



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC

CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE - CEO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DO LEITE PRODUZIDO NA
REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA EM
DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO**

DENIZE RODRIGUES

PINHALZINHO, 2019

DENIZE RODRIGUES

CARACTERIZAÇÃO DO LEITE PRODUZIDO NA REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Alexandre Tadeu Paulino
Coorientadora: Dra. Stefany Grutzmann Arcari

**PINHALZINHO, SC
2019**

DENIZE RODRIGUES

CARACTERIZAÇÃO DO LEITE PRODUZIDO NA REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

Banca examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Tadeu Paulino
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Coorientadora:

Dra. Stefany Grutzmann Arcari
Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC)

Membros:

Prof. Dr. Weber da Silva Robazza
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Dra. Patrícia Fernanda Schons
Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC)

Agosto, 2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Rodrigues, Denize

Caracterização do leite produzido na região oeste de Santa Catarina em diferentes estações do ano. / Denize Rodrigues. -- 2019. 76 p.

Orientador: Alexandre Tadeu Paulino

Coorientador: Stefany Grutzmann Arcari

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação, Chapecó, 2019.

1. leite. 2. vitamina D. 3. minerais. 4. planejamento fatorial. 5. tratamento térmico. I. Paulino, Alexandre Tadeu. II. Arcari, Stefany Grutzmann. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação. IV. Título.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, por me conceder toda a luz e força durante todo o tempo e nunca me deixar desistir, por ser minha base e minha proteção.

A toda a minha família, especialmente aos meus pais Augusto Rodrigues e Neusa Braghini Rodrigues por terem me apoiado em todas as fases da vida, por ser meu exemplo e por toda a confiança e amor depositados a mim.

A minha irmã Deise Rodrigues, por todos os conselhos e por sempre ter acreditado em mim e ao meu irmão Silvano Rodrigues por ter me ensinado a levar a vida com mais leveza.

Ao meu noivo Nestor Mahle, pela paciência, compreensão, incentivo e amor.

Ao professor Dr. Gilmar de Almeida Gomes (*in memoriam*) por ter sido meu primeiro orientador, por todos os conselhos, ensinamentos e incentivo. Por ter abraçado esse projeto comigo.

Ao meu professor orientador Dr. Alexandre Tadeu Paulino por ter me acolhido e me ajudado na finalização deste projeto e pela confiança depositada em mim.

A minha coorientadora Stefany Grutzmann Arcari, pela amizade, dedicação, disponibilidade e por nunca ter medido esforços para me auxiliar. Seu apoio em todas as etapas deste trabalho foi fundamental, agradeço por todo conhecimento transmitido, paciência, sugestões e orientações. Sem você nada disso teria sido possível.

Ao professor Rafael Burin, pela ajuda com o equipamento de absorção atômica e ao professor Tiago Fávero por toda ajuda, dicas e conselhos.

A minha amiga Vanessa Daiane Heinzen por toda ajuda e amizade. Pelo companheirismo desde a pós-graduação, as viagens, os ensaios até a finalização dos artigos.

A minha amiga e colega Vanessa Stein, pelas inúmeras conversas e apoio mútuo ao longo desta jornada. A Luniele, Vanessa, Danielle, Angélica e todos os demais colegas do mestrado pela troca de conhecimentos e por todos os momentos agradáveis vividos.

Ao Rafael, Jeferson, Natália, Vanucci, Paulo e Guilherme pelas longas horas de laboratório, por toda ajuda nos ensaios e pela dedicação de vocês.

A Universidade do Estado de Santa Catarina e todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, campus São Miguel do Oeste.

Enfim, a todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

A todos, novamente, meus sinceros agradecimentos e gratidão.

