhorar a disposição da coagulação (FOX et al., 2017).

Por dispor de uma extensa variedade, chegando em torno de mil, em que a diferenciação dos tipos, em sua maioria, é baseada em detalhes regionais, climáticos, hábitos alimentares e outros, é difícil classificar os queijos (LEANDRO, 2012). Contudo, normalmente são subdivididos em termos do teor de ácidos graxos como: extragordo (mínimo de 60% de teor de gordura); gordo (45 a 59,9%); semigordo (25 a 44,9%); magro (10 a 24,9%) e desnatado (menos de 10%), ou relação ao conteúdo de umidade em massa dura (até 35,9% de teor de umidade); massa semidura (36 a 45,9%); massa semibranda ou macios (46 a 54,9%) e massa branda ou moles (não inferior a 55%) (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Apesar das propriedades nutritivas variarem dependendo do tipo do queijo, todos possuem bons teores de nutrientes inorgânicos, proteínas, vitaminas e gordura (LEANDRO, 2012). As concentrações de elementos essenciais e/ou potencialmente tóxicos contidos no derivado lácteo provêm do tipo de leite utilizado na sua produção, sendo que os nutrientes inorgânicos no líquido dependem da características genéticas e alimentação do animal, estágio de lactação e outros (MANUELIAN *et al.*, 2017; OZBEK; AKMAN, 2016; HERMAN-LARA *et al.*, 2019). Em alguns casos, a porcentagem de alguns elementos no queijo é muito superior ao detectado no leite, por exemplo, os teores de cálcio e fósforo são 6 vezes maiores (ARAÚJO *et al.*, 2008). Entretanto, elementos como potássio e magnésio tem as concentrações reduzidas durante a etapa de maturação do derivado em comparação com as constatadas no leite de origem (MANUELIAN, 2017).

Outros fatores podem influenciar na concentração, como no caso do teor do sódio que é alterado com a adição de sal (cloreto de sódio), durante a produção do queijo, com o objetivo de salgar o alimento deixando-o mais saboroso. Ademais, esse elemento atua interferindo nas reações bioquímicas e no desenvolvimento da flora láctica e também pode inibir microrganismos indesejáveis no alimento (HAHN *et al.*, 2016; HERMAN-LARA *et al.*, 2019). Além disso, a composição elementar do queijo também é dependente das condições de armazenagem, embalagem e fabricação, como por exemplo, a presença de Cr que pode advir da utilização de materiais de aço inoxidável na produção (HERMAN-LARA *et al.*, 2019; MORENO-ROJAS *et al.*, 2010).

Em relação a outros elementos presentes no queijo, cerca de 60 a 70% do cálcio ingerido pela população advém do leite e seus derivados devido à presença de altas concentrações desse elemento nesses alimentos (CORMICK; BELIZÁN, 2019; RIZZOLI, 2021). Vale ressaltar que, desde 2006, o Guia Alimentar para a População Brasileira, em sua diretriz 5, aconselha aos profissionais de saúde que recomendem o consumo diário de três porções de leite e derivados, haja visto que esses alimentos são a principal fonte de cálcio na alimentação (BRASIL, 2006).

Em busca de uma alimentação mais saudável, estudos recentes têm mostrado uma mudança no comportamento alimentar da população que está preferindo alimentos com menor teor de gordura e menos calóricos, e devido a isso, os nutricionistas estão recomendando a substituição dos queijos amarelos pelos brancos (CORTES, 2019; EURÍDICE *et al.*, 2020).

Dentre as variedades de queijos brancos, destaca-se a mussarela produzida a partir de leite de búfala e que apresenta grande expansão de mercado no Brasil, sendo o sabor característico e os altos teores de proteínas, cálcio e fósforo, alguns dos motivos para esse crescimento do setor (FARIAS, 2014; MARTINI *et al.*, 2016). Outro presente nas dietas alimentares, é a ricota. A sua massa é resultante do soro lácteo acidificado e é rica em proteínas, lactose, vitaminas e nutrientes inorgânicos, podendo ter ou não a adição de uma parte de leite desnatado (REIS; CURZI, 2017; TEIXEIRA; FONSECA, 2008).

É fundamental destacar alguns queijos brancos brasileiros amplamente consumidos, como o queijo coalho que é produzido principalmente na região Nordeste do país, tendo Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba como maiores estados produtores (KAMIMURA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2021). Outro exemplo é o minas frescal, derivado lácteo originário das queijarias caseiras em Minas Gerais, que apresenta um alto teor de umidade, proteico entre 12 e 18%, e de gordura entre 16 e 18%, e por não ser padronizado, tem uma composição variável (LIMA; CARDOSO, 2019; MATERA *et al.*, 2018).

Infelizmente, apesar do alto consumo de queijos no Brasil, trabalhos visando a determinação dos nutrientes inorgânicos dos derivados lácteos produzidos no país ainda são exíguos e, ainda mais escassos são estudos em amostras de queijos brancos, como mussarela de búfala, queijo coalho e minas frescal. Portanto, há uma necessidade de captação maior de informações sobre a composição elementar nesses alimentos devido a diversos fatores que podem influenciar esses teores e por ser fundamental para a elucidação do valor nutricional e a sua contribuição na ingestão diária recomendada (IDR), podendo assim auxiliar em uma dieta mais saudável para o consumidor (KIRA; MAIHARA, 2007; MATERA *et al.*, 2018).

1.2 PROCEDIMENTOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA QUEIJOS

A determinação dos constituintes em amostras de queijos pode apresentar alguns desafios devido à complexidade da matriz (CHRISTOPHORIDIS *et al.*, 2019). Portanto, para viabilizar a quantificação dos analitos, as amostras devem ser previamente submetidas a procedimentos de preparo de amostras. Essa etapa é considerada crítica e consiste em processos físicos e químicos que visam converter a amostra em uma forma adequada para introdução no instrumento de medida, com

o intuito de minimizar interferências na quantificação dos elementos de interesse. Dois procedimentos comumente utilizados para a decomposição de matrizes orgânicas e inorgânicas, são por via seca ou via úmida (KRUG; ROCHA, 2016; PINHEIRO *et al.*, 2019).

A decomposição por via seca envolve a oxidação de compostos orgânicos sob altas temperaturas, normalmente 500 °C, utilizando ar atmosférico ou oxigênio, ocasionando na conversão de espécies químicas em substâncias mais simples como, principalmente, dióxido de carbono e água. Essa estratégia de preparo de amostra apresenta vantagens como a capacidade de decompor quantidades relativamente grandes de amostra, proporcionando um ganho na sensibilidade, além do fator diluição ser baixo, visto que o resíduo da combustão pode ser solubilizado em um pequeno volume de ácido diluído, resultando em um menor limite de quantificação (KRUG; ROCHA, 2016; SIRGRIST *et al.*, 2016).

Diversos trabalhos têm sido reportados na literatura propondo a decomposição dos queijos por via seca. Em 2019, Herman-Lara e colaboradores desenvolveram uma metodologia que consistiu em decompor cerca de 2 g de queijos mexicanos artesanais de cabra empregando um forno mufla na temperatura de 550 °C por 5 h, sendo as cinzas resultantes dissolvidas em 4 mL de HCl 3 mol L⁻¹ com diluição final em 25 mL com HNO₃ 1% v v⁻¹.

Visando a determinação de arsênio e tendo o conhecimento de que normalmente os organoarsênios requerem uma temperatura acima de 300 °C para serem decompostos, Sigrist e colaboradores (2016) propuseram um método para a determinação desse elemento em cinco tipos de queijo utilizando a decomposição por via seca. O procedimento consistiu na adição de 4 mL de suspensão auxiliar de incineração, preparada a partir de 50 g de sal hidratado de nitrato de magnésio em 100 mL de água destilada, em 5 g de queijo, para prevenir a perda de compostos voláteis de arsênio. Em seguida, ocorreu o aquecimento, em uma mufla, até 500 °C por 12 h com uma taxa de 100 °C/h. O resíduo foi solubilizado com 2 mL de HNO₃ 50% v v⁻¹.

Apesar das vantagens da decomposição por via seca, esse meio de preparo de amostra tem algumas desvantagens, como o longo tempo de aquecimento, como evidenciado nos trabalhos citados, maior risco de perda de voláteis, contaminação e alto gasto de energia (KRUG; ROCHA, 2016).

A decomposição por via úmida implica no aquecimento da amostra, normalmente na presença de um ácido mineral oxidante (HNO_3 , H_2SO_4 ou HClO_4), de uma mistura de ácido ou uma mistura de ácido com peróxido de hidrogênio atuando como agente oxidante auxiliar. Devido a utilização de ácidos oxidantes, o preparo de amostra por via úmida pode ser empregado temperaturas mais baixas, em comparação com a via seca, para decompor matrizes orgânicas, portanto há uma diminuição na perda de voláteis. Ademais, geralmente o tempo de decomposição é menor (KRUG; ROCHA, 2016).

Além de poder serem utilizadas diferentes fontes de energia (micro-ondas, aquecimento condutivo, infravermelho e outros), a decomposição por via úmida pode ser realizada em sistemas abertos ou fechados. Em sistemas abertos, normalmente emprega-se aquecimento condutivo em placa de aquecimento ou em bloco digestor.

Vários trabalhos encontrados na literatura utilizam esse tipo de sistema para o preparo de amostras de queijos. Dentre eles, Barone e colaboradores (2018) determinaram Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb e Zn em queijos italianos produzidos em duas regiões do sul do país. As amostras foram decompostas utilizando 11 mL de uma mistura de HNO_3 – HClO_4 (8:3) em uma placa de aquecimento para determinação dos analitos, exceto Hg. Para a determinação de Hg foi empregado 10 mL de uma mistura ácida H_2SO_4 - HNO_3 (1:1). Os derivados lácteos foram digeridos sob condições de refluxo e os elementos Fe e Zn foram determinados por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), Cd, Cu, Cr e Pb por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) e Hg por espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (HG AAS), após redução com NaBH_4 . O método foi validado utilizando material de referência certificado (MRC) de leite em pó desnatado e também por ensaios de adição e recuperação com soluções padrões aquosas, sendo obtidas recuperações na faixa de 96,0 a 99,0% com desvios padrões relativos (RSD) inferiores a 2% para todas as determinações.

Diferentes alimentos, incluindo dois queijos brancos, foram analisados empregando um método proposto por Khouzam, Pohl e Lobinski (2011). O procedimento consistiu na decomposição de 0,250 g da amostra em uma placa de aquecimento na temperatura de 85 °C com o auxílio de uma mistura (10:3) de HNO_3 e H_2O_2 , ambos concentrados, para posterior determinação de Cu, Fe, Mo, Mn e Zn na espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

Dentre os sistemas fechados, destaca-se o emprego de aquecimento por radiação micro-ondas. Muitas vantagens são decorrentes do uso dessa estratégia de preparo de amostra, como a redução no tempo de decomposição, redução da perda de voláteis e riscos de contaminação e melhoria na precisão, limite de detecção e reprodutibilidade quando comparados com procedimentos de decomposição por via úmida em sistemas abertos (BARELA *et al.*, 2017; KRUG; ROCHA, 2016; WATHUDURA *et al.*, 2020). Devido a isso, diversos autores propuseram o uso de decomposição assistida por radiação micro-ondas no preparo de amostra de derivados lácteos.

Com o intuito de verificar os possíveis riscos que o consumo diário de queijos pode ocasionar para a saúde da população grega, o trabalho de Christophoridis e colaboradores (2019) analisou diversas amostras de queijos produzidos na Grécia. Foram decompostos cerca de 0,5 g de cada amostra dos laticínios empregando forno de micro-ondas por 15 minutos a 200 °C utilizando 5 mL de ácido nítrico 50% m v⁻¹. Os autores quantificaram Cd, Cr, Cu, Mn, Ni e Pb por GF AAS, Zn e Fe por F AAS e Hg HGAAS- e constataram que os queijos consumidos no país não apresentam teores desses metais que podem provocar algum dano à saúde humana, mas que é necessário estudos futuros sobre a bioacumulação na cadeia alimentar de elementos como Pb, Hg e Cd.

Manuelian e colaboradores (2017) determinaram o teor mineral, além do proteico, colesterol e ácido graxo, em queijos italianos produzidos a partir de diferentes tipos de leite (bovino, caprino, de búfala e de ovelha). O preparo das amostras foi realizado em forno de micro-ondas utilizando ácido nítrico e os elementos (Ca, K, P, S, Na, Mg, Zn, Fe, Cu, Se e Cr) foram determinados por ICP OES. No tocante a composição elementar, os autores notaram que em todos os queijos, exceto o derivado de leite de cabra, as maiores concentrações foram de cálcio, sódio e fósforo. No caso do laticínio produzido com leite caprino, os maiores teores foram de sódio, potássio e fósforo.

Osoris, Koidis e Papademas (2015) descreveram um procedimento analítico para determinação de 17 elementos majoritários e traços em 3 queijos haloumi que se diferenciam pela região de fabricação em Chipre. As decomposições das amostras foram efetuadas com aquecimento por radiação micro-ondas na temperatura de 210 °C por 37 minutos utilizando 4 mL de HNO₃ 65% m m⁻¹ e 2 mL de H₂O₂ 30% m m⁻¹. O método apresentou percentual de concordância com os

valores encontrados para os certificados do material certificado de referência (MRC) de leite em pó entre 80,4 (Zn) e 126,3 % (Na).

Em 2015, Bilandzic e colaboradores propuseram um método com o intuito de determinarem a concentração de macro e microelementos em diversos lácteos, incluindo queijos fabricados na Croácia, que consistiu em decompor cerca de 2 g das amostras utilizando 6 mL de ácido nítrico concentrado e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹ em um forno de micro-ondas aberto por 30 minutos e potência máxima de 800 W. Em relação a validação do método, os valores obtidos foram consoantes com os valores do MRC de leite desnatado em pó utilizado para avaliação da exatidão, com os percentuais de concordância entre 96,1 (Na) e 99,2 % (Se).

A Tabela 1 resume informações a respeito de alguns trabalhos que foram publicados nos últimos 7 anos na literatura, envolvendo os procedimentos de preparo de amostras apresentados para derivados lácteos. Nota-se que na maior parte deles foi empregado o aquecimento por radiação micro-ondas.

Contudo, apesar dos procedimentos de decomposição utilizando essa fonte de energia apresentarem amplas vantagens, os trabalhos publicados na literatura em relação a digestão de queijos utilizando esse sistema, demandam o consumo de quantidades consideráveis de reagentes concentrados, resultando em um alto volume de resíduos (MULLAPUDI *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020). Diante disso, torna-se fundamental o desenvolvimento de procedimentos de preparo de amostras que sigam os princípios preconizados pela química verde, como o mínimo consumo de reagentes. Além disso, o uso de ácidos diluídos resulta em uma diminuição nos valores dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) e causa menos danos ao sistema de nebulização, quando são empregadas as técnicas de espectrometria atômica para a determinação elementar (KRUG; ROCHA, 2016; SANTOS *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020).

Ademais, na base literária não são reportados trabalhos que envolvem a digestão de queijos em bloco digestor com sistema fechado, sendo que esse equipamento tem despertado o interesse de pesquisadores em virtude de apresentar um menor custo de aquisição e não necessitar de treinamento especializado para a sua utilização, quando comparado ao forno de micro-ondas (FERREIRA *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Métodos de decomposição para determinação elementar em amostras de queijo.

Analito	Amostra	Preparo de amostra	Temperatura de decomposição (tempo)	Ácido e agentes auxiliares	Referência
Ca, Cu, K, Mg, Mn, Na e Zn	Queijos artesanais brasileiros	Via úmida por forno de micro-ondas	n. d. (18 min)	5 mL HNO ₃ 14 mol L ⁻¹ 2 mL H ₂ O ₂	ANDRADE, B. M. <i>et al.</i> , 2022
Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn	Orgu (Queijo turco)	Via seca	550 °C (16 h)	n.a.	CANOZER; KÖSE, 2022
Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn	Queijo coalho, minas padrão e frescal, queijo manteiga e ricota fresca	Via seca	450 °C (n.d.)	n.a.	MESSIAS <i>et al.</i> , 2022
As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Se e Zn	Queijos espanhóis	Via úmida por forno de micro-ondas	n.d. (n.d.)	5 mL HNO ₃ 69% m m ⁻¹ e 2 mL H ₂ O ₂ 33% m m ⁻¹	OLIVEIRA FILHO <i>et al.</i> 2022
As, Cd, Cu, Hg e Pb	Queijos turcos e brancos	Via úmida por forno de micro-ondas	200 °C (30 min)	7 mL HNO ₃ 65% m m ⁻¹ e 1 mL H ₂ O ₂ 30% m m ⁻¹	DAĞCILAR; GEZER, 2021
Ba, Ca, Fe, K, Mn, Na, P e Zn	Pecorino romano (Queijo italiano)	Via úmida por forno de micro-ondas	180 °C (40 min)	5 mL HNO ₃ 14 mol L ⁻¹ 5 mL H ₂ O ₂	DONATO, F. Di. <i>et al.</i> , 2021
Ca, K, Mg, P e Na	Malatya (Queijo turco)	Via seca	550 °C (16 h)	n.a.	YASAR; KOSE; KOSE, 2021

Fonte: Autoria própria
n.a: não se aplica
n.d: não declarado

Tabela 1 - Métodos de decomposição para determinação elementar em amostras de queijo (Continuação).