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, sendo que a Região Sul é a maior produtora no cenário nacional. O estado de Santa Catarina é o quinto maior produtor de leite do Brasil, e o oeste deste estado está entre as maiores regiões produtoras no país. Assim, o objetivo desta dissertação foi caracterizar o leite bovino produzido na região Oeste do estado de Santa Catarina em diferentes estações do ano, e verificar a influência dos processamentos térmicos nas concentrações de vitamina D e minerais. Inicialmente, foi otimizada e validada uma metodologia para a determinação de ergocalciferol (vitamina D₂) e colecalciferol (vitamina D₃) utilizando técnicas de precipitação de proteínas e extração líquido-líquido (ELL), seguida de separação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A otimização dos experimentos foi realizada utilizando um delineamento central de composto rotacional (DCCR) 2³, com o volume de amostra, tempo de agitação e tempo de irradiação de ultrassom como variáveis independentes. O método foi validado determinando a seletividade, a linearidade, o limite de detecção, o limite de quantificação, a precisão e a exatidão. Para a caracterização físico-química das amostras de leite foram realizadas as determinações de sólidos totais, sólidos não gordurosos, resíduo mineral fixo (cinzas), lipídeos e proteínas. O mineral cálcio, sódio, potássio e magnésio foram determinados utilizando espectrometria de absorção atômica. Pela metodologia de superfície de resposta verificou-se que as melhores condições para a extração de vitaminas D₂ e D₃ a partir de amostras de leite são com volume de amostra de 4,0 mL, tempo de agitação de 2 min e tempo de irradiação de ultrassom de 15 min. O método otimizado e validado foi sensível, preciso, exato, linear na faixa de trabalho estudada, e possuiu baixo limite de detecção. Menores quantidades de vitamina D₂ e D₃ foram encontradas no leite obtido em meses mais quentes. A concentração de vitamina D₂ diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre o leite produzido no mês de novembro e os leites produzidos nos meses de maio e julho. Uma diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada nas concentrações de vitamina D₃ entre os meses de novembro, julho e setembro. As concentrações de vitamina D₂ e D₃ foram também significativamente diferentes ($p < 0,05$) comparando o leite cru (sem tratamento térmico) e os leites pasteurizado e UHT (leites após tratamento térmico). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os leites pasteurizado e UHT. No entanto, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação as diferentes estações do ano considerando os teores de sólidos totais, sólidos não gordurosos, resíduo mineral fixo, lipídeos e proteínas. Não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) para as concentrações de potássio e magnésio nas diferentes estações do ano. Porém, a concentração de sódio foi menor no outono, enquanto que a de cálcio foi menor no verão. Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações dos minerais em diferentes estações do ano comparando o leite cru e pasteurizado. Pelos resultados desse estudo conclui-se que as estações do ano têm influência significativa sobre a composição do leite, especialmente quanto ao teor de vitamina D, sódio, cálcio, sólidos totais, resíduo mineral fixo, lipídeos e proteínas.