Analito	Amostra	Preparo de amostra	Temperatura de decomposição (tempo)	Ácido e agentes auxiliares	Referência
Cd, Cu, Pb e Zn	Queijos polonês	Via úmida por forno de micro-ondas	210 °C (n.d.)	10 mL HNO ₃ concentrado	SUJKA <i>et al.</i> , 2019
Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb e Zn	Queijos gregos	Via úmida por forno de micro-ondas	200 °C (15 min)	5 mL HNO ₃ 50% m v ⁻¹	CHRISTOPHORIDIS <i>et al.</i> , 2019
Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn	Queijo prato, coalho, minas padrão e frescal	Via úmida por forno de micro-ondas	n.d (32 min)	3 mL HNO ₃ concentrado e 3 mL H ₂ SO ₄ concentrado	MATERA <i>et al.</i> , 2018
Cd, Cr, Cu, Fe, Pb e Zn	Queijos italianos	Via úmida por placa de aquecimento	n.d (n.d)	11 mL HNO ₃ - HClO ₄ (8:3)	BARONE, 2018
Ag, Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sr, e Zn	Queijo branco	Via úmida por forno de micro-ondas	180 °C (15 min)	7 mL HNO ₃ e 2 mL H ₂ O ₂	LEVKOV <i>et al.</i> , 2017
As, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn	Queijos mexicanos	Via úmida por forno de micro-ondas	200 °C (30 min)	10 mL HNO ₃ 65% v v ⁻¹	CASTRO-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2017
Ag, Al, Ba, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sr, Y e Zn	Halloumi (Queijo grego)	Via úmida por forno de micro-ondas	210 °C (37 min)	4 mL HNO ₃ 65% v v ⁻¹ e 2 mL H ₂ O ₂ 30% m m ⁻¹	OSORIO <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Autoria própria
n.d: não declarado

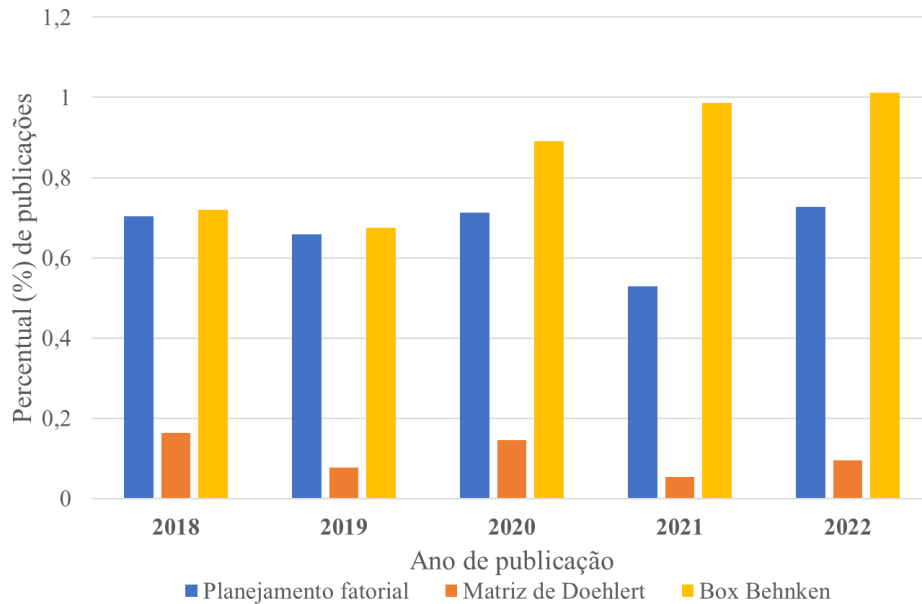
1.3 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS E OTIMIZAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

As técnicas de planejamento experimental são utilizadas na otimização e validação de estratégias analíticas, e ao serem associadas com a etapa de preparo de amostra, contribui para a redução do trabalho ocasionando menor tempo e custo, e melhoria na qualidade dos resultados obtidos ao definir os efeitos determinantes no dado final, assim proporcionando condições de maior sensibilidade, precisão e exatidão, bem como baixos LOD e LOQ. (BEZERRA *et al.*, 2019; FERREIRA, 2015; NASCIMENTO, 2017).

Os procedimentos para otimização podem ser univariados ou multivariado, sendo que o primeiro consiste no estudo de uma única condição por vez enquanto as demais são mantidas constantes. Por outro lado, a otimização multivariada, se sobressai porque permite avaliação simultânea de mais de um fator e analisa as interações entre os fatores que podem ser significativas para o resultado (CARVALHO, 2015; SILVA, 2014). Dentre as otimizações multivariada, destaca-se algumas ferramentas quimiométricas como o planejamento fatorial, matriz de Doehlert e Box Behnken.

Ao realizar uma busca na base literária, *Web of Science*, em setembro de 2022, na categoria de química analítica, por artigos envolvendo preparo de amostra (em inglês *sample preparation*), publicados nos últimos 5 anos. Para a avaliação do perfil de publicações nesse período foram calculadas as porcentagens de trabalhos que utilizam as ferramentas citadas anteriormente (em inglês *factorial design*, *doehlert matrix* e *box behnken*) em relação ao total de publicações na área. Nota-se que esses percentuais se mantêm constantes com passar dos anos (Figura 1).

Figura 1 – Percentual de artigos da área de química analítica nos últimos 5 anos aplicando técnicas multivariadas no preparo de amostra.



Fonte: Autoria própria

Essas técnicas são empregadas, principalmente, na otimização das condições de decomposição de alimentos para posterior análise. Em alguns trabalhos, essas ferramentas foram aplicadas para otimizar variáveis dos procedimentos de digestão de leite, de diversas fontes, para determinação elementar. Por exemplo, Khajeh (2012) utilizou um planejamento fatorial completo 2^4 para otimização de digestão em forno micro-ondas de amostras de leite para a determinação de zinco e cobre. As variáveis estudadas foram a potência da irradiação, o volume de ácido nítrico, a temperatura e o tempo de digestão. Como todos os fatores independentes foram significativos, os pesquisadores também usaram o Box Behnken para avaliar os efeitos dos parâmetros.

Em estudo realizado por Souza e colaboradores (2018) foram investigadas as variáveis concentração de ácido nítrico e de peróxido de hidrogênio, através de um planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais, para a decomposição de leite de vaca e iogurte para a quantificação de Ca, K, Mg, Na e Zn no ICP OES.

Santos, D. e colaboradores (2014) empregaram um planejamento fatorial completo 2^4 com pontos centrais para a otimização dos parâmetros concentração de ácido nítrico, tempo de sonicação, tempo e velocidade de centrifugação para o

preparo de amostra de leite de coco através da extração assistida de ultrassom, visando a determinação Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P e Zn por ICP OES.

Em relação a matrix de Doehlert, não foram encontrados na literatura artigos que aplicam a ferramenta para otimizar uma decomposição de leite ou derivado lácteo para determinação elementar. Contudo, existem trabalhos como dos pesquisadores Merib, Nardini e Carasek (2014) que utilizam essa ferramenta para otimizar as condições de extração de inseticidas organoclorados em leite bovino por microextração em fase sólida por headspace (HS-SPME). No trabalho, as variáveis estudadas foram tempo e temperatura de extração.

Em outro artigo de extração, os autores Souza e colaboradores (2017) empregaram Box Behnken para otimizar o pH, volume do complexante, do solvente extrator e do solvente dispersor em uma microextração líquido-líquido dispersiva para determinação de urânio em leite materno por absorção molecular no UV-Vis.

Apesar de ter trabalhos que utilizam essas ferramentas de planejamento para a otimização das condições de decomposição de leite, não é reportado na literatura o emprego delas no preparo de amostras envolvendo a digestão de queijos para a determinação elementar.

Como pode ser evidenciado pelos trabalhos citados e pela Figura 1, percebe-se que uma das principais técnicas de planejamento multivariável é o planejamento fatorial. Em um planejamento fatorial de dois níveis (2^k), onde o k é o número de variáveis investigadas, o efeito de cada fator é avaliado em dois níveis, o inferior (-) e o superior (+), delimitando o domínio experimental. Ao realizar o cálculo que analisa os efeitos dos fatores, é possível descobrir quais são os mais relevantes no processo analítico, ou seja, aquelas variáveis que afetarão significativamente a resposta analítica. Esse efeito do fator pode ter um caráter positivo ou negativo, indicando o aumento ou diminuição, respectivamente, da resposta analítica, à medida que aumenta o valor da variável dentro do domínio experimental (FERREIRA *et al.*, 2019a; SANTOS, 2017).

Para a determinação do erro experimental, a fim de evitar um aumento do tempo operacional e no gasto de reagente, que seria decorrente da duplicação dos experimentos, são utilizados pontos centrais, também chamados de nível zero (0), que se referem aos experimentos com valores médios dos fatores. A quantidade de pontos centrais tem que ser em torno de 25 a 30% do total de experimentos (FERREIRA, 2015; SILVA, 2014).

A avaliação dos resultados pode ser realizada de diversas formas, sendo uma das alternativas a utilização de gráfico de Pareto. Neste gráfico, os efeitos padronizados, que é determinado pela relação entre o efeito do fator e o erro padrão associado, são exibidos na forma de barras. Ele é estabelecido por programas estatísticos, como o STATISTICAL SOFTWARE, e é capaz de mostrar a existência ou não de significância dos fatores principais e suas interações (FERREIRA, 2015).

Durante a otimização multivariada de procedimentos analíticos envolvendo muitas respostas, normalmente é realizada a determinação da resposta múltipla (RM). Ela deve ser compatível com os objetivos da otimização e se baseia no somatório das respostas normalizadas, calculada conforme mostrado na Equação 1, em que o valor do denominador corresponde a maior concentração encontrada para aquele analito no planejamento experimental (FERREIRA, 2015).

$$RM = \frac{\textit{resposta a}}{\textit{resposta máxima de a}} + \frac{\textit{resposta b}}{\textit{resposta máxima de b}} + (\dots) \quad \text{Equação 1}$$

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como finalidade desenvolver dois novos procedimentos analíticos de preparo de amostras de queijos brancos, em sistemas fechados com diferentes fontes de aquecimento, visando determinação multielementar por ICP OES.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obter através de planejamento fatorial de dois níveis quais as melhores condições de decomposição assistida por radiação de micro-ondas e por aquecimento condutivo no bloco fechado, para a digestão de amostras de queijo branco;
- Validar os procedimentos propostos através dos parâmetros analíticos: efeito de matriz, linearidade, faixa linear de trabalho, limite de detecção e de quantificação, precisão e exatidão;
- Comparar o procedimento de decomposição assistida por radiação de micro-ondas com o procedimento de aquecimento condutivo no bloco fechado
- Aplicar os procedimentos propostos em amostras de queijos brancos comercializadas em Salvador, Bahia;
- Discutir sobre os teores de Ca, Cu, K, Na, P, e Zn determinados nas amostras e suas contribuições na Ingestão Diária Recomendada (IDR).

CAPÍTULO 3 – EXPERIMENTAL

3. EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Nesse trabalho todas as soluções empregadas foram preparadas com reagente analíticos de alto grau de pureza e as diluições feitas com água ultrapura com resistividade específica de 18,2 M Ω cm obtida em um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA). Todas as vidrarias, frascos plásticos e materiais em geral, para que ocorresse a descontaminação, foram lavados com detergente neutro e enxaguados com água e depois com água deionizada para então serem submersos em um banho ácido contendo ácido nítrico 10% v v⁻¹ por no mínimo 24 horas. Em seguida, foram lavados com água deionizada e secos em temperatura ambiente.

Para a realização dos procedimentos de decomposição foi empregado ácido nítrico (65% v v⁻¹) (Merck, Alemanha) para o preparo das soluções de trabalho, nas concentrações de 2,0; 6,0; 8,0 e 14 mol L⁻¹. Utilizou-se também uma solução de peróxido de hidrogênio (30% m m⁻¹) (Merck, Alemanha) no procedimento de decomposição das amostras e solução de NaOH (0,093 \pm 0,003 mol L⁻¹) para determinação da acidez residual dos digeridos. Para o método de referência do Instituto Adolfo Lutz, foi usado o ácido clorídrico 37% v v⁻¹ (Synth, Brasil).

Para determinar a concentração dos analitos nas amostras, foram preparadas soluções multielementares na concentração de 10 mg L⁻¹ para Cr, Cu, Mn e Zn, a partir da diluição de soluções padrões de 1000 mg L⁻¹ (Specsol, Brasil) de cada elemento. Além disso, as soluções multielementares apresentavam a concentração de 700 mg L⁻¹ para Ca, de 500 mg L⁻¹ para Na e P e de 100 mg L⁻¹ para K, preparadas a partir da diluição de soluções padrões de 10000 mg L⁻¹ (Specsol, Brasil) de cada elemento. As soluções foram utilizadas na preparação das curvas analíticas de calibração. As soluções de referência empregadas nas calibrações dos procedimentos foram preparadas usando solução de ácido nítrico com concentração 0,50 mol L⁻¹, de forma a resultar em concentração ácida próxima as obtidas nos digeridos na decomposição assistida por micro-ondas (0,40 \pm 0,03 mol L⁻¹) e no bloco digestor fechado (0,66 \pm 0,04 mol L⁻¹).

A calibração dos eletrodos de membrana de vidro foi realizada com os tampões de padrões aquosos com pH igual a 4,0; 7,0 e 9,0 (Metrohm, Suíça). Para a determinação da concentração de carbono orgânico dissolvido, houve a preparação de solução de referência na concentração de 50.000 mg L⁻¹ em carbono a partir da dissolução de massa apropriada do reagente ácido cítrico (Merck, Alemanha) e uma curva de calibração foi preparada a partir de diluições apropriadas da solução de referência de carbono.

3.2 AMOSTRAS

As amostras de queijo foram adquiridas em estabelecimentos comerciais em Salvador, Bahia. O conjunto de 9 amostras abrangeu 8 marcas diferentes (A à H) sendo que 2 amostras foram de queijo mussarela de búfala (MB), 2 amostras de minas frescal (MF), 2 de ricota (RI), 2 de coalho (CO) e 1 de cottage (CT), sendo elas identificadas como MBA, MBB, MFC, MFD, RID, RIF, COD, COG, CTH, respectivamente.

Os queijos foram selecionados de forma aleatória nos estabelecimentos, sendo que as mussarelas foram adquiridas em torno de 100 g a granel e as demais em porções inteiras nas embalagens com massas variadas. Foram realizadas moagens grosseiras utilizando um liquidificador (MONDIAL, Brasil), modelo L20, com faca de aço inox, por 10 segundos na menor velocidade, sendo que antes e após esse processo, o equipamento foi lavado três vezes com água deionizada. As amostras foram mantidas em refrigeração até o processo de decomposição.

3.3 INSTRUMENTAÇÃO

A moagem das amostras foi realizada em um liquidificador (Modelo L20, MONDIAL, Brasil), de duas velocidades mais pulsar, com faca de aço inox e copo plástico translúcido com capacidade de 1,5 L. Nas especificações do liquidificador, não é informado o tipo de aço inox, contudo, normalmente o tipo de aço inox mais empregado em equipamentos de cozinha é o aço inox 304 que apresenta na sua composição química carbono (0,15%), silício (1% máx), magnésio (2,00% máx), cromo (20,00% máx), níquel (10,00%), fósforo (0,045% máx), enxofre (0,030% máx) e outros componentes (10% máx) (COSTA, 2018).

Para a decomposição ácida das amostras foi utilizado dois equipamentos. Para a digestão por aquecimento condutivo foi empregado um bloco digestor fechado (Modelo TE-015-1, TECNAL, São Paulo, Brasil) com controlador de temperatura analógico e com capacidade para 15 tubos de politetrafluoretileno (PTFE) de 100 mL com dimensão de 25 x 60 mm. A decomposição assistida por radiação de micro-ondas foi realizada em forno de micro-ondas com cavidade (Modelo Start D, Milestone, Bergamo, Itália), com rotor equipado para 10 frascos com volume interno de 100 mL.

Para a determinação da acidez residual dos digeridos utilizou-se o titulador potenciométrico automático com agitador magnético (Modelo 848 Titrino Plus, Metrohm, Suíça). Para a determinação dos analitos foi empregado um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, simultâneo com arranjo axial (Modelo iCAP Pro, Thermo Scientific, EUA), equipado com detector de estado sólido com arranjo CID (Dispositivo de Injeção de Carga) operando nos comprimentos de onda entre 167 e 852 nm com interface end-on gas. O sistema óptico do equipamento foi calibrado com solução de referência multielementar e o alinhamento da tocha executado com uma solução de Mn 5,0 mg L⁻¹. As linhas espectrais foram selecionadas considerando-se as intensidades dos sinais de emissão dos analitos e sensibilidade adequada para a determinação de elementos em baixas e altas concentrações. A Tabela 2 apresenta as características e condições experimentais empregadas para as análises.

Tabela 2 - Parâmetros instrumentais para as determinações por ICP OES.

Características e parâmetros	
Rádio-freqüência do gerador (MHz)	27,12
Detector	CID
Diâmetro interno do tubo central da tocha (mm)	2,3
Policromador	Grade de difração Echelle e prisma de dispersão de CaF ₂
Faixa de comprimento de onda (nm)	167– 852
Câmara de nebulização	Ciclônica Tracey
Nebulizador	Concêntrico de quartzo
Potência de medida (W)	1252
Tempo de integração do sinal (s)	3
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	13,5
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,50
Vazão gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,60
Elementos e linhas espectrais de emissão (I) linha atômica (II) linha iônica	C (I) 193,027; Ca (II) 317,933; Cu (II) 324,754; Cr (II) 267,716; K (I) 766,491; Mn (II) 257,610; Na (I) 568,821; P (I) 231,618; Zn (I) 213,857.

Fonte: Autoria própria

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Procedimentos de otimização dos parâmetros dos procedimentos propostos

Para ambos os procedimentos propostos, foi pesado aproximadamente 250 mg de queijo em cada tubo de digestão, e em seguida adicionou-se de 6 mL de HNO₃ de concentração otimizada e 2 mL de H₂O₂ 30% m m⁻¹. O derivado lácteo foi decomposto em tempo e temperatura otimizados.