Palavras-chave: leite bovino, vitamina D, minerais, planejamento fatorial, tratamento térmico.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest milk producers of the world, and the southern region is the largest producer in the Brazilian scenario. The state of Santa Catarina is the fifth largest producer of milk in Brazil, being the west region one of the largest producers this product in the country. Thus, the objective of this dissertation was to characterize bovine milk samples produced in the west region of the state of Santa Catarina at different seasons of the year, verifying the influence of the thermal processing on the vitamin-D and mineral concentrations. Firstly, the quantitative determination of ergocalciferol (vitamin-D₂) and cholecalciferol (vitamin-D₃) was optimized and validated using protein precipitation techniques and liquid-liquid extraction (LLE), followed by separation and determination by high performance liquid chromatography coupled to diode array detector (HPLC-DAD). The experimental optimization was performed using rotational central composite design (RCCD) 2³, with the sample volume, agitation time and ultrasound irradiation time as independent variables. The experimental methodology was validated by determining selectivity, linearity, detection limit, quantification limit, precision and accuracy. The physicochemical characterization of the milk samples was performed by determining the total solid, non-fat solid, fixed mineral residue (ash), lipid and protein contents. The calcium, sodium, potassium and magnesium concentrations were determined by atomic absorption spectrometry. From the results of the response surface methodology were observed that the best conditions for the extraction of vitamin-D₂ and -D₃ from milk samples include sample volume of 4.0 mL, stirring time of 2.0 min, and ultrasound irradiation time of 15 min. The optimized and validated methodology was sensitive, precise, accurate, and linear in the study range. In addition, it was found low detection limit. Lower amounts of vitamin-D₂ and -D₃ were found in milk samples collected in the warmer seasons. The vitamin-D₂ concentrations were significantly different ($p < 0.05$) in the milk samples produced in November, May and July. Significant statistically differences ($p < 0.05$) were also observed in the vitamin-D₃ concentrations in November, July and September. The Vitamin-D₂ and -D₃ concentrations were also significantly different ($p < 0.05$) comparing raw (without thermal treatment), pasteurized and UHT milk (milk after thermal treatment) samples. However, no significant difference ($p < 0.05$) was found between pasteurized and UHT milks. The total solid, non-fatty solid, fixed mineral residue (ash), lipid and protein contents were statistically different ($p < 0, 05$) among the seasons of the year. No significant statistical difference ($p < 0.05$) was found for the potassium and magnesium concentrations in the different seasons of the year. However, the sodium concentration was lower in the autumn, whereas calcium concentration was lower in the summer. There were significant differences ($p < 0.05$) in the mineral concentrations in the different seasons of the year comparing raw and pasteurized milks. The results of this study indicate that the seasons of the year alter the milk compositions, mainly the vitamin-D, sodium, calcium, total solid, fixed mineral residue (ash), lipid and protein contents.

Key words: Bovine milk, vitamin D, minerals, factorial design, thermal treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagramas de Pareto com os termos significativos para as áreas dos picos cromatográficos da vitamina D ₂ (a) e D ₃ (b).	34
Figura 2 - Superfície resposta (a) e curva de contorno (b) relacionando a área do pico cromatográfico para vitamina D ₂ extraída de leite fluido em função do volume de amostra e tempo de irradiação de ultrassom.....	36
Figura 3 - Superfície resposta (a) e curva de contorno (b) relacionando a área do pico cromatográfico para vitamina D ₃ extraída de leite fluido em função do volume de amostra e tempo de extração (agitação).	37
Figura 4 - Perfil dos valores preditos e desejabilidade considerando o volume de amostra (X ₁), tempo de agitação (X ₂) e tempo de irradiação de ultrassom (X ₃) durante a extração de vitaminas D ₂ (Y ₁) e D ₃ (Y ₂) a partir de leite fluido....	38
Figura 5 - Cromatograma com os tempos de retenção experimental para cada vitamina	39
Figura 6 - Ergocalciferol ou vitamina D ₂	54
Figura 7 - Colecalciferol ou vitamina D ₃	54
Figura 8 - Teores médios de vitamina D ₂ em função do teor de gordura, tratamentos térmicos e meses de produção.	62
Figura 9 - Teores médios de vitamina D ₃ em função do teor de gordura, tratamentos térmicos e meses de produção.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis dos fatores e domínio experimental do DCCR aplicado à otimização das condições experimentais de ELL de vitaminas D ₂ e D ₃	30
Tabela 2 - Níveis investigados no DCCR e respostas obtidas.....	33
Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para os modelos matemáticos propostos aplicando a metodologia de superfície de resposta aos dados experimentais.	34
Tabela 4 - Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para os modelos de regressão utilizados para explicar a extração de vitaminas D ₂ e D ₃ a partir de leites fluidizados.....	35
Tabela 5 - Faixa linear, coeficiente de determinação (R ²), limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD) de vitaminas D ₂ e D ₃ em leite fluido.....	40
Tabela 6 - Resultados de precisão e exatidão para o método proposto.	41
Tabela 7 - Aplicação do método proposto para determinação de vitaminas D ₂ e D ₃ em amostras reais de leite fluido.	41
Tabela 8 - Caracterizações físico-químicas das amostras de leite cru coletadas em diferentes estações do ano.	47
Tabela 9 - Comparação dos teores de minerais em diferentes amostras de leite bovino.	49
Tabela 10 - Efeitos do tratamento térmico e estação do ano nos teores de minerais em leite.	50
Tabela 11 - Quantidade de vitamina D ₂ e D ₃ nos leites integral, semidesnatado e desnatado coletado nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2019.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG - ácidos Graxos