Para estabelecer as condições otimizadas dos procedimentos experimentais de digestão das amostras de queijos por radiação micro-ondas e por aquecimento condutivo no bloco digestor fechado, realizou-se otimizações multivariadas utilizando o planejamento fatorial de dois níveis. As análises dos dados foram realizadas pelo programa STASTISTICA 7.0 (Stasoft, EUA) que foi empregado para estabelecer o modelo experimental.

Foram elaborados planejamentos fatoriais de dois níveis com os seguintes fatores: concentração de ácido nítrico, tempo e temperatura de decomposição, assim totalizando 8 experimentos para cada procedimento. Porém, devido a determinação do erro experimental do planejamento necessitar de réplicas, foi utilizada a alternativa de repetições do ponto central (FERREIRA, 2015). Portanto, além dos 8 experimentos, foi efetuado uma triplicada do ponto central resultando em 11 experimentos no total. Nesta etapa, a otimização foi empregada utilizando como amostra o queijo mussarela de búfala (MBA). A avaliação da eficiência dos procedimentos de decomposição propostos e escolha das condições ótimas de trabalho, foram tomados como parâmetros de resposta o aspecto visual, teor de carbono orgânico dissolvido (DOC) e a resposta múltipla presente nos materiais digeridos.

Na Tabela 3 mostra as condições avaliadas em cada frasco para a decomposição no forno de micro-ondas fechado e na Tabela 4 a matriz do planejamento de digestão por aquecimento condutivo no bloco digestor fechado.

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis (2^3) para otimização do procedimento de decomposição no forno de micro-ondas com cavidade.

Ensaio	Concentração de HNO₃ (mol/L)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	2,0 (-)	20 (-)	140 (-)
2	2,0 (-)	20 (-)	180 (+)
3	6,0 (+)	20 (-)	140 (-)
4	6,0 (+)	20 (-)	180 (+)
5	2,0 (-)	30 (+)	140 (-)
6	2,0 (-)	30 (+)	180 (+)
7	6,0 (+)	30 (+)	140 (-)
8	6,0 (+)	30 (+)	180 (+)
9 (PC)	4,0 (0)	25 (0)	160 (0)
10 (PC)	4,0 (0)	25 (0)	160 (0)
11 (PC)	4,0 (0)	25 (0)	160 (0)

Fonte: Autoria própria

Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial completo dois níveis (2^3) para otimização do procedimento de decomposição no bloco digestor fechado.

Ensaio	Concentração de HNO₃ (mol/L)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	2,0 (-)	40 (-)	140 (-)
2	2,0 (-)	40 (-)	180 (+)
3	2,0 (-)	80 (+)	140 (-)
4	2,0 (-)	80 (+)	180 (+)
5	14,0 (+)	40 (-)	140 (-)
6	14,0 (+)	40 (-)	180 (+)
7	14,0 (+)	80 (+)	140 (-)
8	14,0 (+)	80 (+)	180 (+)
9 (PC)	8,0 (0)	60 (0)	160 (0)
10 (PC)	8,0 (0)	60 (0)	160 (0)
11 (PC)	8,0 (0)	60 (0)	160 (0)

Fonte: Autoria própria

Na decomposição por radiação micro-ondas, a amostra foi submetida a um programa de aquecimento executado em duas etapas, com os parâmetros tempo e temperatura do patamar otimizados, conforme ilustrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Programa de aquecimento da decomposição das amostras de queijo em forno de micro-ondas com cavidade.

Programa de Aquecimento			
Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Potência (W)
Rampa	140	10	1000
Patamar	140	20	1000
Resfriamento	-	20	

Fonte: Autoria própria

Todas as amostras foram digeridas em triplicata. Os brancos analíticos constituíram-se da mesma mistura, ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, usados para decompor as amostras, sem a presença da amostra. Ao final da digestão, ocorreu a transferência dos digeridos para frascos de polipropileno com volume completado com água deionizada para 25 mL, para as decomposições realizadas no forno micro-ondas e para 20 mL para as digeridas no bloco digestor fechado.

3.4.2. Determinação da acidez residual

A determinação da acidez residual foi realizada a partir de 500 µL dos digeridos obtidos nas decomposições realizadas em condições ótimas de ambos os procedimentos propostos. Esse procedimento foi efetuado por meio de titulações ácido-base com soluções padronizadas de NaOH ($0,093 \pm 0,003 \text{ mol L}^{-1}$), empregando titulador automático.

3.5 VALIDAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Após a etapa de otimização dos parâmetros de decomposição ácida, com a finalidade de validar as estratégias analíticas propostas, foram determinados os parâmetros de desempenho analítico, nomeadamente: efeito de matriz, limites de detecção e de quantificação, linearidade e faixa linear de trabalho, precisão e exatidão.

Para avaliação do efeito matriz, duas curvas de calibração foram preparadas, uma em meio do digerido e outra em meio ácido, identificadas em cada nível de concentração e com triplicada para cada ponto. A investigação dessa interferência foi feita o efeito de matriz foi estimado por meio da comparação da razão entre os coeficientes angulares das curvas de calibração externa e os coeficientes das curvas de calibração obtidas por adição de analito (BRASIL, 2017; MELO *et al.*, 2020; SANTANA, 2019).

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir do desvio padrão resultante da análise de 10 soluções de brancos analíticos. O LOD e LOQ podem ser calculados pelas Equação 2 e 3 respectivamente:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times s}{\alpha} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times s}{\alpha} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que, s é o desvio padrão das medidas repetidas da solução do branco e α é a sensibilidade, indicada pelo coeficiente angular da curva de calibração (BRASIL, 2017). A conversão dos valores de LOD e LOQ para $\mu\text{g g}^{-1}$ foi realizada ao multiplicar pelo volume em mL do digerido avolumado e dividir por 0,250 g, que é a massa média decomposta do derivado lácteo.

As linearidades dos procedimentos foram avaliadas pelo coeficiente de correlação (R) da curva analítica, seguindo as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Para tal, foram feitas a análise de, no mínimo 5 concentrações distintas da curva, sendo o coeficiente de determinação considerado aceitável quando resultados iguais ou superiores a 0,990 foram obtidos (BRASIL, 2017). A faixa linear de trabalho, por sua vez, foi especificada entre o limite de quantificação do procedimento e a concentração na qual o sinal analítico desviou-se da linearidade.

As precisões das estratégias analíticas foram avaliadas com base no desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), das digestões 8 réplicas de amostra de queijo mussarela de búfala (MBA). O CV foi

calculado da seguinte maneira, expressa na Equação 4, sendo \bar{x} a média e s é o desvio padrão (BRASIL, 2017).

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Por fim, as exatidões das estratégias analíticas desenvolvidas foram avaliadas utilizando um CRM (material de referência certificado) de leite em pó (NIST 1549a), e os percentuais de concordância entre os valores determinados e o certificado foram calculados utilizando a Equação 5.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor determinado}}{\text{Valor certificado}} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Além disso, também foram comparados, estaticamente, os resultados obtidos com os procedimentos propostos e com o método de referência, descrito no item 3.5.1.

3.5.1. Procedimento do método de referência

O método de referência utilizado foi uma adaptação do utilizado no Instituto Adolfo Lutz. Ele consistiu em medir cerca de 250 mg da amostra de queijo em erlenmeyer de 125 mL, e em seguida, adicionou 5 mL de HCl (6,0 mol L⁻¹). O erlenmeyer foi aquecido em uma chapa aquecedora (IKA, Brasil) por 2 horas na temperatura de 150 °C, com o cuidado de cobri-lo com um vidro de relógio. Foram adicionados mais 5 mL da solução de HCl ao se notar a secura do filme ácido até a completa dissolução das amostras (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Após a digestão, o digerido foi filtrado ainda quente e transferido para um balão volumétrico de 25 mL e volumado com água deionizada. A decomposição foi realizada em triplicada contendo um branco analítico.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE DIGESTÃO PROPOSTOS

A otimização das variáveis da decomposição ácida das amostras de queijos, assistidas por radiação de micro-ondas foi realizada a partir do estudo dos seguintes parâmetros: temperatura de decomposição, tempo do patamar no programa de aquecimento e concentração da solução de ácido nítrico.

Nesta etapa, foi decomposta uma amostra de queijo mussarela de búfala (MBA) e o programa de aquecimento adotado foi efetuado em duas etapas, a primeira consistindo em uma rampa de aquecimento até a temperatura analisada durante um intervalo de 10 min e a segunda, na manutenção constante dessa temperatura por tempo estudado.

A avaliação da eficiência da decomposição do queijo, foi realizada através dos parâmetros: aspecto visual, teor de carbono orgânico dissolvido (DOC) e resposta múltipla.

Analisando o aspecto visual dos digeridos, não foi visualizado material particulado em nenhuma das condições de digestão, indicando que pode ter ocorrido uma decomposição completa da matriz. Se fosse constatada uma decomposição incompleta, implicaria na presença de resíduos orgânicos na solução, podendo resultar em erros sistemáticos negativos na determinação dos analitos em queijos, visto que, teores de cálcio e fósforo discordantes do real seriam determinados, uma vez que, os lipídios intensificam a associação desses elementos com a caseína, impedindo a liberação na matriz (KIRA; MAIHARA, 2007; SOUZA, 2015).

Outra resposta de interesse foi o teor de DOC porque indica a quantidade de carbono que será introduzida no equipamento usado para a determinação elementar, fornecendo uma previsão das interferências por efeito de matriz ou espectrais (KRUG; ROCHA, 2016). Os valores de DOC para cada ensaio podem ser visualizados na Tabela 6.

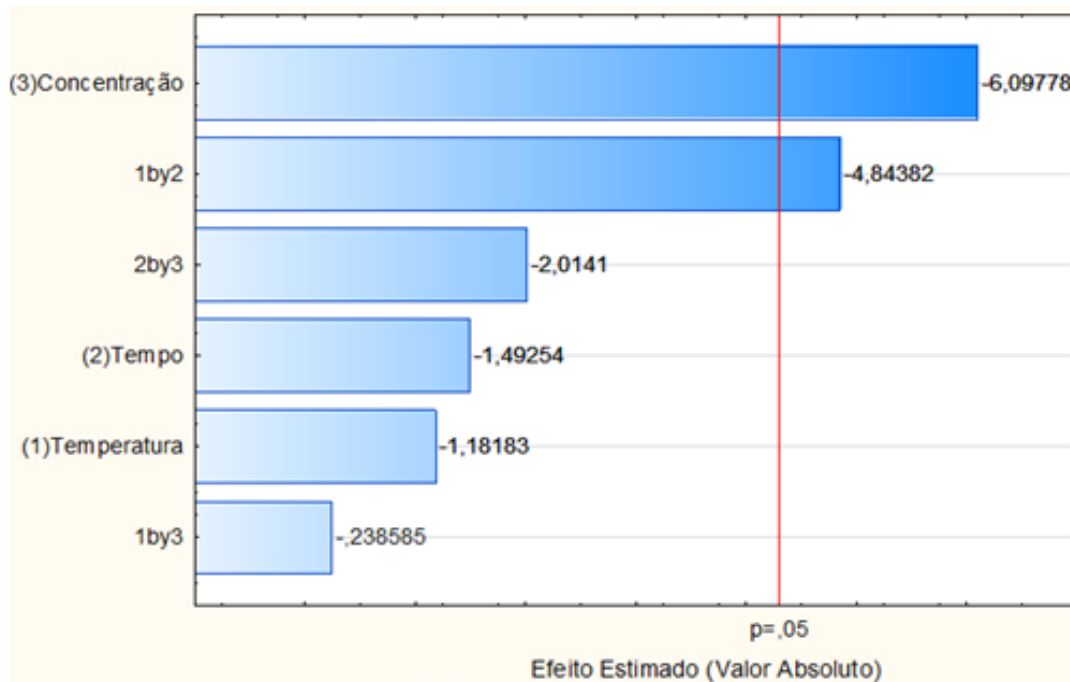
Tabela 6 - Planejamento fatorial 2^3 com o valor de DOC e resposta múltipla para cada procedimento da decomposição assistida por micro-ondas.

Ensaio	[HNO₃] (mol L⁻¹)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	DOC (% m m⁻¹)	Resposta múltipla
1	(-1) 2,0	(-1) 20	(-1) 140	14,51	6,28
2	(-1) 2,0	(-1) 20	(+1) 180	11,13	6,09
3	(+1) 6,0	(-1) 20	(-1) 140	14,62	6,60
4	(+1) 6,0	(-1) 20	(+1) 180	14,70	5,51
5	(-1) 2,0	(+1) 30	(-1) 140	10,47	6,48
6	(-1) 2,0	(+1) 30	(+1) 180	14,70	5,97
7	(+1) 6,0	(+1) 30	(-1) 140	15,64	7,15
8	(+1) 6,0	(+1) 30	(+1) 180	16,84	7,09
9 (PC)	(0) 4,0	(0) 25	(0) 160	16,89	6,09
10 (PC)	(0) 4,0	(0) 25	(0) 160	15,64	6,51
11 (PC)	(0) 4,0	(0) 25	(0) 160	16,05	6,48

Fonte: Autoria Própria

Ao realizar a análise dos dados, o menor teor de DOC encontrado correspondeu a 10,47 % m m⁻¹, sendo verificado no ensaio 5 que apresenta como condições de decomposição o emprego de ácido nítrico 2 mol L⁻¹, decomposição por 30 minutos com a temperatura máxima de aquecimento de 140 °C. Ao gerar o Gráfico de Pareto (Figura 2), observa-se que para o domínio experimental avaliado, a variável concentração e a interação entre temperatura e o tempo foram significativas, ambos negativos, sendo o efeito mais significativo a concentração. Os resultados foram avaliados usando a análise de variância (ANOVA) a 95% de confiança, demonstrando que o modelo não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$), tendo valor de p igual a 0,0512.

Figura 2 - Gráfico de Pareto para DOC do planejamento fatorial 2^3 com ponto central para decomposição assistida por micro-ondas



Fonte: Autoria própria

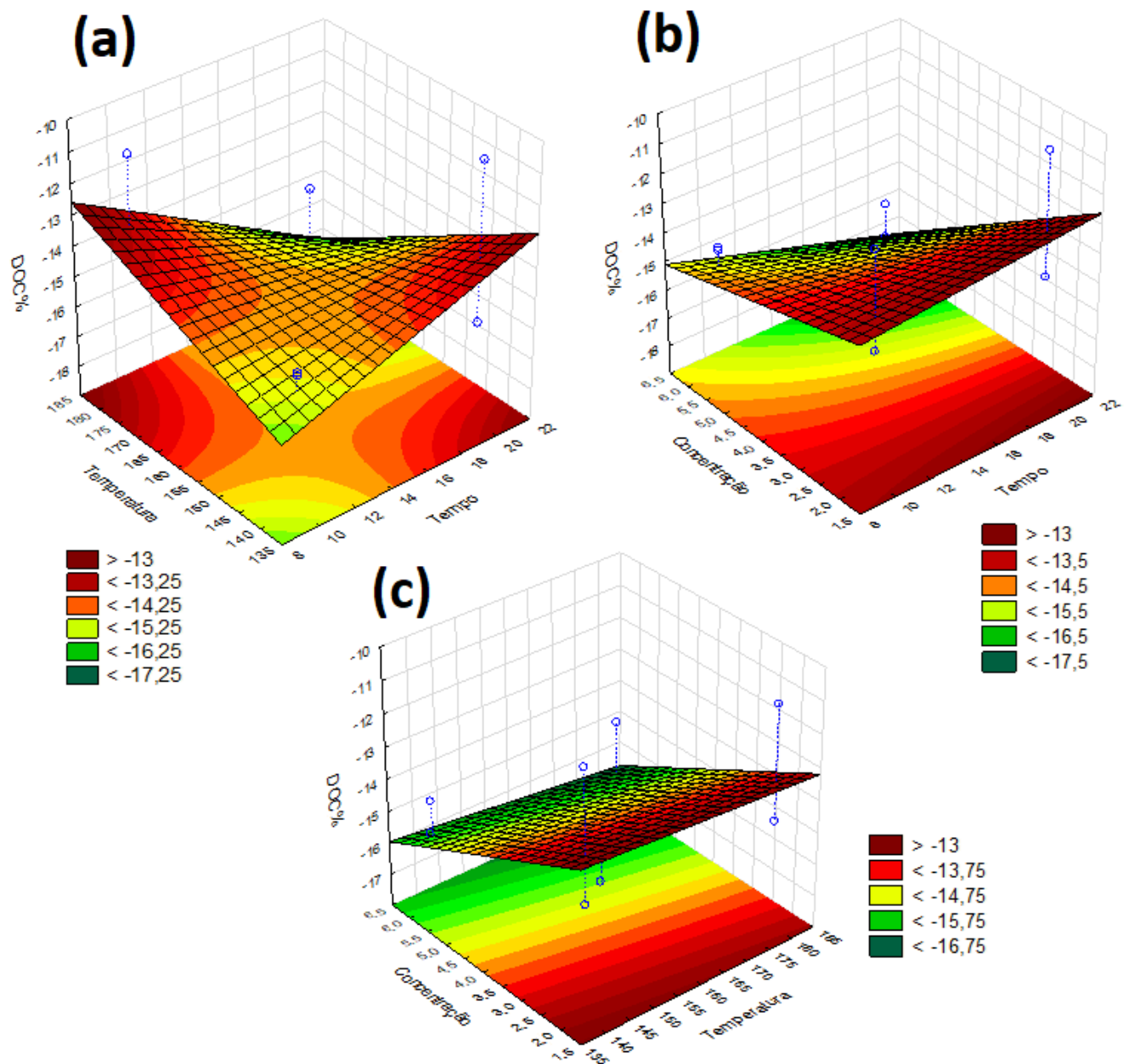
Ao analisar a Figura 3(a) referente ao gráfico de superfície de resposta para teor de DOC em função da temperatura e do tempo, verificou-se que as maiores eficiências de decomposição, ou seja, menores teores de DOC, foram alcançadas para tempo maior de decomposição em uma temperatura mais baixa ou quando é utilizado um tempo menor em uma temperatura maior. Portanto, dentro do domínio experimental avaliado, foi possível obter um baixo percentual de carbono orgânico dissolvido empregando temperatura inferior à 160 °C, que de acordo com a literatura é a temperatura típica de degradação de proteínas, a depender da duração da decomposição utilizando radiação micro-ondas (GONZALÉZ et al, 2009).