AGS – Ácidos Graxos Saturados

PUFAS – Ácidos Graxos Poli-Insaturados Essenciais

MUFAS - Ácidos Graxos Monoinsaturados

CLA - Ácido Linoleico Conjugado

UHT – *Ultra High Temperature*

UAT - Ultra Alta Temperatura

ELL – Extração Líquido-Líquido

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

VITAMINA (D₂) - Ergocalciferol

VITAMINA (D₃) – Colecalciferol

UVB – Radiação Ultravioleta

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

X₁ – Volume de Amostra

X₂ - Tempo de Agitação

X₃ - Tempo de Irradiação de Ultrassom

Y₁ - Área do pico cromatográfico da vitamina D₂

Y₂ - Área do pico cromatográfico da vitamina D₃

RPM – Rotações por Minuto

KHz - Quilohertz

PTFE – Politetrafluoretileno

R² - Coeficiente de determinação

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

DPR – Desvio Padrão Relativo

UV-Vis – Ultravioleta Visível

ANOVA - Análise de variância

F – Teste de Fischer

SQ – Soma dos quadrados

GL – Graus de liberdade

QM - Quociente entre os quadrados médios

Tr – Tempo de retenção

AOAC - Official Methods of Analysis – (Métodos Oficiais de Análises)

n.q – Não quantificado

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com fornos de chama

GFAAS – Espectrometria de absorção atômica com fornos de grafite

HR-CS-AAS - alta resolução fonte contínua de espectrometria de absorção atômica

ICP-OES e ICP-MS - emissão de plasma indutivamente acoplado e espectrometria de massa

Na – Sódio

K – Potássio

Mg – Magnésio

Ca – Cálcio

FDN – Fibra em detergente neutro

ng – nanograma

SUMÁRIO

1.	Capítulo 1	15
1.1.	CONTEXTUALIZAÇÃO	15
1.2.	OBJETIVOS	16
1.2.1.	Objetivo geral	16
1.2.2.	Objetivos específicos	16
1.3.	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.3.1.	Leite	16
1.3.2.	Composição do leite	17
1.3.2.1.	<i>Água</i>	17
1.3.2.2.	<i>Lipídeos</i>	18
1.3.2.3.	<i>Carboidratos</i>	18
1.3.2.4.	<i>Proteínas</i>	19
1.3.2.5.	<i>Minerais</i>	19
1.3.2.6.	<i>Vitaminas</i>	21
1.3.3.	Leite de consumo	22
1.3.4.	Otimização de métodos analíticos	23
2.	Capítulo 2	26
2.1.	INTRODUÇÃO	26
2.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.2.1.	Amostras	28
2.2.2.	Reagentes	29
2.2.3.	Preparo das amostras	29
2.2.4.	Identificação e quantificação de vitamina D₂ e D₃ por CLAE-DAD ..	30
2.2.5.	Figuras de mérito para o método cromatográfico	31
2.2.6.	Determinação de vitamina D₂ e D₃ em amostras reais	32
2.2.7.	Análises estatísticas	32
2.3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
2.3.1.	Validação do método	38
2.3.2.	Aplicação do método proposto em amostras reais	41
2.4.	CONCLUSÃO	43
3.	Capítulo 3	44
3.1	INTRODUÇÃO	44

3.2	MATERIAIS E METODOS	45
3.2.1	Amostras.....	45
3.2.2	Caracterização físico-química	46
3.2.3	Determinação de minerais	46
3.3	RESULTADOS E DISCUSSOES	47
3.3.1	Caracterização físico-química	47
3.3.2	Ensaio de minerais	49
3.3.3	Efeitos do tratamento térmico e estação do ano nos teores de minerais no leite.....	49
3.4	CONCLUSÃO	52
4	Capítulo 4.....	54
4.1	INTRODUÇÃO	54
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.2.1	Amostras.....	56
4.2.2	Reagentes.....	57
4.2.3	Preparo de amostras.....	57
4.2.4	Identificação e quantificação de vitamina D2 e D3 por CLAE-DAD	58
4.2.5	Análises estatística	58
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.4	CONCLUSÃO	63
5	Considerações finais	64
	REFERÊNCIAS	66

1. Capítulo 1

1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Milhões de pessoas consomem leites e produtos lácteos todos os dias no mundo. Esses produtos são fontes de nutrientes para as pessoas e meios de subsistência para agricultores, processadores, comerciantes e outros segmentos da cadeia láctea (FAO, 2014).

O Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo e a produção anual em 2017 foi de 33,5 bilhões de litros, 0,5% menos do que em 2016. A região Sul do Brasil é a maior produtora de leite no país com um percentual de 35,7%. A segunda maior região produtora é o Sudeste com 34,2%. As outras regiões produtoras do país são o Centro-Oeste com 11,9%, Nordeste com 11,6% e Norte com 6,5% (IBGE, 2018). Diante disso, destaca-se a importância da produção leiteira no desenvolvimento social e econômico de diversas regiões brasileiras. Santa Catarina é o quinto maior produtor de leite dentre os estados brasileiros, com uma produção de aproximadamente 2.980 milhões de litros de leite/ano (IBGE, 2018). O Oeste do estado de Santa Catarina é considerado uma bacia leiteira porque tem uma grande quantidade de produtores. Essa região está entre as maiores produtoras de leite entre os estados brasileiros. Conforme a síntese anual da agricultura de Santa Catarina (EPAGRI/CEPA, 2017), a região Oeste produziu 75,1% de todo o leite do estado em 2015, sendo que somente a microrregião de São Miguel do Oeste (Extremo Oeste) produziu 21,7% da produção total do estado. Em termos de volume recebido pelas indústrias inspecionadas no estado entre 2015 e 2016, Santa Catarina cresceu 3,8%. Isso é um resultado inverso ao que ocorreu na maioria dos outros estados brasileiros. Assim, o estado de Santa Catarina atingiu a marca de 10,5% na participação da oferta de leite às indústrias brasileiras, superando pela primeira vez o estado de Goiás.

Atualmente, a produção leiteira é uma das principais atividades socioeconômicas do meio rural no Oeste Catarinense, sendo considerado um dos pilares da agricultura familiar na região. A bovinocultura leiteira é uma opção econômica para a maioria dos agricultores dessa região que possui aproximadamente 51.614 estabelecimentos produtores de leites. Das 82.143 propriedades rurais no Oeste Catarinense, aproximadamente 3/4 produzem todo o leite do estado (JOCHIMS; DORIGON; PORTES, 2016).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Caracterizar os leites bovinos produzidos na região Oeste do estado de Santa Catarina em diferentes estações do ano e verificar a influência do processamento térmico nas concentrações de vitaminas D₂ e D₃, e minerais.

1.2.2. Objetivos específicos

- a. Otimizar e validar uma metodologia cromatográfica para a determinação de vitamina D₂ e D₃ em leites produzidos na região Oeste do estado de Santa Catarina.
- b. Efetuar caracterização físico-química do leite cru, pasteurizado, UHT integral, UHT desnatado e UHT semidesnatado.
- c. Quantificar cálcio, magnésio, potássio e sódio nas amostras de leite.
- d. Estudar a influência das estações do ano e dos tratamentos térmicos nas concentrações de minerais, vitamina D₂ e vitamina D₃ nas amostras de leite.

1.3. SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.3.1. Leite

O leite é um produto líquido, branco, opaco, viscoso, açucarado e praticamente sem odor (VEISSEYRE, 1988). Esse produto é formado por uma mistura de diversos compostos sólidos dissolvidos em água (BRITO *et al.*, 2007). Do ponto de vista físico-químico, o leite consiste em uma emulsão de glóbulos de gordura e em uma suspensão micelar composta de caseína (caseína, cálcio e fósforo) em fase aquosa. No leite são encontradas moléculas de lactose, proteínas do soro do leite, vitaminas hidrossolúveis e alguns minerais solubilizados. A parte suspensa desse tipo de amostra é composta por leucócitos (GONZÁLEZ, 2001).