Ao observar as Figuras 3(b) e 3(c) nota-se que a concentração do ácido tem uma alta influência na resposta analítica, visto que, as regiões com menores teores de DOC se encontra nas condições de decomposição com o emprego de ácido diluído. Esses dados ratificam a análise feita do gráfico de Pareto (Figura 2) que mostra que o fator que apresenta maior significância, dentro do domínio experimental avaliado, foi a concentração do ácido.

Na literatura, há diversos trabalhos que corroboram que o emprego de ácido diluído em decomposições em forno de micro-ondas não afeta a eficiência da

digestão como o de Peixoto e colaboradores (2019) que utilizou 6 mL de ácido nítrico $3,5 \text{ mol L}^{-1}$ e 1,5 mL de peróxido de hidrogênio $30\% \text{ m m}^{-1}$ para decompor amostras de leite materno e de Lee e colaboradores (2022) que empregou 6 mL de ácido nítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 2 mL de peróxido de hidrogênio $30\% \text{ m m}^{-1}$ para decompor amostras de leite.

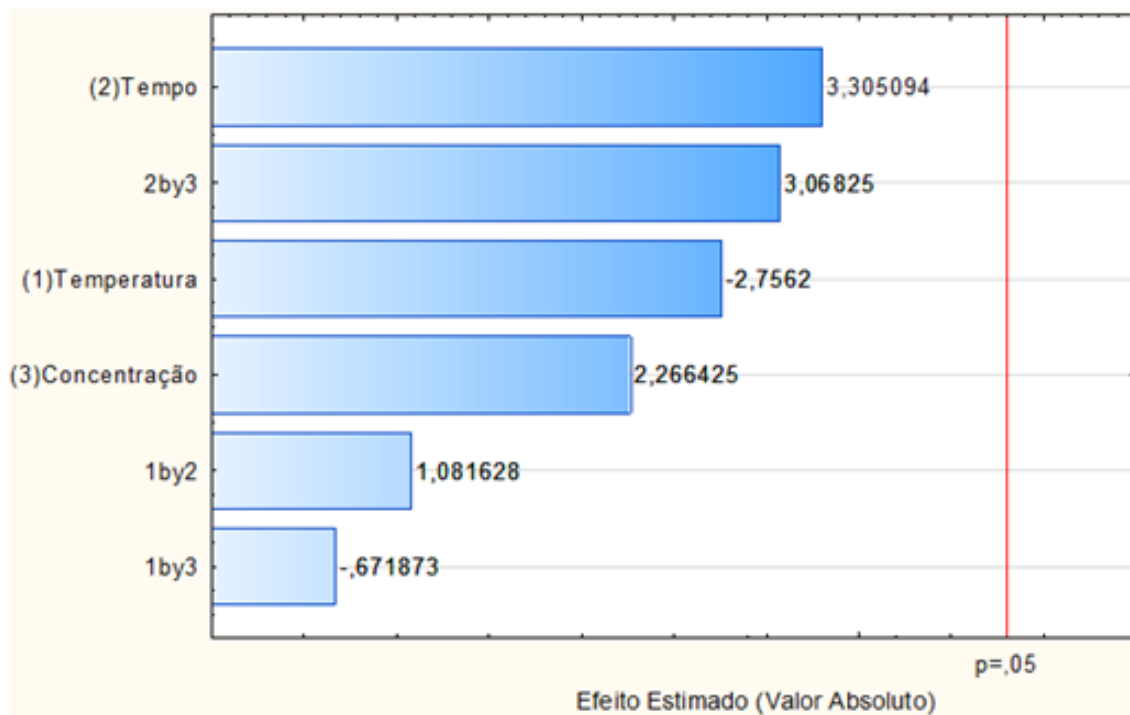
Figura 3 - Gráfico de superfície de resposta para o DOC para decomposição assistida por micro-ondas em função de (a) temperatura e tempo (b) concentração e tempo e (c) concentração e temperatura.



Fonte: Autoria própria

Além do DOC, foi avaliada a resposta múltipla dos elementos determinados como variável dependente. Para tanto, os resultados foram tratados segundo a Equação 1, a partir da qual se obteve a resposta múltipla (RM) para os analitos, que se encontram sumarizadas na Tabela 6. Posteriormente, com base na análise do gráfico de Pareto (Figura 4), foi observado que para o domínio experimental avaliado, os efeitos para os fatores foram menores para o nível de 95% de confiança, o que indica estaticamente a ausência de significância. Os resultados também foram avaliados usando a ANOVA a 95% de confiança e o modelo não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$), visto que, o valor de p foi igual a 0,8370.

Figura 4 - Gráfico de Pareto para resposta múltipla do planejamento fatorial 2^3 com ponto central para decomposição assistida por micro-ondas.

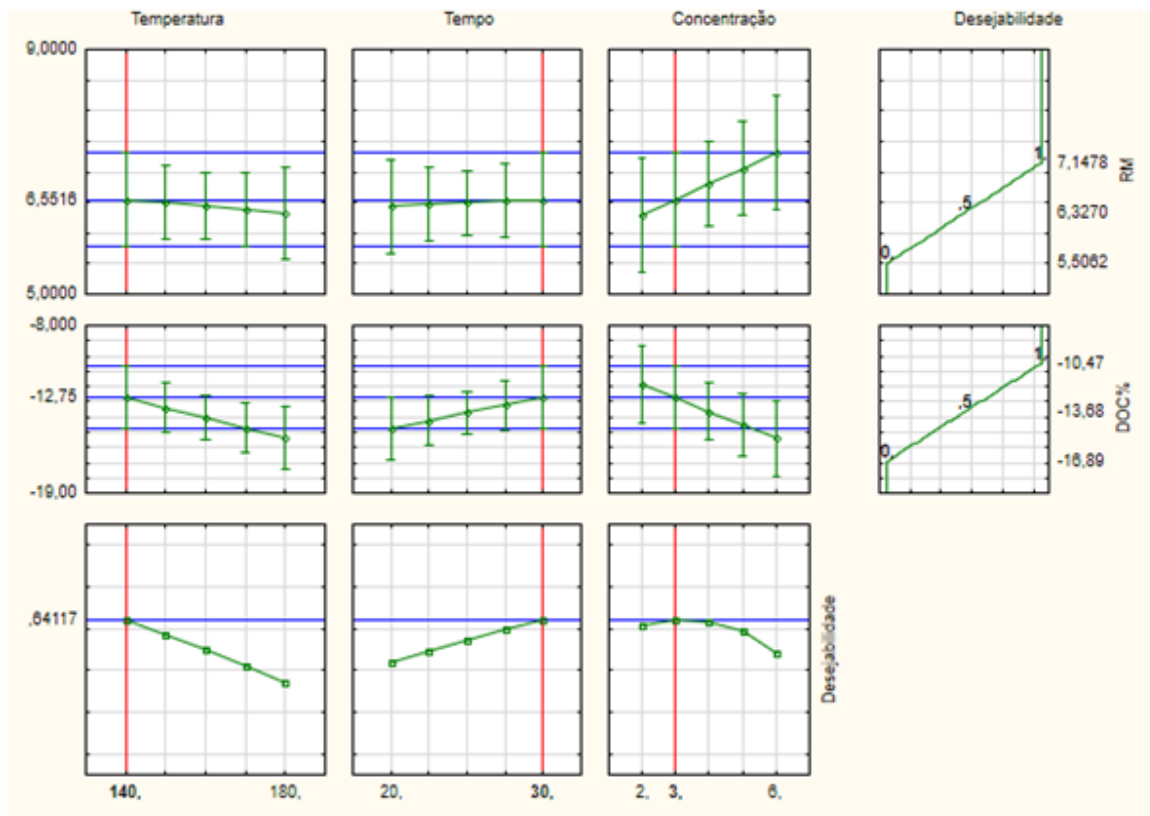


Fonte: Autoria própria

O experimento que obteve maior resposta múltipla foi o 7 que apresenta como condições de decomposição o emprego de ácido nítrico 6 mol L^{-1} , tempo de 30 minutos e a temperatura máxima de aquecimento de $140 \text{ }^\circ\text{C}$. Como o ensaio que teve a maior resposta múltipla foi diferente do que obteve o menor valor de DOC, empregou-se uma abordagem matemática baseada nas funções desejabilidade (Figura 5) que é uma técnica de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich (1980). Essa abordagem consiste em converter cada resposta em uma função

individual de desejabilidade, na qual varia de 0 a 1, onde o valor 0 (zero) representa a condição totalmente indesejada e 1 (um) é o valor máximo desejável, ou seja, a condição ótima. Essas variáveis independentes são escolhidas com o objetivo de maximizar a desejabilidade global (CARVALHO, 2015; FERREIRA, 2015; SANTANA, 2020).

Figura 5 - Perfis para valores previstos e desejabilidade para o planejamento fatorial 2^3 com DOC e RM para decomposição assistida por micro-ondas.



Fonte: Autoria própria

Sabendo que os gráficos na última linha representam os perfis de desejabilidade global e as linhas verticais indicam a condição que proporciona a desejabilidade global máxima, ao analisar a Figura 5, observou-se que os valores desejáveis que satisfazem as duas respostas (DOC% e RM) foram: ácido nítrico 3 mol L⁻¹, temperatura 140 °C e tempo de 30 minutos. Nenhum dos ensaios estudados satisfaz ambos os valores simultaneamente, visto que, em nenhum dos experimentos foi empregado o ácido nítrico nessa concentração. O ensaio que teve a concentração mais próxima, e os outros valores dos fatores iguais, foi o experimento 5 que apresentou como condições de decomposição o emprego de

ácido nítrico 2 mol L^{-1} , tempo de 30 minutos e a temperatura máxima de aquecimento de $140 \text{ }^\circ\text{C}$. Como discutido anteriormente, esse ensaio obteve o menor teor de DOC, além de ter uma concentração ácida final de $0,40 \pm 0,03 \text{ mol L}^{-1}$, sendo adequada para análise por ICP OES (KRUG; ROCHA, 2016).

A partir da otimização, foi possível adotar o uso de ácido nítrico diluído na decomposição assistida por radiação micro-ondas de uma matriz proteica e gordurosa. A possibilidade de empregar soluções diluídas sem comprometer a eficiência da digestão no preparo de amostras por radiação micro-ondas em sistema fechado se deve a uma série de reações que ocorrem durante a oxidação da matéria orgânica, as quais resultam na regeneração *in situ* do ácido nítrico. Essas reações dependem de dois fatores: o gradiente de temperatura ao longo do frasco reacional e a presença de O_2 na atmosfera interna dele, sendo que, uma fonte alternativa de O_2 pode ser obtida pelo emprego de peróxido de hidrogênio, como visualizado no trabalho, e que também atua como oxidante auxiliar (BARELA *et al.*, 2017; BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014; KRUG; ROCHA, 2016). Apesar de ser reportado na base literária trabalho que envolvem a decomposição de leite empregando ácido diluídos, não é reportado nenhum compreende a digestão de queijos nessas condições.

Portanto, diante do exposto, foi definido como condições experimentais para o procedimento de decomposição assistida por micro-ondas, a utilização de 6 mL de ácido nítrico $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, 2 mL peróxido de hidrogênio 30%, adotando o programa de aquecimento que consiste em uma rampa de aquecimento até a temperatura de $140 \text{ }^\circ\text{C}$ durante um intervalo de 10 minutos e a manutenção constante dessa temperatura por 20 minutos, totalizando 30 minutos de decomposição.

Os mesmos parâmetros concentração de ácido nítrico, temperatura e tempo de decomposição foram analisados para a decomposição das amostras de queijo por aquecimento condutivo no bloco digestor fechado. Analisando o aspecto visual dos digeridos, em nenhuma das condições avaliadas ocorreu à presença de material particulado nas soluções resultantes, indicando pode ter ocorrido uma decomposição completa da matriz. A outra resposta de interesse foi o percentual de DOC, sendo que os valores para cada ensaio podem ser visualizados na Tabela 7.

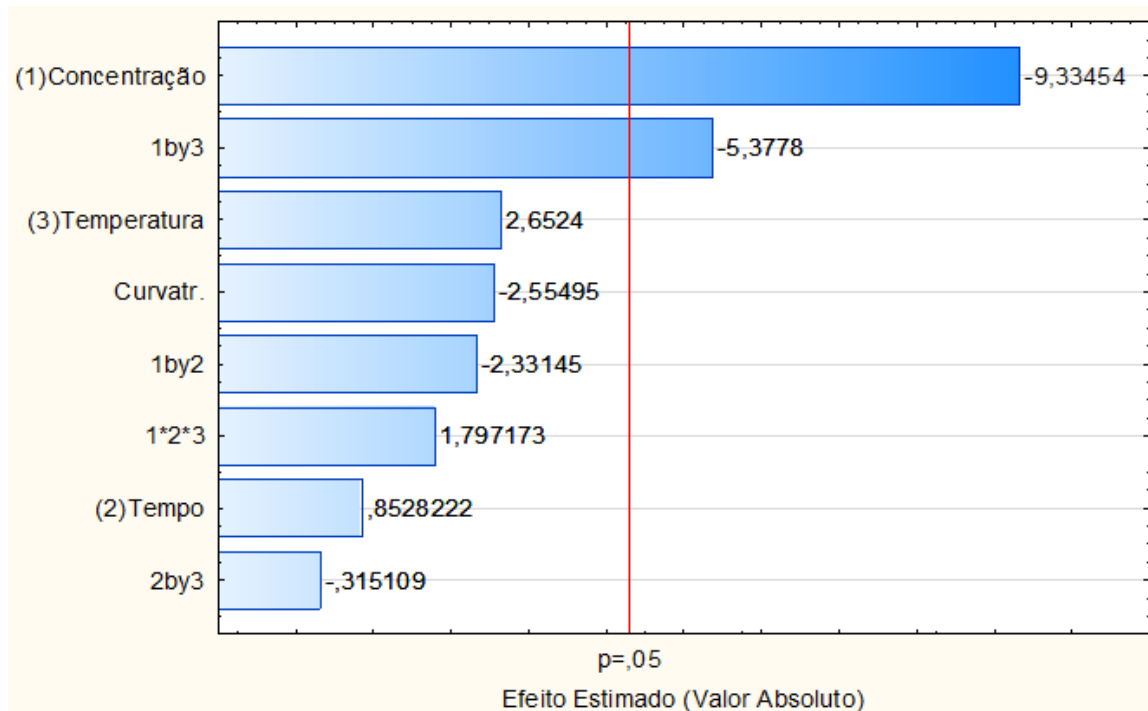
Tabela 7 - Planejamento fatorial 2³ com a valor de DOC e resposta múltipla para cada procedimento da decomposição no bloco digestor fechado.

Ensaio	[HNO₃] (mol L⁻¹)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	DOC (% m m⁻¹)	Resposta múltipla
1	2,0 (-)	40 (-)	140 (-)	16,68	5,23
2	2,0 (-)	40 (-)	180 (+)	11,28	5,12
3	2,0 (-)	80 (+)	140 (-)	13,86	6,91
4	2,0 (-)	80 (+)	180 (+)	10,71	5,36
5	14,0 (+)	40 (-)	140 (-)	16,59	6,21
6	14,0 (+)	40 (-)	180 (+)	18,84	4,76
7	14,0 (+)	80 (+)	140 (-)	18,17	4,24
8	14,0 (+)	80 (+)	180 (+)	18,83	5,15
9 (PC)	8,0 (0)	60 (0)	160 (0)	17,30	5,48
10 (PC)	8,0 (0)	60 (0)	160 (0)	17,42	6,74
11 (PC)	8,0 (0)	60 (0)	160 (0)	16,06	6,50

Fonte: Autoria própria

Ao analisar os teores de DOC, o menor percentual encontrado correspondeu a 10,71 % m m⁻¹, sendo verificado no ensaio 4 que apresentou como condições de decomposição na temperatura de 180 °C por 80 minutos com o emprego de ácido nítrico 2 mol L⁻¹. Verificou-se pela análise do gráfico de Pareto (Figura 6) que para o domínio experimental avaliado, a concentração e a interação entre concentração e temperatura foram significativas, ambos negativos, sendo o efeito mais significativo a concentração. Os resultados foram avaliados usando a ANOVA a 95% de confiança, demonstrando que o modelo não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$), tendo valor de p igual a 0,1701.

Figura 6 - Gráfico de Pareto para DOC do planejamento fatorial 2^3 com ponto central para decomposição no bloco digestor fechado.