1.3.2. Composição do leite

O leite e seus derivados lácteos constituem-se em um grupo de alimentos com alto valor nutricional uma vez que são fontes de proteínas, vitaminas e minerais (BRASIL, 2006). Esses produtos contêm também nutrientes de alto valor biológico e são muito importante para o desenvolvimento e crescimento de mamíferos (TRONCO, 2010). O leite de vaca é um dos produtos mais consumidos e processados do mundo, tendo composição altamente variável. A composição química, bioquímica e biológica de uma amostra de leite de vaca é influenciada por vários fatores, incluindo a raça do animal, o estágio de lactação, a ordem de parição, o manejo, a nutrição, o estado de saúde, a variação durante a ordenha, dentre muitos outros (ABREU, 2005).

A composição geral das amostras de leite contém entre 12 a 13% de compostos sólidos dissolvidos e 87% de água. Os principais sólidos dissolvidos no leite são lipídios (gordura), carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. A distribuição e interação desses constituintes nas amostras de leite é crucial para a determinação das propriedades funcionais e viabilidade do leite para processamento industrial. As micelas de caseína e os glóbulos de gordura contidos em amostras de leite são responsáveis pelas suas características físicas como estrutura e cor, as quais são facilmente encontradas em produtos de origem láctea (BRITO *et al.*, 2007).

1.3.2.1. Água

Água é o componente em maior quantidade em termos da composição total do leite. Nesse meio, encontram-se também sólidos dissolvidos, suspensos ou emulsionados. A quantidade de água em amostras de leite influencia significativamente a sua densidade. A água presente no leite é a mesma que é utilizada pura para o consumo humano e animal. A estrutura de uma amostra de leite contendo água pode ser simulada quando é dissolvido leite em pó em água da torneira, com formação de um líquido branco contendo pequenas quantidades de sólidos dissolvidos. A variação da percentagem de água na composição de um determinado tipo de leite pode ocorrer devido à raça do rebanho e o tempo de lactação (BEHMER, 1984; MESQUITA *et al.*, 2006).

1.3.2.2. Lipídeos

A gordura do leite é formada por pequenos glóbulos suspensos na fase aquosa, os quais são envolvidos por camadas de fosfolipídios. Essas camadas formam membranas na parte exterior dos glóbulos, impedindo as suas uniões. Desse modo, a gordura do leite é mantida na forma de emulsão. A maior parte da gordura do leite é constituída por triglicerídeos que são formados por ácidos graxos ligados ao glicerol. A fração de gordura no leite é um veículo para vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), colesterol e carotenoides (provitamina A). Esses últimos são responsáveis pela cor amarelo-creme do leite. A concentração de gordura no leite cru oriundo de vacas varia geralmente entre 3,5 e 5,3% dependendo da raça, estágio de lactação e alimentação do animal (GRIINARI *et al.*, 2004).

O leite de vaca tem altas concentrações de lipídeos os quais são compostos por 400 tipos diferentes de ácidos graxos (AG). Podem existir AG de cadeia curta derivados do metabolismo dos ruminantes, AG de cadeia longa derivados da dieta do animal e AG de cadeia média (C₁₆) provenientes tanto do metabolismo dos ruminantes quanto da dieta do animal (JENSEN, 2002). A gordura do leite contém também ácidos graxos saturados (AGS) e ácidos graxos insaturados (AGI). Devido à relação entre AGS e doenças cardiovasculares, a gordura do leite é considerada um fator de risco para a saúde humana. Por outro lado, o leite pode ser uma fonte de alimentação humana importante devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados essenciais (PUFA), ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e ácido linoleico conjugado (CLA) (JENKINS *et al.*, 2008).