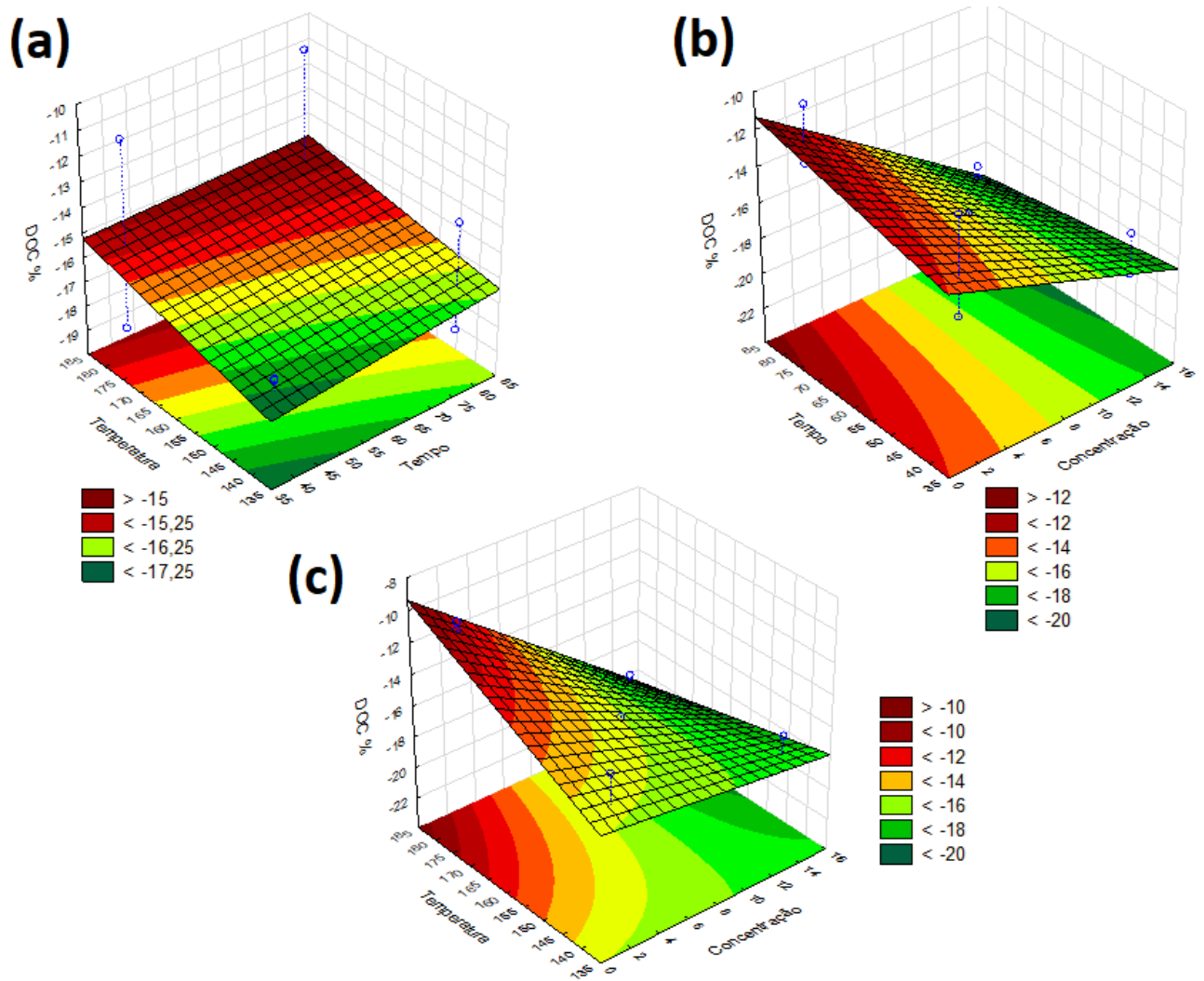


Fonte: Autoria própria

Ao analisar a Figura 7(a) observou-se que a região que apresenta menores percentuais de DOC, dentro do domínio experimental avaliado, foi quando a temperatura está acima de 170 °C, ou seja, superior à temperatura de degradação da proteína (160 °C) relatada na literatura. No procedimento anterior foi possível o emprego de uma temperatura inferior, visto que, na aplicação da radiação micro-ondas pode ocorrer a formação de pontos de superaquecimentos, denominados *hot spots*, no meio reacional devido a não homogeneidade da absorção da radiação pelas espécies químicas (HOZ; DÍAS-ORTIZ; MORENO, 2007; HU; MA, D.; MA, J., 2021). Ademais, alguns autores defendem que efeitos não térmicos da radiação micro-ondas ocasiona mudanças em parâmetros termodinâmicos. Isto acontece devido a oscilação do campo elétrico, há sucessivas mudanças de orientação das espécies químicas polares, levando ao aumento da probabilidade de choques (HOZ; DÍAS-ORTIZ; MORENO, 2007; SOUZA; MIRANDA, 2011).

Ao observar a Figura 7(b) e 7(c) nota-se que os menores valores de DOC, dentro do domínio experimental avaliado, ocorreram com o emprego de ácido nítrico diluído. Mas para que seja possível alcançar esses valores, seria necessário que a decomposição ocorresse acima de 170 °C por mais de 70 min.

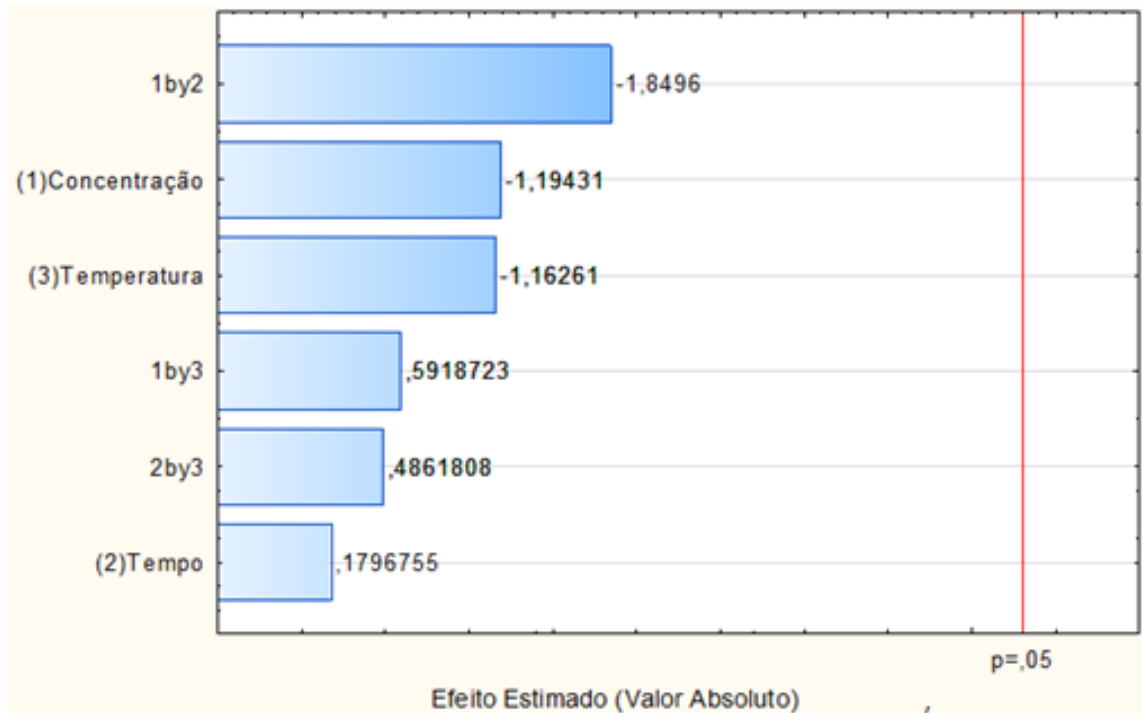
Figura 7 - Gráfico de superfície de resposta para o DOC para decomposição no bloco digestor fechado em função de (a) temperatura e tempo (b) tempo e concentração e (c) temperatura e concentração.



Fonte: Autoria própria

Ademais, foi avaliado a resposta múltipla dos analitos, dessa forma, os resultados foram tratados segundo a Equação 1. Os valores se encontram sumarizadas na Tabela 7. Subsequentemente, com base na análise do Gráfico de Pareto (Figura 8), foi observado que para o domínio experimental avaliado, nenhuma das variáveis foram significativas para o nível de 95% de confiança. Os resultados foram avaliados usando a ANOVA a 95% de confiança e o modelo não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$), visto que, o valor de p foi igual a 0,2062.

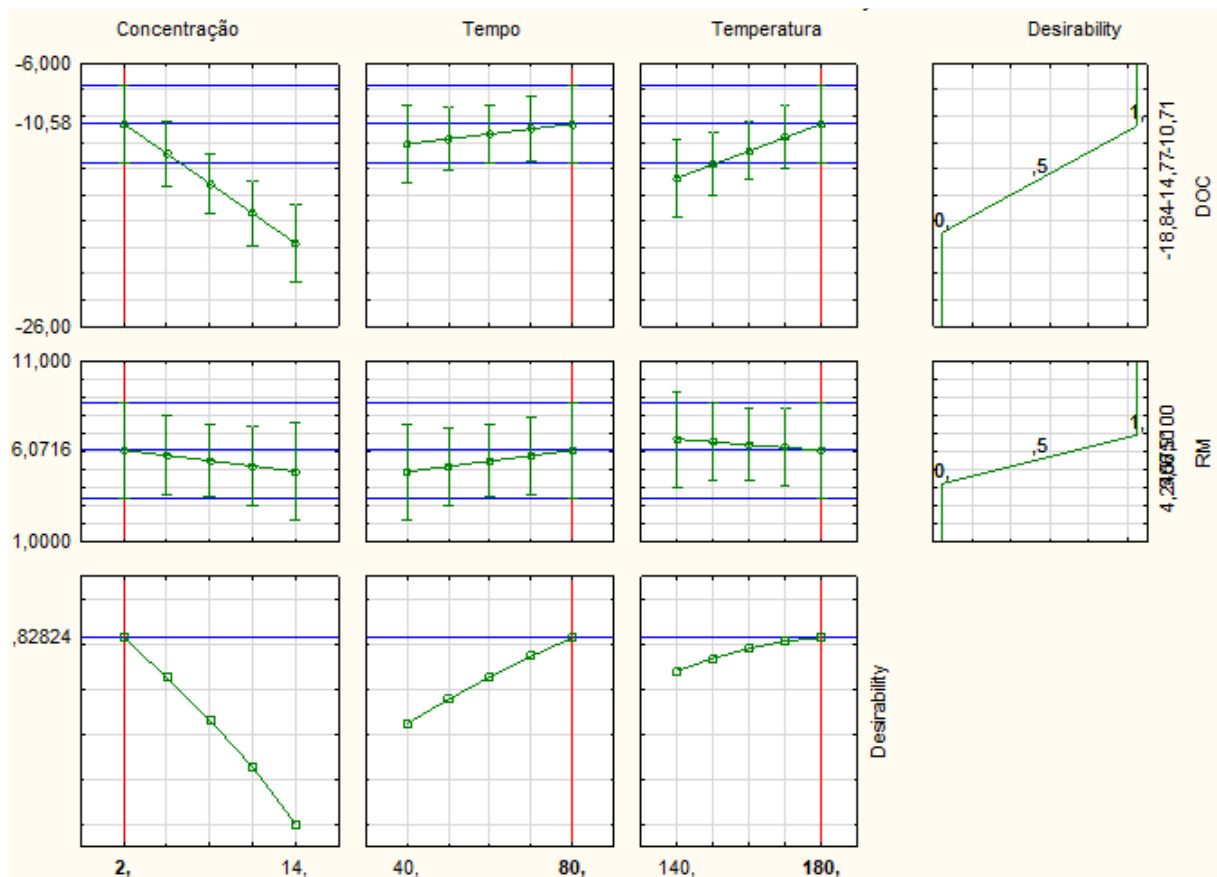
Figura 8 - Gráfico de Pareto para RM do planejamento fatorial 2^3 com ponto central para decomposição no bloco digestor fechado.



Fonte: Autoria própria

O experimento que obteve maior resposta múltipla foi o 3 que apresenta como condições a digestão na temperatura de 140 °C por 80 minutos com o auxílio de ácido nítrico 2 mol L⁻¹. Como as avaliações das variáveis dependentes (DOC e RM) teve condições otimizadas diferentes, aplicou-se a função de desejabilidade (Figura 9) para estabelecer quais são as condições ótimas de decomposição, das amostras de queijo, por aquecimento condutivo no bloco digestor fechado.

Figura 9 - Perfis para valores previstos e desejabilidade para o planejamento fatorial 2^3 com DOC e RM para decomposição no bloco digestor fechado.



Fonte: Autoria própria

Ao analisar a Figura 9, observou-se que os valores desejáveis que satisfazem as duas respostas (DOC% e RM) foram: ácido nítrico 2 mol L⁻¹, temperatura 180 °C e tempo 80 minutos. Essa condição correspondeu ao ensaio 4 que teve 10,71% de DOC e RM de 5,36. Esse experimento obteve o menor teor de DOC, além de ter uma concentração ácida final de 0,66 ± 0,04 mol L⁻¹, sendo adequada para análise no ICP OES (KRUG; ROCHA, 2016).

Devido a esse fato, optou-se pelas seguintes condições de decomposição no aquecimento condutivo por bloco digestor fechado: 250 mg de queijo decomposto com o auxílio de 6 mL de HNO₃ 2 mol L⁻¹ e 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹, na temperatura de digestão de 180 °C por 80 minutos.

Da mesma forma que ocorreu no procedimento de decomposição assistida por micro-ondas, na digestão por aquecimento condutivo no bloco digestor fechado foi possível a utilização de ácido diluído para decompor uma matriz proteica como queijo. Na literatura há poucos trabalhos com empregando o ácido nítrico diluído no

preparo de amostra no bloco digestor fechado (FERREIRA *et al.*, 2019; SANTANA *et al.*, 2021, SANTOS *et al.*, 2021).

Apesar desses trabalhos tratarem de preparos de amostra empregando ácido nítrico diluído, não há relato na literatura da utilização de ácido diluído na decomposição, em bloco digestor fechado, de amostras com alto índice proteico como queijos.

Comparando os dois procedimentos propostos, em ambos foi possível o emprego de ácido nítrico diluído na concentração de 2 mol L^{-1} , o que está de acordo com os princípios da Química Verde, em virtude de proporcionar uma redução nos volumes de resíduos ácidos que são produzidos, do qual exige gerenciamento adequado para evitar danos ao meio ambiente (ÁVILA *et al.*, 2018). Além disso, é benéfico para as estratégias analíticas, pois propicia menores valores de branco analítico, e conseqüentemente, menores valores de limite de detecção e quantificação.

Em relação aos outros fatores otimizados, a temperatura e o tempo necessário para a decomposição da amostra de queijo assistida por radiação micro-ondas foram menores do que no aquecimento condutivo, sendo possível a digestão de amostra com alto teor proteico em uma temperatura abaixo ($140 \text{ }^\circ\text{C}$) da reportada na literatura para a degradação de proteína ($160 \text{ }^\circ\text{C}$) em 30 minutos. Contudo, o equipamento de forno de micro-ondas apresenta um alto custo, ademais é necessário maior grau de treinamento para a sua operação, portanto, o emprego do bloco digestor fechado pode ser uma excelente alternativa.

4.2 VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE DECOMPOSIÇÃO NO MICRO-ONDAS

Os procedimentos analíticos devem passar por uma avaliação denominada validação. Esse processo tem aspecto vital na garantia da qualidade analítica, visto que, tem como objetivo garantir que a estratégia analítica é apropriada para a finalidade a que se destina, assegurando que os valores obtidos na análise sejam próximos o suficiente do valor verdadeiro desconhecido, indicando confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2017; RAPOSO; IBELLI-BIANCO; 2020; SANTOS, L. *et al.*, 2014).

No Brasil, um dos órgãos que regulamenta a validação das estratégias analíticas é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (SANTANA, 2020).

Neste trabalho, a validação ocorreu após avaliação dos parâmetros de desempenho: efeito matriz, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão e exatidão.

4.2.1 Efeito matriz

Apesar da técnica de ICP OES ter capacidade de determinação multielementar com a possibilidade de determinação simultânea, é suscetível a interferências do tipo espectrais e não espectrais, sendo que a última é denominada efeito de matriz. Essa interferência é causada por constituintes da matriz que compromete a determinação do analito, podendo aumentar ou diminuir o sinal analítico, ocasionando em um resultado errôneo da concentração (CARTER *et al.*, 2021; CARVALHO, 2015).

Os efeitos de matriz dos procedimentos analíticos propostos foram estimados por meio da comparação da razão entre os coeficientes angulares (sensibilidade) das curvas de calibração obtidas por adição de analito e os coeficientes das curvas de calibração externa (BRASIL, 2017; CARTER *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2020). A Tabela 8 apresenta os valores dos coeficientes angulares obtidos para cada curva analítica e a razão entre elas, referentes a decomposição no forno micro-ondas e no bloco digestor fechado.

As razões encontradas para a decomposição assistida por radiação micro-ondas variaram entre 0,81 e 1,17 sendo o menor valor para Ca e o maior para Cr. Em relação ao procedimento proposto empregando a digestão em bloco digestor fechado, as razões variaram entre 0,81 e 1,09 sendo o menor valor para Ca e o maior para Cr. Como as razões ficaram na faixa entre 0,80 – 1,20, não foi constatado efeito de matriz (CARTER *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2020).

Tabela 8 - Coeficientes angulares das curvas analíticas de calibração para o estudo do efeito de matriz dos procedimentos propostos usando soluções padrão em ácido diluído e no meio da amostra

Linha (nm)	Coeficiente angular em meio ácido (a)	Forno de micro-ondas		Bloco digestor fechado	
		Coeficiente angular em meio do digerido (d _M)	Razão (d _M ÷ a)	Coeficiente angular em meio do digerido (d _B)	Razão (d _B ÷ a)
Ca (317,933)	41813	34032	0,81	33842	0,81
Cr (267,716)	30868	36229	1,17	33800	1,09
Cu (324,754)	57340	64953	1,13	61045	1,06
K (766,491)	156191	165109	1,06	164664	1,05
Mn (257,610)	353192	372805	1,06	373180	1,06
Na (568,821)	823,28	806,67	0,98	825,05	1,00
P (213,618)	1631,6	1639,5	1,00	1574,4	0,96
Zn (213,857)	35978	36799	1,02	35424	0,98

Fonte: Autoria própria

4.2.2 Limite de detecção e de quantificação

Os resultados obtidos para os LOD e LOQ referentes ao procedimento de digestão empregando radiação assistida por micro-ondas, expressos em mg L⁻¹ e µg g⁻¹, estão apresentados na Tabela 9. Pode-se observar, com base nos valores estimados, que os procedimentos propostos asseguraram limites de detecção e quantificação adequados para a determinação de constituintes majoritários e minoritários em matrizes de queijo.

Para o procedimento proposto empregando o forno de micro-ondas, o LOD variou entre 0,06 (Mn) e 28 µg g⁻¹ (Na) e o LOQ entre 0,2 (Mn) e 94 µg g⁻¹ (Na). Em

relação ao procedimento analítico de decomposição utilizando o bloco digestor fechado, o LOD variou entre 0,07 (Cr) e 14 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Na) e o LOQ entre 0,24 (Cr) e 45 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Na). Em ambos, os limites de detecção e de quantificação apresentaram valores baixos, indicando que têm uma alta sensibilidade. Tal fato pode ser atribuído ao uso de ácido diluído para a decomposição da amostra (BIZZI; NÓBREGA; BARIN, 2014). Adicionalmente, os valores de LOD e LOQ foram equiparáveis a outros relatados em trabalhos prévios na literatura (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de Limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) dos procedimentos propostos de decomposição de queijos no forno de micro-ondas e no bloco digestor fechado comparado com os declarados na literatura.

Fonte	LOD (mg L ⁻¹) (µg g ⁻¹)*							
	Ca	Cr	Cu	K	Na	Mn	P	Zn
Este trabalho. (Decomposição no forno de micro-ondas)	0,16 (16*)	0,003 (0,3*)	0,016 (1,6*)	0,14 (14*)	0,28 (28*)	0,0006 (0,06*)	0,02 (2*)	0,04 (4*)
Este trabalho. (Decomposição no bloco digestor fechado)	0,12 (10*)	0,0009 (0,07*)	0,004 (0,3*)	0,01 (0,8*)	0,17 (14*)	0,001 (0,08*)	0,02 (2*)	0,02 (1,6*)
DONATO <i>et al.</i> , 2021	3,38*	n.d.	n.d.	1,43*	5,64*	n.d.	2,80*	0,24*
CAPCAROVA <i>et al.</i> , 2020	0,06	0,030	0,09	0,18	0,02	0,025	n.d.	0,09
PIMENTEL <i>et al.</i> , 2018	0,84	n.d.	0,01	0,42	0,86	0,01	n.d.	n.d.
GONZÁLEZ-MARTÍN <i>et al.</i> , 2011	10*	n.d.	n.d.	22*	36*	n.d.	28*	n.d.
Fonte	LOQ (mg L ⁻¹) (µg g ⁻¹)*							
	Ca	Cr	Cu	K	Na	Mn	P	Zn
Este trabalho. (Decomposição no forno de micro-ondas)	0,53 (53*)	0,01 (0,9*)	0,053 (5,3*)	0,46 (46*)	0,94 (94*)	0,002 (0,2*)	0,07 (7*)	0,12 (12*)
Este trabalho. (Decomposição no bloco digestor fechado)	0,40 (32*)	0,003 (0,24*)	0,014 (1,1*)	0,03 (2,40*)	0,56 (45*)	0,003 (0,3*)	0,07 (6*)	0,06 (4,8*)
CAPCAROVA <i>et al.</i> , 2020	0,12	0,050	0,09	0,28	0,03	0,030	n.d.	0,17
PIMENTEL <i>et al.</i> , 2018	1,25	n.d.	0,02	0,62	1,27	0,01	n.d.	n.d.

Fonte: Autoria própria

n.d: Valor não declarado

4.2.3 Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade pode ser avaliada pelo coeficiente de correlação (R) e coeficiente de determinação (R^2). A ANVISA (BRASIL, 2017) recomenda um coeficiente de correlação acima de 0,990 a partir da determinação de no mínimo cinco concentrações distintas, devido aos possíveis erros associados.

. Na Tabela 10, pode-se observar que para todos os analitos estudados, em ambos os procedimentos propostos, os valores de correlação foram acima de 0,99, o que indica a boa linearidade dentro do intervalo de concentração avaliado.

Tabela 10 - Curvas analíticas, faixa de trabalho e coeficiente de correlação após decomposição assistida no micro-ondas e no bloco digestor

Analito	Forno de micro-ondas			Bloco digestor fechado		
	Equação da reta	Coeficiente de correlação (R)	Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	Equação da reta	Coeficiente de correlação (R)	Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)
Ca	$y = 40426x - 28603$	0,9993	[0,53 - 175]	$y = 40005x - 22186$	0,9995	[0,40 - 175]
Cr	$y = 30771x - 155,7$	0,9998	[0,01 - 2,5]	$y = 31097x - 326,16$	0,9996	[0,003 - 2,5]
Cu	$y = 39303x - 417,95$	0,9993	[0,05 - 2,5]	$y = 57340x - 1270,3$	0,9988	[0,014 - 2,5]
K	$y = 143257x - 2064,2$	0,9996	[0,46 - 25]	$y = 163119x - 45223$	0,99985	[0,03 - 25]
Na	$y = 828,4x + 240,27$	0,9995	[0,94 - 125]	$y = 826,38x + 175,48$	0,9995	[0,56 - 125]
Mn	$y = 351641x - 4694,4$	0,9996	[0,002 - 2,5]	$y = 350328x - 3908$	0,9996	[0,003 - 2,5]
P	$y = 1622,9x - 1145$	0,9997	[0,07 - 125]	$y = 1681,3x - 2668,1$	0,9986	[0,07 - 125]
Zn	$y = 36219x + 311,23$	0,9998	[0,12 - 2,5]	$y = 36506x - 1197,7$	0,9977	[0,06 - 2,5]

fechado para a amostra de queijo.

Fonte: Autoria própria

4.2.4 Precisão

A avaliação da precisão foi realizada em termos de repetitividade (precisão intracorrída) que expressa a precisão nas mesmas condições de operação (equipamento, analista, reagentes, local e tempo) em pelo menos seis determinações para uma única concentração (BRASIL, 2017).

Os resultados do teste de repetitividade para os procedimentos propostos estão apresentados na Tabela 11. Nota-se que, para a estratégia analítica empregando o forno micro-ondas, exceto para Cu, os demais analitos obtiveram coeficientes de variação (CV) $\leq 5\%$.

Em relação os coeficientes de variação obtidos para a decomposição utilizando o bloco digestor fechado, variou entre 4,3, para o fósforo, e 8,1, para o manganês, indicando também uma boa precisão do procedimento.

Tabela 11 - Resultados do teste de repetitividade (média \pm desvio padrão, n=8) após aplicação dos procedimentos propostos de decomposição assistida por micro-ondas e por aquecimento condutivo.

Analito	Forno de micro-ondas		Bloco digestor fechado	
	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CV (%)	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CV (%)
Ca	8417 \pm 341*	4,1	8676 \pm 434*	5,0
Cr	0,98 \pm 0,04*	4,0	0,96 \pm 0,07*	6,9
Cu	2,8 \pm 0,3*	9,6	2,2 \pm 0,1*	4,4
K	312 \pm 12*	3,4	347 \pm 24*	7,0
Na	4039 \pm 166*	4,1	4403 \pm 294*	6,7
Mn	2,0 \pm 0,1*	4,0	1,4 \pm 0,1*	8,1
P	5462 \pm 216*	4,0	6131 \pm 262*	4,3
Zn	38 \pm 2*	4,3	43 \pm 3*	7,6

*Desvio padrão

Fonte: Autoria própria

4.2.5 Exatidão

As exatidões dos procedimentos propostos foram avaliadas comparando os resultados obtidos pelas estratégias analíticas propostas e pela de referência preconizada pelo Instituto Adolf Lutz (2008) para amostras de queijo. As

concentrações de cada elemento da amostra de mussarela de búfala (MBB) encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 – Concentração dos analitos ($\mu\text{g g}^{-1}$) após decomposição pelo método de referência e pelos procedimentos propostos (média \pm desvio padrão, $n = 3$).

Analito	Método de Referência	Procedimento	Procedimento
		proposto – Micro-ondas	proposto – Bloco digestor
Ca	7999 \pm 56	8601 \pm 224	8100 \pm 142
Cr	n.d.	0,98 \pm 0,03	0,38 \pm 0,07
Cu	3,4 \pm 0,2	4,3 \pm 0,4	3,4 \pm 0,4
K	198 \pm 14	235 \pm 4	220 \pm 3
Na	6769 \pm 377	8114 \pm 242	8151 \pm 405
Mn	5,6 \pm 0,5	8,7 \pm 0,1	7,0 \pm 0,1
P	4168 \pm 48	5359 \pm 112	5332 \pm 165
Zn	50 \pm 9	44 \pm 2	45 \pm 3

n.d. não detectado

Fonte: Autoria própria

Com objetivo de comparar os valores obtidos em cada procedimento, foi aplicado o teste t de comparação de médias, ao nível de confiança de 95%, não sendo observado a ocorrência de erro sistemático significativo ($p > 0,05$) para o zinco, em ambas as estratégias analíticas, e para cálcio, cobre e potássio para o procedimento de decomposição empregando o bloco digestor fechado.

Um provável motivo de não ter sido possível validar os demais elementos pode ter sido devido ao emprego do ácido clorídrico na decomposição do derivado lácteo, uma vez que apresenta propriedades complexantes e não oxidantes (KRUG; ROCHA, 2016). Portanto, pode não ter sido possível oxidar a matéria orgânica, sendo que uma evidência desse fato é que a decomposição foi incompleta. Essa ausência na dissolução completa do lácteo pode ter resultado em valores de concentração abaixo do real, para elementos como cálcio e potássio que apresentam uma fração associada a proteínas como a caseína (KIRA; MAIHARA, 2007; SOUZA, L. 2015).

As exatidões também foram avaliadas através de material certificado de referência de leite em pó integral (CRM NIST 1549a), tendo os valores de percentual de concordância indicados na Tabela 13. Para o procedimento empregando o forno micro-ondas, os percentuais de concordância, em %, entre o valor encontrado e o valor certificado variaram entre 95 ± 1 (K) e 1614 ± 32 (Mn). Para a estratégia analítica utilizando o bloco digestor fechado, os percentuais variaram entre 92 ± 1 (Zn) e 1587 ± 28 (Mn). Admitindo uma faixa de concordância entre 90 – 115% como a ideal para os procedimentos propostos, ambos não apresentaram boa exatidão para determinação de Mn.

Tabela 13 - Composição do material de referência certificado, em $\mu\text{g g}^{-1}$, CRM NIST 1549a, após digestão ácida nos procedimentos propostos (média \pm intervalo de confiança, n=3).

Analito	Valor certificado	Valor encontrado -		Valor encontrado -	
		Micro-ondas	REC (%)	- Bloco digestor	REC (%)
Ca	8810 ± 240	9606 ± 77	109 ± 1	9229 ± 117	105 ± 1
K	11920 ± 430	11372 ± 155	95 ± 1	11462 ± 47	96 ± 1
Na	3176 ± 58	3543 ± 41	111 ± 1	3482 ± 74	109 ± 2
Mn	$0,184 \pm 0,024$	$2,97 \pm 0,07$	1614 ± 32	$2,92 \pm 0,05$	1587 ± 28
P	7600 ± 500	8327 ± 14	110 ± 1	7956 ± 80	105 ± 1
Zn	$33,8 \pm 2,3$	$32,8 \pm 0,6$	97 ± 2	$31,1 \pm 0,1$	92 ± 1

Fonte: Autoria própria

4.3 APLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS PROPOSTOS NAS AMOSTRAS DE QUEIJO BRANCO

Os procedimentos propostos empregando a decomposição por radiação micro-ondas e por aquecimento condutivo foram aplicados para a determinação de Ca, Cu, K, Na, P e Zn, no ICP OES, em 9 amostras de queijos brancos, abrangendo 8 marcas diferentes (A à H), comercializadas em supermercados de Salvador, Bahia.

As amostras analisadas foram 2 de queijo mussarela de búfala, 2 amostras de minas frescal, 2 de ricota, 2 de coalho e 1 de cottage, MBA, MBB, MFC, MFD, RIE,

RIF, COD, COG, CTH, respectivamente. As concentrações dos analitos para cada queijo encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) dos analitos nas amostras de queijo após aplicação dos procedimentos propostos (média \pm desvio) (n=3).

Amostra	Procedimento	Ca	Cu	K	Na	P	Zn
MBA	Micro-ondas	8417 \pm 341		312 \pm 12	4239 \pm 166	5462 \pm 216	38 \pm 2
	Bloco digestor	8676 \pm 434	2,2 \pm 0,1	347 \pm 24	4403 \pm 294	6131 \pm 262	43 \pm 3
MBB	Micro-ondas	8601 \pm 224		235 \pm 4	8114 \pm 242	5332 \pm 164	49 \pm 3
	Bloco digestor	8100 \pm 142	3,4 \pm 0,4	226 \pm 13	8151 \pm 405	5359 \pm 112	44 \pm 1
MFC	Micro-ondas	9054 \pm 190		752 \pm 5	3798 \pm 93	4869 \pm 136	40 \pm 1
	Bloco digestor	8753 \pm 188	3,5 \pm 0,6	713 \pm 28	3599 \pm 141	4587 \pm 141	38 \pm 1
MFD	Micro-ondas	10828 \pm 262		927 \pm 27	5457 \pm 139	6361 \pm 143	55 \pm 3
	Bloco digestor	10271 \pm 241	3,3 \pm 0,2	870 \pm 10	5868 \pm 60	6151 \pm 117	54 \pm 2
RIE	Micro-ondas	8702 \pm 488		1103 \pm 34	3386 \pm 59	3202 \pm 228	9,4 \pm 2,2
	Bloco digestor	8278 \pm 296	3,7 \pm 0,8	1049 \pm 36	3107 \pm 55	3228 \pm 126	9,3 \pm 0,8
RIF	Micro-ondas	2265 \pm 41		595 \pm 11	785 \pm 16	1736 \pm 130	8,1 \pm 0,9
	Bloco digestor	2255 \pm 31	< LOQ	591 \pm 23	746 \pm 10	1509 \pm 14	6,9 \pm 2,1
COD	Micro-ondas	10365 \pm 274		831 \pm 28	6650 \pm 263	5334 \pm 189	43 \pm 3
	Bloco digestor	9640 \pm 139	3,2 \pm 0,1	832 \pm 7	6317 \pm 115	5450 \pm 215	46 \pm 1

Fonte: Autoria própria

Tabela 14 - Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) dos analitos nas amostras de queijo após aplicação dos procedimentos propostos (média \pm desvio) (n=3).

Amostra	Procedimento	Ca	Cu	K	Na	P	Zn
COG	Micro-ondas	4468 \pm 201		732 \pm 31	5	2731 \pm 163	15 \pm 1
	Bloco digestor	4086 \pm 167	< LOQ	679 \pm 23	4087 \pm 168	2379 \pm 89	16 \pm 1
CTH	Micro-ondas	2895 \pm 54		556 \pm 8	4589 \pm 41	1381 \pm 174	17 \pm 2
	Bloco digestor	2936 \pm 137	3,1 \pm 0,1	562 \pm 29	4315 \pm 173	1436 \pm 154	15 \pm 1

Fonte: Autoria própria

Pode-se observar que os macrossubstâncias Ca, P e Na apresentaram os maiores teores variando entre 1381 ± 174 (P) a 10828 ± 262 (Ca) $\mu\text{g g}^{-1}$. Por outro lado, os menores foram encontrados para o microelemento Cu, com os valores variando entre <1 e $3,7 \pm 0,8\mu\text{g g}^{-1}$.

Na Tabela 15, pode-se verificar os intervalos determinados de concentração dos analitos nos tipos de queijos brancos analisados. Nota-se que as concentrações dos elementos essenciais podem se diferenciar bastante a depender dos derivados lácteos comparados. Isso está relacionado a etapa de produção que difere em alguns fatores, como a forma de coagulação, pH, balanço de sal e temperatura, para cada tipo com o propósito de proporcionar sabor, textura ou aroma particulares, no entanto, isto também afeta a composição nutricional (FOX, 2017; OSORIO *et al*, 2015; MANUELIAN *et al*, 2017).

Tabela 15 - Intervalo de concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) de macros e microelemento nos queijos analisados.

Analito	Mussarela de búfala	Minas frescal	Ricota	Coalho	Cottage
Ca	8100 – 8676	8753 – 10828	2255 – 8702	4086 – 10365	2895 – 2936
Cu	2,2 – 4,3	3,3 – 3,5	<1 – 3,7	<1 – 3,2	3,1
K	226 – 312	713 – 927	591 – 1103	679 – 832	556 – 562
Na	4003 – 8115	3599 – 5868	746 – 3107	4087 – 6317	4315 – 4589
P	5332 – 6131	4587 – 6361	1509 – 3228	2379 - 5450	1381 – 1436
Zn	38 – 49	38 – 55	7 – 9	15 – 46	15 – 17

Fonte: Autoria própria

Analisando os teores encontrados para o mesmo tipo de queijo, observou diferença significativa, a nível de 95% de confiança, para todos os analitos ao comparar os queijos coalhos. Em relação as amostras de minas frescal, teve

diferença significativa para todos os analitos, exceto para o Cu, e para as ricotas, exceto para o Zn. Entre as mussarelas de búfala, foi observado diferença significativa para Na, Cu e K.

Também foram comparados os intervalos das concentrações dos analitos determinados com os valores encontrados na literatura para cada tipo de queijo, como apresentado na Tabela 16. Ao analisá-la, nota-se a dificuldade de determinar um valor médio para os elementos constituintes em um tipo queijo devido a diversos fatores, como o leite utilizado na produção, que podem interferir na composição nutricional. Em um trabalho realizado por Vidu *et al.* (2015), ao analisarem o leite de 39 búfalos leiteiros na primeira, segunda ou terceira lactação, notaram que as concentrações de Ca, P, K, Cu e Fe diferem significativamente ($p < 0,05$) a depender de qual lactação o animal está passando.

Tabela 16 - Teores de nutrientes inorgânicos (mg 100g⁻¹) em amostras dos queijos brancos analisadas e valores declarados na literatura (Continuação).

Mussarela de búfala						Fonte
Ca	Cu	P	Na	K	Zn	
810 – 868	0,2 – 0,4	533 – 613	400 – 812	23 – 31	4 – 5	Este trabalho
575	0,02	412	415	75	2,46	IBGE, 2011
208 ± 11	0,024 ± 0,002	152 ± 7	211 ± 19	18 ± 2	1,34 ± 0,05	MANUELIAN <i>et al.</i> , 2017
246	0,08	434	537	57,2	3,25	TBCA, 2022
Minas frescal						Fonte
Ca	Cu	P	Na	K	Zn	
875 – 1083	0,3 – 0,4	459 – 636	360 – 587	71 – 93	3 – 6	Este trabalho
579	ND	123	31	105	0,3	TACO, 2011
529	0,03	829	1587	330	2,36	IBGE, 2011
568,5 ± 55,6	0.67 ± 0.021	ND	274,9 ± 107,1	76,4 ± 9,5	3,9 ± 0,5	MATERA <i>et al.</i> , 2018
611	ND	123	31,2	104	1,51	TBCA, 2022

Fonte: Autoria própria
 ND: Valor não declarado

Tabela 16 - Teores de nutrientes inorgânicos (mg 100g⁻¹) em amostras dos queijos brancos analisadas e valores declarados na literatura (Continuação).

Coalho						Fonte
Ca	Cu	P	Na	K	Zn	
409 – 1036	0,3	238 - 545	409 – 632	68 – 83	1,5 – 5	Este trabalho
746	0,03	444	536	81	3	IBGE, 2011
645 – 911	0,06	ND	402 – 868	44 – 68	ND	ANDRADE <i>et al.</i> , 2022
654,8 ± 50,9	0,59 ± 0,037	ND	827,9 ± 157,9	0,051 ± 0,010	4,3 ± 0.4	MATERA <i>et al.</i> , 2018
731	0,07	423	526	126	2,86	TBCA, 2022
Ricota						Fonte
Ca	Cu	P	Na	K	Zn	
226 – 870	0,4	151 – 323	75 – 311	59 – 110	0,7 – 0,9	Este trabalho
253	ND	162	283	112	0,5	TACO, 2011
207	0,02	158	84	105	1,16	IBGE, 2011
260 – 446	ND	ND	80 – 183	75 – 114	0,35 – 0,48	GAMBELLI <i>et al.</i> , 1999
Cottage						Fonte
Ca	Cu	P	Na	K	Zn	
290 – 294	0,3	138 – 144	414 – 449	56 – 56	1,5 – 1,7	Este trabalho
529	ND	829	1587	330	2,36	IBGE, 2011

Fonte: Autoria própria
 ND: Valor não declarado

Um dos fatores que resulta nessas diferenças encontradas, é o fato de que não há uma legislação que defina os valores mínimos e máximos para os nutrientes nos queijos (CANOZER; KÖSE, 2022; RODRIGUES, 2016). Por causa disso, é importante o consumidor ficar atento aos rótulos dos produtos, para que faça escolhas conscientes na compra. Considerando que o teor de sódio por porção, que para queijos é de 30 g (BRASIL, 2003a), é uma das informações obrigatórias nos rótulos, a Tabela 17 apresenta a comparação do valor do nutriente informado na embalagem com o quantificado no bloco digestor fechado. Para as amostras de mussarela de búfala, no momento da compra não foi possível o acesso às embalagens porque os vendedores já tinham descartado por se tratar de produtos que tem a possibilidade da compra de fatias em vez do produto lácteo inteiro.

Tabela 17 - Comparação dos teores de sódio do rótulo e o quantificado no bloco digestor fechado e o percentual de diferença entre eles.

Minas frescal			
Marca	Bloco digestor	No rótulo	Diferença (%)
C	108*	153*	-29%
D	176*	134*	+31%
Ricota			
Marca	Bloco digestor	No rótulo	Diferença (%)
E	93*	56*	+ 66%
F	22*	56*	- 60%
Coalho			
Marca	Bloco digestor	No rótulo	Diferença (%)
D	190*	183*	+ 4%
G	123*	115*	+ 7%
Cottage			
Marca	Bloco digestor	No rótulo	Diferença (%)
H	216**	84,6**	+155%

* teor em mg/30g

** teor em mg/50g

O sinal (+) indica que o valor quantificado é maior que o indicado no rótulo, já o sinal (-) significa que é menor.

A Resolução RDC 360 (BRASIL, 2003b) permite uma variação de 20% da informação nutricional, porém até com essa margem, apenas um dos queijos analisados conseguiu restringir a diferença nessa faixa. A maioria das amostras analisadas apresentaram uma variabilidade superior na concentração de sódio, chegando a 171%. Apenas as amostras de coalho tiveram variações no teor de sódio na faixa permitida na legislação.

Infelizmente, estudos indicam que é comum os valores de concentração especificados nos rótulos não corresponderem aos reais. Rodrigues (2016) comparou a concentração de sódio quantificado em análise laboratorial de três marcas de queijo cheddar, minas frescal, mussarela, minas padrão e parmesão ralado e constatou que das 15 amostras analisadas, apenas 4 estavam de acordo com a legislação. A maior diferença encontrada pela autora foi em uma amostra de cheddar que a embalagem indicava uma concentração de 333,3 mg/100g e foi encontrado 1698,4 mg/100g. Outro trabalho foi a averiguação realizada em 3100 rótulos de alimentos no Rio de Janeiro pela Subsecretaria de Vigilância, Fiscalização Sanitária e Controle de Zoonoses (SUBVISA), no período de três anos, no qual 60% dos produtos foram classificados como inadequados por faltarem informações na embalagem ou os dados não corresponderem com a realidade, e em alguns casos, as duas situações ocorriam (CASEMIRO; LUQUES, 2018).

Também se avaliou a contribuição desses analitos para a ingestão diária recomendada (IDR). De acordo com a ANVISA, o IDR pode ser definido como a quantidade de proteínas, vitaminas e minerais que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas de uma população sadia (BRASIL, 2005).

Na Tabela 18, são apresentados os valores de IDR para Ca, Cr, Cu, P, Na, K, Mn e Zn e suas contribuições considerando um consumo regular de 30 gramas de queijo por dia por adulto.

Tabela 18 - Faixa de contribuição no IDR para os queijos analisados.

Elemento	IDR*	Contribuição (%) **				
		Mussarela de búfala	Minas frescal	Ricota	Coalho	Cottage
Ca (mg)	1000	24 – 26	26 – 32	6,7 – 26	12 – 31	9
Cu (µg)	900	7 – 14	11 – 12	12	11	10
P (mg)	700	23 – 26	20 – 27	6 – 14	10 – 23	6
Na (mg)	2000	6 – 12	5 – 9	1 – 4	6 – 9	6 – 7
K (mg)	3500	0,2 – 0,3	0,6 – 0,8	0,5 – 0,9	0,7 – 0,8	0,5
Zn (mg)	7	15 – 21	16 – 23	3 – 4	6 – 20	6 – 7

Fonte: Autoria própria *BRASIL, 2005 **Por porção – 30g

De modo geral, o elemento predominante, nas amostras de derivado lácteo analisadas, foi o Ca, sendo que já era esperado, devido à alta concentração em leite (SOUZA *et al.*, 2018; BILANDZIC *et al.*, 2015). Além disso, durante a fabricação do queijo, para acelerar a coagulação, CaCl_2 tem sido adicionado (FOX *et al.*, 2017).

Além de conferir elasticidade à massa (SILVA, 2005), a alta concentração de cálcio enquadra os queijos como fonte desse elemento, porque segundo a RDC Nº 54 de 2012 (BRASIL, 2012), determinado alimento é tido como fonte de uma vitamina ou elementos essenciais quando fornece ao menos 15% do IDR por porção e para ser considerado rico são no mínimo 30%. Portanto, dispondo de um IDR de 1000 mg/dia para adultos (BRASIL, 2005), o queijo mussarela de búfala e o coalho, segundo o IBGE (2011), e o minas frescal, segundo a TACO (2011), são considerados fontes de Ca por contribuírem com valores maiores que 150 mg/30 g e a mesma atribuição pode ser dada para as amostras queijos estudados, menos para o de cottage, a ricota da marca F e o coalho da marca G. Ademais, o coalho e o minas frescal, ambos da marca D, podem ser considerados ricos em Ca, pois fornecem mais de 30%.

Em seguida, o elemento essencial de maior concentração foi P, sendo que as mussarelas de búfala, minas frescal e coalho da marca D se enquadram como fonte de P. As mussarelas de búfala apresentaram maior concentração em relação as outras amostras, porque o leite de búfala tem sido rico nesse elemento essencial, em comparação com o de vaca e ovelha. Além disso, como a maior parte do fósforo

está como fosfato inorgânico coloidal em todos os tipos de leite, isso explica a ricota ter menor concentração, uma vez que a porcentagem de fósforo inorgânico solúvel é de 30% (AHMAD *et al.*, 2013; ARORA; KHETRA, 2017; DE LA FUENTE; JUÁREZ, 2015).

Dentre os queijos analisados, a mussarela de búfala apresentou menor concentração de K, explicado pela baixa concentração em leite de búfala em comparação com de vaca, ovelha e cabra (DE LA FUENTE; JUÁREZ, 2015). A maior ingestão de K atenua os efeitos adversos do Na sobre a pressão arterial, portanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda IDR de potássio de 3500 mg/dia (SANTOS *et al.*, 2018). Embora os leites sejam considerados fontes de potássio (BILANDZIC *et al.*, 2015; DE LA FUENTE; JUÁREZ, 2015), o mesmo não pode ser dito para os produtos lácteos analisados. Isto é causado pela adição de Na em alimentos processados, como queijo, o que pode provocar uma redução da concentração de K nestes produtos (YANG *et al.*, 2011).

O Ministério da Saúde (BRASIL, 1965) regulamenta o Limite Máximo de Tolerância (LMT), em $\mu\text{g g}^{-1}$, para contaminantes inorgânicos em alimentos e determina que para Zn é de 50,0. Comparando os valores apresentados na Tabela 14, todas as amostras de queijos estiveram com valores abaixo do LMT. Apresentando um IDR de 7 mg/dia, segundo a ANVISA (BRASIL, 2005), as amostras de minas frescal, mussarela de búfala e coalho da marca D enquadram-se como fonte de Zn. Observando a Tabela 14, percebe-se que a ricota obteve a menor concentração do analito. Isto pode ter ocorrido em virtude de 90 – 95% do Zn está na fase micelar e o restante solúvel, e como a ricota tem sido produzida com o soro remanescente da produção do queijo, a concentração é baixa, justificando tanto os valores pequenos no trabalho e os estipulados pelo IBGE (2011) em comparação com os outros derivados lácteos (DE LA FUENTE; JUÁREZ, 2015).

Em relação ao cobre, que foi o analito que apresentou menor teor nas amostras, uma parte da concentração dele é oriundo da contaminação durante a fabricação do derivado, contudo, pode ser advinda do leite utilizado (DAĞCILAR; GEZER, 2021).

A OMS recomenda que o máximo de ingestão diária de sal seja em torno de 5 g, o que equivale a 2 g por dia de sódio (WHO, 2021). Porém, pesquisas recentes relatam que o consumo pelos brasileiros chega a ser o dobro (NILSON *et al.*, 2017).

O alto conteúdo de sódio em alimentos, como derivados lácteos, é um problema mundial de saúde, afetando outros países, como Costa Rica (VEGA-SOLANO *et al.*, 2019), México (CAMPOS-NONATO *et al.*, 2022) e China (HAO *et al.*, 2022).

Alimentos com concentração de sódio acima de 80 mg/porção não podem serem considerados com baixo teor de sódio (BRASIL, 2012) e portando o consumo tem que ser reduzido. Das amostras analisadas, apenas a ricota da marca F apresentou concentração inferior. Alguns estudos estão sendo realizados como o objetivo de diminuir este teor, como o de Gomes *et al.* (2011), que investigaram o efeito da redução de sódio ao substituir parcial cloreto de sódio por cloreto de potássio em queijos de minas frescal. No entanto, o cloreto de sódio contribui para evitar a proliferação microbiana, dificultando a sobrevivência de patógenos, como salmonela, além de proporcionar mais sabor ao alimento (FOX *et al.*, 2017).

Analisando a Tabela 14, nota-se que os valores de concentração de sódio diferiram dependendo do tipo de amostra estudada. Isto é devido ao conteúdo de sal adicionado no alimento que muda a depender do queijo, ficando na faixa entre 0,5 – 8%, sendo o comum de 0,5 a 2,5% m m⁻¹ (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009). A ricota foi quem apresentou menor concentração em razão da adição situar na faixa de 0,14 – 1,27%, podendo as vezes não ser acrescentado (ESPER; BONETS; KUAYE, 2007).

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos dois procedimentos de preparo de amostras, em sistemas fechados com diferentes fontes de aquecimento, para decomposição de queijos brancos visando a determinação elementar por ICP OES. Um dos procedimentos propostos foi a decomposição utilizando bloco digestor e no outro foi empregando forno de radiação micro-ondas.

O uso da otimização multivariada, como o planejamento fatorial completo de dois níveis, foi uma ferramenta quimiométrica eficiente, pois, possibilitou a obtenção das condições adequadas para decomposição dos derivados lácteos analisados. O procedimento empregando o aquecimento condutivo teve como condições otimizadas: temperatura de 180 °C, tempo de 80 minutos e concentração de HNO₃ 2 mol L⁻¹. Para o procedimento de decomposição assistida por radiação micro-ondas foram estabelecidas as seguintes condições ótimas: temperatura máxima de decomposição de 140 °C, tempo total de radiação de 30 min (com rampa de 10 e patamar de 20 min) e concentração de HNO₃ de 2,0 mol L⁻¹. Nas duas estratégias analíticas foi utilizado peróxido de hidrogênio como agente oxidante auxiliar.

Sob as condições ótimas de trabalho, foi possível o emprego de ácido nítrico diluído em ambos os procedimentos, o que está de acordo com os princípios da Química Verde, sendo que ainda não há relato na literatura da utilização de ácido diluído na decomposição, em bloco digestor fechado, de amostras com alto índice proteico, como queijos. Além disso, no preparo de amostra empregando o forno micro-ondas, foi possível a digestão, em 30 minutos, de amostra com alto teor proteico em uma temperatura abaixo da reportada na literatura para a degradação de proteína (160 °C).

Ambos os procedimentos foram validados e apresentaram boa linearidade ($R^2 \geq 0,999$), faixa linear de trabalho adequada, precisão satisfatória ($RSD \leq 10 \%$), adequados limites de detecção e quantificação e a ausência de efeito matriz, assim permitindo a determinação de Ca, Na, K, P e Zn para amostras de queijos brancos. Ademais, tiveram boa exatidão com resultados de percentual de concordância dos teores determinados para os certificados no material de referência de leite em pó situados na faixa de 90 – 115%. Apenas na estratégia analítica empregando o bloco

digestor foi possível a determinação de Cu, sendo que para esse analito a exatidão foi validada por método de referência.

Comparando os dois procedimentos, apesar do maior tempo de decomposição, o emprego do aquecimento em bloco digestor fechado torna-se uma alternativa viável, visto que, apresenta um menor custo, é exigido um menor grau de treinamento e, por ser menor, é mais fácil acomodá-lo em um laboratório pequeno, em comparação com o forno de micro-ondas.

Adicionalmente, foi constatado que o tipo de queijo influenciou na variação dos teores de nutrientes. Ademais, para todos os tipos de queijos, observou-se uma discrepância ($p < 0,05$) entre as concentrações para pelo menos um analito ao analisar os valores para o mesmo tipo, constatando a falta de uniformidade na composição nutricional entre as diferentes marcas.

Como forma de complementação do trabalho, é importante à investigação da bioacessibilidade dos analitos, uma vez apenas uma fração dos nutrientes é de fato absorvido pelo organismo, e os presentes procedimentos permitem acessar informação apenas sobre os teores totais.

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. et al. Composition and physico-chemical characteristics of buffalo milk with particular emphasis on lipids, proteins, minerals, enzymes and vitamins. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 23, n. 1, p. 62-74, 2013.
- ARAÚJO, W. M. C. et al. Transformação dos alimentos: leite e laticínios. In: ARAÚJO, W. M. C. *et al.* **Alquimia dos Alimentos**. 2^o Edição, Brasília: Senac, 2008. Cap. 7, p. 291-321.
- ARORA, S.; KHETRA, Y. Buffalo Milk Cheese. In: McSweeney, P.L. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 4^o Edição, Boston: Springer, 2017, Cap. 42, p. 1093-1100.
- ANDRADE, B. D. et al. Chemometric classification of Brazilian artisanal cheeses from different regions according to major and trace elements by ICP-OES. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 109, p. 1-9, 2022.
- ÁVILA, D. V. L., *et al.* Analysis of children modelling clay (toy) using inductively coupled plasma-based methods. **Talanta**, v. 188, p. 273-281, 2018
- BARELA, P. S. et al. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS. **Fuel**, v. 204, p. 85 – 90, 2017.
- BARONE, G. et al. Traditional Italian cheeses: Trace element levels and estimation of dietary intake. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 205–211, 2018.
- BEZERRA, M. A. et al. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941 – 959, 2019.
- BILANDZIC, N. et al. Content of macro- and microelements and evaluation of the intake of different dairy products consumed in Croatia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 143 – 147, 2015.
- BIZZI, C. A.; NÓBREGA, J. A.; BARIN, J. S. Chapter 6 - Diluted Acids in Microwave-Assisted Wet Digestion. In: FLORES, E. M. de M. **Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis**. Amsterdã: Elsevier, 2014, p. 179 – 204.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N^o 166, de 24 de julho de 2017a. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 julho 2017.
- _____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N^o 269, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) para proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 setembro de 2005.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 359, de 23 de dezembro de 2003a. Dispõe sobre Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 dezembro 2003.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 360, de 23 de dezembro de 2003b. Dispõe sobre Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 dezembro 2003.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 54, de 12 de novembro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 novembro de 2012.

_____. Ministério da Saúde. Decreto Nº 55861, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 de abril de 1965.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**: promovendo a alimentação saudável. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. 210 p.

CAMPOS-NONATO, I et al. Reducing Sodium Consumption in Mexico: A Strategy to Decrease the Morbidity and Mortality of Cardiovascular Diseases. **Frontiers in public health**, v. 10, 2022.

CANOZER, C.; KÖSE, S. Comparison of some characteristic properties of Diyarbakir Orgu cheese produced by traditional and industrial method. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1 – 12, 2022.

CAPCAROVA, M. et al. Essential and xenobiotic elements in cottage cheese from the Slovak market with a consumer risk assessment. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 55, p. 1 – 11, 2020.

CARTER, J. A. et al. Identifying and assessing matrix effect severity in inductively coupled plasma optical emission spectrometry using non-analyte signals and unsupervised learning. **Analytica Chimica Acta**, v. 1062, p. 37-46, 2019.

CARTER, J. A. et al. Machine learning tools to estimate the severity of matrix effects and predict analyte recovery in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 223, 2021.

CARVALHO, L. de S. B. **Determinação da composição elementar em amostras de alimentos com alto teor salino por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado**. 2015. 89 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

CASEMIRO, L.; LUQUES, I. Mais de 60% dos rótulos de alimentos no Rio têm problemas de informação. **O Globo**, 2018. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/economia/defesa-do-consumidor/mais-de-60-dos-rotulos-de-alimentos-no-rio-tem-problemas-de-informacao-22568651>>. Acessado em: 12 de maio de 2019.

CASTRO-GONZÁLEZ, N. P. et al. Heavy metals in cow's milk and cheese produced in areas irrigated with waste water in Puebla, Mexico. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 11, n. 1, p. 33 - 36, 2017.

CHRISTOPHORIDIS, C. et al. Determination of heavy metals and health risk assessment of cheese products consumed in Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 82, p. 1 - 13, 2019.

CORMICK, G. BELIZÁN, J. M. Calcium Intake and Health. **Nutrients**, v. 11, p. 1 – 16, 2019

CORTES, R. Queijo Branco – Engorda? Benefícios, Malefícios e Tabela Nutricional. **Quero viver bem**, 2019. Disponível em: <<https://www.queroviverbem.com.br/queijobranco-beneficios-e-maleficios/>>. Acessado em: 22 de janeiro de 2022.

COSTA, Y. J. M. **Análise do comportamento mecânico de juntas soldadas de aço inoxidável AISI 304 aplicando a técnica de correlação digital de imagens**. 2018. 66 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

DAĞCILAR, K.; GEZER, C. Heavy metal residues in milk and dairy products produced in Northern Cyprus. **Progress in Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 1 – 10, 2021.

DE LA FUENTE, M. A.; JUARÉZ, M. Milk and dairy products. In: GUARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. **Handbook of Mineral Elements in Food**. 1º Edição, Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2015, Cap. 28, p. 646-668.

DERRINGER, G., SUICH, R. J. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DONATO, F. D. et al. Multi-Elemental Composition Data Handled by Chemometrics for the Discrimination of High-Value Italian Pecorino Cheeses. **Molecules**, v. 26, p.1-11, 2021

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Gado do Leite –Anuário leite 2021: Saúde única e total. **São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2021**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132875/anuario-leite-2021-saude-unica-e-total>> Acesso em: 21 janeiro de 2022.

EURÍDICE, M. S. et al. Mudanças alimentares na coorte NutriNet Brasil durante a pandemia de covid-19. **Revista de saúde pública**, v. 54, 2020.

FARIAS, F. Consumo de muçarela de búfala cresce cerca de 30% ao ano no país. **Canal Rural**, 2014. Disponível em: <<https://canalrural.uol.com.br/noticias/consumomucarela-bufala-cresce-cerca-ano-pais-8902/>>. Acessado em: 22 de janeiro de 2022.

FERREIRA, H. S et al. Characterisation of the mineral composition of tobacco products (cigar, shredded and rope). **Microchemical Journal**, v. 151, p. 1 - 7, 2019.

FERREIRA, S. L. C. et al. Multivariate optimization techniques in food analysis—A review. **Food Chemistry**, v. 273, p. 3-8, 2019a.

FERREIRA, S. L. C. F. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. 1^o Edição. Salvador: Vento Leste, 190 p., 2015.

FILHO OLIVEIRA, E. F. de. Concentrations of Essential Trace and Toxic Elements Associated with Production and Manufacturing Processes in Galician Cheese. **Molecules**, v. 27, p. 1 – 14, 2022.

FOX, P.F. *et al.* **Fundamentals of Cheese Science**. Boston: Springer, 2017, 803 p.

GIUDICE, G. H. Parâmetros de uma validação analítica: uma revisão bibliográfica. **Acta de Ciência e Saúde**, v. 1, n. 5, p. 130-134, 2016.

GOMES, A. P. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. **Journal of Dairy Science**, v. 94 , p. 2701–2706, 2011.

GONZÁLEZ-MARTÍN, I. et al. The mineral composition (Ca, P, Mg, K, Na) in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times using near infrared spectroscopy with a fibre-optic probe. **Food Chemistry**, v. 127, p. 147–152, 2011.

HAHN, C. L. et al. Determinação do cloreto de sódio em uma amostra de queijo de uma agroindústria de laticínios do município de Santo Ângelo. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25, 2016, Gramado. **Anais**, Porto Alegre: UFRGS, 2016.

HAO, Z. et al. Analysis of Sodium Content in 4082 Kinds of Commercial Foods in China. **Nutrientes**, v. 14, p. 1 – 13, 2022.

HERMAN-LARA, E. et al. Minerals multi-element analysis and its relationship with geographical origin of artisanal Mexican goat cheeses. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 1 – 9, 2019.

HOZ, A.; DÍAS-ORTIZ, A.; MORENO, A. Review on Non-Thermal Effects of Microwave Irradiation in Organic Synthesis. **Journal of Microwave Power & Electromagnetic Energy**, v. 41, n. 1, p. 44 – 64, 2007

HU, Y.; MA, D.; Ma, J. Microwave Hotspots: Thermal Nonequilibrium Dynamics from the Perspective of Quantum States. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 125, p. 2690 – 2696, 2021.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Normalização e qualidade industrial. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Revisão 7, DOQCGCRE-008, 28 p., 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos.** 1º Edição digital, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 742-744, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tabelas de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil.** Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2011.

KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 0, p. 1 – 22, 2019.

KHAJEH, M. et al. Multivariate Optimization of Microwave-Assisted Digestion of Copper and Zinc from Powder Milk. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 9, p. 1704 – 1710, 2012.

KHOUZAM, R. B.; POHL P.; LOBINSKI, R. Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. **Talanta**, v. 86, p. 425 – 428, 2011.

KIM, J.; ANAWATI, J.; AZIMI, G. Matrix complexity effect on platinum group metals analysis using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, p. 1310 – 1321, 2018.

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

KRUG, F. J., ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar.** 1º Edição. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 572 p., 2016.

LEANDRO, J. J. **Queijos: Do campo à mesa.** 1º Edição. São Paulo, SP: Melhoramento, 176 p., 2012.

LEVKOV, V. et al. The content of macro and trace elements in curd and traditional white brined cheese. **Veterinarija ir zootechnika**, v. 75, n.97, p. 36-42, 2017.

LEE, J. et al. Microwave-assisted digestion method using diluted nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of major and minor elements in milk samples by ICP-OES and ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 373, p. 1 – 9, 2022.

LIMA, A. A.; CARDOSO, A. J. V. S. Microbiological quality of Minas Frescal Cheese, handcrafted, marketed at free fairs of the Federal District. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 9, p. 13673 – 13688, 2019.

MANUELIAN, C. L. et al. Characterization of major and trace minerals, fatty acid composition, and cholesterol content of Protected Designation of Origin cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3384-3395, 2017.

MARTINI, M. et al. Nutritional composition of four commercial cheeses made with buffalo milk. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 55, n. 3, p. 256 – 262, 2016.

MATERA, J. et al. Brazilian cheeses: A survey covering physicochemical characteristics, mineral content, fatty acid profile and volatile compounds. **Food Research International**, v. 108, p. 18-26, 2018.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo minas padrão comercializada na cidade de São Luiz, MA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n.5, p. 547-551, 2009

MELO, J. C. et al. Sequential Determination of Cd, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, and Zn in Powdered Refreshments by FS-F AAS After a Simple Sample Treatment. **Food Analytical Methods**, v. 13, p.212 – 221, 2020.

MERIB, J.; NARDINI, G.; CARASEK, E. Use of Doehlert design in the optimization of extraction conditions in the determination of organochlorine pesticides in bovine milk samples by HS-SPME. **Analytical Methods**, v. 6, p. 3254 – 3260, 2014.

MESSIAS, T. B. O. N. et al. Typical Brazilian cheeses: safety, mineral content and adequacy to the nutritional labeling. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022.

MORENO-ROJAS, R. et. al Heavy metal levels in Spanish cheeses: influence of manufacturing conditions. **Food Additives and Contaminants: Part B**, v. 3, n. 2, p. 90 – 100, 2010.

MULLAPUDI, V. B. K. et al. Development of a simple and rapid microwave-assisted extraction method using very dilute solutions of perchloric acid and hydrogen peroxide for the multi-elemental analysis of food materials by ICP-OES: A green analytical method. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 807-817, 2019.

NASCIMENTO, T. G. V. **Aplicação da metodologia de Planejamento de Experimentos no tratamento de efluente de laticínios na reação do tipo-Fenton heterogênea**. 2017. 65 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São João del-Rei, Ouro Preto, 2017.

NILSON, E. A. F. Sodium Reduction in Processed Foods in Brazil: Analysis of Food Categories and Voluntary Targets from 2011 to 2017. **Nutrients**, v. 9, p 1 – 14, 2017.

OSORIS, M. T.; KOIDIS, A.; PAPADEMAS, P. Major and trace elements in milk and Halloumi cheese as markers for authentication of goat feeding regimes and geographical origin. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 4, p. 573 – 581, 2015.

OZBEK, N.; AKMAN, S. Microwave plasma atomic emission spectrometric determination of Ca, K and Mg in various cheese varieties. **Food Chemistry**, v. 196, p. 295-298, 2016.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M.M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367, p. 19-25, 2009.

PEIXOTO, R. R. A., *et al* Trace mineral composition of human breast milk from Brazilian mothers. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 199-205, 2019.

PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PIMENTEL, L. S. *et al*. Brazilian infant dairy foods: mineral content and daily intake contribution. **British Food Journal**, v. 120, n. 10, p. 2454-2465, 2018.

PINHEIRO, F. C. *et al*. Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 174, p. 471 – 478, 2019.

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, 2020.

REIS, C.; CURZI, R. Ricota, o queijo que não é queijo. **MilkPoint**, 2017. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/o-que-do-queijo/ricota-o-queijo-que-naoe-queijo-206289n.aspx>>. Acessado em 30 de janeiro de 2022.

RIZZOLI, R. Dairy products and bone health. **Aging Clinical and Experimental Research**. v. 34, p. 3 – 16, 2019.

RODRIGUES, L. S. C. **Análise de sódio e potássio em queijos comercializados em supermercados do distrito federal**. 2016. 33 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel de Nutrição) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

SANTANA, F. B. **Desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação do teor total de minerais em palmas forrageiras cruas e cozidas do estado da Bahia**. 2020. 99 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

SANTANA, F. B. *et al*. Evaluation of the Mineral Content in Forage Palm (*Opuntia ficus-indica* Mill and *Nopalea cochenillifera*) Using Chemometric Tools. **Biological Trace Element Research**, v. 199, p. 3939–3949, 2021.

SANTOS, A. *et al*. **A importância do potássio e da alimentação na regulação da pressão arterial**. Lisboa: Direcção-Geral da Saúde, 51 p., 2018. Disponível em: <

http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/activeapp/wp-content/files_mf/1525882103Aimporta%CC%82nciadopotassioedaalimentacaonaregulacaodapressaoarterial.pdf >. Acessado em: 07 de outubro de 2022.

SANTOS, D. C. M. B. et al. Determination of micronutrient minerals in coconut milk by ICP OES after ultrasound-assisted extraction procedure. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, p. 75 – 80, 2014.

SANTOS, H. M. et al. Microwave-assisted digestion using diluted HNO₃ and H₂O₂ for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES. **Food Chemistry**, v. 273, p. 159 – 165, 2019.

SANTOS, K. de A. **Proposta de um software para apoio ao aprendizado do planejamento de experimento**. 2017. 57 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2017.

SANTOS, L. G. et al. Validação de metodologia analítica para determinação de taninos pelo método de difusão radial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.4, p.881-885, 2014.

SANTOS, S. H. et al. Development of Analytical Method for Determination of Inorganic Constituents in Powder Refreshment Using Dilute Mineral Acids and Detection by ICP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 7, p. 1361 – 1372, 2021.

SIGRIST, M. et al. Total arsenic in selected food samples from Argentina: Estimation of their contribution to inorganic arsenic dietary intake. **Food Chemistry**, v. 210, p. 96 – 101, 2016.

SILVA, F. T. Queijo Mussarela.1^o edição, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 52 p., 2005. Coleção Agroindústria Familiar.

SILVA, L. K. R. et al. Discriminating Coalho cheese by origin through near and middle infrared spectroscopy and analytical measures. Discrimination of Coalho cheese origin. **International Journal of Dairy Technology**, v. 74, n. 2, p. 393 – 403, 2021.

SILVA, L. O. B. **Estratégias analíticas para determinação de cobre e cádmio em amostras ambientais empregando espectrometria de absorção atômica com geração de vapor químico**. 2014. 155 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

SOARES, L.; RODRIGUES, F. Com 25% da produção nacional, MG aposta no queijo como saída para crise e geração de renda. **G1 Globo**, 2019. Disponível em: <<https://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/minas-dos-queijos/noticia/2019/05/20/com-25percent-da-producao-nacional-mg-aposta-no-queijo-como-saida-para-crise-egeracao-de-renda.html>>. Acessado em: 21 de janeiro de 2022.

SOUZA, A. A. et al. A dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop and spectrophotometric determination of uranium in breast

milk after optimization using Box-Behnken design. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 327 -332, 2017.

SOUZA, L. A. **Determinação e avaliação da bioacessibilidade de minerais em amostras de linhaça e gergelim por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado**. 2015. 85 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M. Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: uma história de sucesso no Brasil. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 497 – 506, 2011.

SOUZA, S. O. et al. Evaluation of the mineral content in milk and yogurt types using chemometric tolos. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 1 – 8, 2018.

SUJKA, M. et al. Determination of the content of Pb, Cd, Cu, Zn in dairy products from various regions of Poland. **De Gruyter**. v. 17, n.1, p.694 – 702, 2019.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). **Food Research Center (FoRC)**. Versão 7.2. São Paulo, 2022. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tbca>>. Acessado em: 22 de dezembro de 2022.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ªedição revisada e ampliada. Campinas, SP: TACO, 2011.

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

VEGA-SOLANO, J. et al. An Evaluation of the Sodium Content and Compliance with the National Sodium Reduction Targets among Packaged Foods Sold in Costa Rica in 2015 and 2018. **Nutrients**, v. 11, p. 1 – 12, 2019.

VIDU, L. et al. The content of minerals and fatty acids in buffalo milk, depending on the rank of lactation. **Romanian Biotechnological Letters**, v.20, n.1, p.10076-10084, 2015.

VIEIRA, A. L. **Aperfeiçoamento e avaliação de um novo sistema de digestão assistida por aquecimento condutivo em frasco fechado para preparar amostras de carne “in natura” para análise elementar**. 2016. 81 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

WATHUDURA, P. D. et al. Microwave and open vessel digestion methods for biochar. **Chemosphere**, v. 239, p. 1 – 7, 2020.

WHO – World Health Organization. WHO global sodium benchmarks for different food categories. **WHO**, 2021. Disponível em: <

<https://www.who.int/publications/i/item/9789240025097>>. Acessado em: 21 de setembro de 2022.

YANG, Q. et al. Sodium and Potassium Intake and Mortality Among US Adults. **American Medical Association**, v. 171, n. 13, p. 1183-1191, 2011.

YASAR, D.; KOSE, Y. E.; KOSE, S. Kinetic modeling of macroelement concentration of Malatya cheese produced by traditional method. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, p. 1-7, 2021.