1.3.2.3. Carboidratos

O principal carboidrato presente no leite é a lactose. A sua concentração pode variar entre 4,6 a 4,9 %. Sua estrutura é constituída por unidades de 4-0-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranosose (HURLEY, 1999 a). A concentração de lactose em leite depende do teor de sais minerais os quais mantém a pressão osmótica da solução igual àquela encontrada no sangue (PINHEIRO; MOSQUIM., 1991). Além da lactose, podem ser encontradas em pequenas quantidades no leite a glicose e a galactose. A glicose encontrada no leite é oriunda da hidrólise de lactose no fígado devido à neoglicogênese. Essa síntese é baseada no metabolismo do ácido propiônico e de alguns

aminoácidos. Quando a glicose entra nas células secretoras do animal ocorrem i) a síntese de lactose, ii) a estimulação da síntese de proteínas, iii) a síntese de glicerol na formação da gordura do leite e iv) a síntese de gordura (CASSOLI *et al.*, 2010).

1.3.2.4. Proteínas

As proteínas representam entre 3 a 4% dos sólidos solúveis encontrados em amostras de leite. A porcentagem de proteína varia com a raça do animal, sendo proporcional à quantidade de gordura presente no leite. Isso significa que quanto maior a porcentagem de gordura no leite, maior será a concentração de proteína (RIBEIRO NETO *et al.*, 2010). As proteínas do leite podem ser separadas em dois grandes grupos: i) as caseínas e ii) as proteínas do soro.

As caseínas sofrem precipitação em pH 4,6 e as proteínas do soro do leite não precipitam (MEPHAN *et al.*, 1992). A caseína é uma fosfoproteína relativamente hidrofóbica, a qual é encontrada na forma de micelas. Ela pode ser sintetizada a partir de células epiteliais presentes nas glândulas mamárias (DEPETERS; CANT, 1992). As micelas de caseína e os glóbulos de gordura são responsáveis pela consistência e cor dos produtos lácteos (RIBEIRO NETO *et al.*, 2010).

Dentre as principais proteínas do soro de leite as mais importantes são sintetizadas na glândula mamária (β -lactoglobulina e a α -lactalbumina). Outras que têm certa relevância estão presentes no sangue (albumina sérica e imunoglobulinas). Além dessas proteínas, podem ser encontradas algumas como a lactoferrina, transferrina e enzimas (plasmina, lipase lipoproteica e fosfatase alcalina). Em condições normais, a proteína comumente encontrada em soro do leite é a β -lactoglobulina, a segunda de maior incidência é a α -lactalbumina, e em menores quantidades a albumina sérica e as imunoglobulinas (MEPHAN *et al.*, 1992).

1.3.2.5. Minerais

Minerais e oligoelementos estão presentes no corpo humano em várias formas químicas. Dentre essas formas se incluem os sais inorgânicos, proteínas, gorduras, carboidratos e ácidos nucleicos. Esses compostos têm funções fisiológicas e biológicas importantes para a subsistência da vida (FLYNN, 1992). Os 20 minerais considerados essenciais na dieta humana são o sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio, fósforo, ferro,

cobre, zinco, manganês, selênio, iodo, cromo, cobalto, molibdênio, flúor, arsênio, níquel, silício e boro. Todos esses minerais estão presentes no leite em diferentes concentrações e formas químicas (CASHMAN, 2006).

Muitos minerais presentes no leite são derivados de sais como o fosfato de cálcio. Aproximadamente 67% do cálcio, 35% do magnésio e 44% do fosfato estão na forma de sais ligados dentro das micelas de caseína, sendo que o restante está solúvel na fase do soro de leite (FOX; MCSWEENEY, 1998). A concentração de minerais no leite na forma de sais varia entre 0,8 a 0,9 %. Os principais cátions encontrados no leite são cálcio, magnésio, sódio e potássio. Entre os principais ânions estão fosfato, citrato e cloreto. A maior parte dos íons presentes nas amostras de leite está associada às proteínas. Dependendo do tipo, o mineral pode estar difuso (sódio, potássio e cloro) ou parcialmente associado às micelas de caseína (cálcio, magnésio e fósforo) (GAUCHERON, 2004). Os minerais e elementos traços presentes no leite são importantes para o bom funcionamento do organismo (FLYNN, 1992). Assim, um breve resumo obtido de uma revisão bibliográfica realizada por Flynn (1992), das propriedades e funcionalidades de algumas espécies está descrito em seguida:

- O **sódio** é o principal cátion do fluido extracelular, sendo o principal regulador de volume nesse fluido. É importante na regulação da osmolaridade, do equilíbrio ácido-base e do potencial de membrana das células. Esse cátion é também importante no transporte de fluidos através das membranas celulares.
- O **potássio** é o principal cátion intracelular encontrado na célula, contendo uma concentração 30 vezes maior no fluido intracelular do que no fluido extracelular. O potássio extracelular é importante para a transmissão de impulsos nervosos, para o controle da contração do músculo esquelético e para a manutenção da pressão arterial.
- O **cálcio** encontrado em fluidos extracelulares, estruturas intracelulares e membranas celulares são úteis para controlar os batimentos cardíacos, a coagulação sanguínea, a secreção de hormônios, a integridade de substâncias e nas membranas intracelulares, a condução nervosa, a contração e a ativação de enzimas.
- O **magnésio** tem uma função essencial nos processos fisiológicos, incluindo o metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, transmissão neuromuscular e contração muscular. Além disso, o magnésio atua como cofator de muitas

enzimas.

As concentrações de minerais e oligoelementos em leite de vaca cru variam com a secreção da glândula mamária, o estado de lactação, a espécie animal, o estado de saúde, fatores extrínsecos, a estação do ano, o tipo de ração do gado leiteiro (estado nutricional da vaca) e meio ambiente (natureza do solo e localidade da fazenda) (SOLALARRAÑAGA; NAVARRO-BLASCO, 2009).

1.3.2.6. Vitaminas

As vitaminas são compostos indispensáveis para o desenvolvimento e crescimento dos seres vivos. Sua ausência pode causar sérios problemas fisiológicos. As vitaminas têm diferenças em composição química, fisiológica, atividade e importância nutricional. Em estudos na área de tecnologia alimentar, a análise de vitaminas é muito importante para a avaliação de vários distúrbios bioquímicos e nutricionais em um indivíduo (BLANCO; FERNÁNDEZ; GUTIÉRREZ, 2000).

Treze vitaminas são encontradas em leite bovino, incluindo as vitamina A, D, B₂, B₅ e B₁₂. O consumo diário dessas vitaminas em quantidades adequadas é importante para o bom funcionamento do corpo humano. De acordo com dados da USDA, em pesquisa realizada em 2009, o consumo recomendado de vitamina A é entre 11 a 16%, vitamina D entre 17 a 50%, vitamina B₂ entre 32 a 46%, vitamina B₅ entre 17 a 21% e vitamina B₁₂ entre 42 a 56% (SOUZA, 2015). Segundo Hurley (1999 b), o teor de vitamina presente no leite é totalmente dependente do aporte sanguíneo, pois a glândula mamária não sintetiza esse tipo de composto. Em geral, o aumento dos teores de vitaminas no leite bovino pode ser devido a alterações na composição da dieta do animal. Diferenças nas concentrações de retinol, β -caroteno e α -tocoferol no leite são principalmente explicados pela ingestão de alimentos diferentes e pelo teor de gordura do leite. Esses compostos podem ser precursores na produção de vitaminas.

As principais vitaminas no leite são classificadas como hidrossolúveis e lipossolúveis. A concentração das vitaminas hidrossolúveis do complexo B em leite varia devido à dieta do animal, enquanto que a concentração de vitamina C é pouco afetada (HURLEY, 1999 b). A vitamina lipossolúvel D é encontrada como vitaminas D₂ e D₃. A vitamina D₂ é formada pela irradiação do ergosterol. A vitamina D₃ é produzida no corpo do animal devido a sua exposição direta aos raios ultravioletas solares. O teor de vitamina D₃ depende também da quantidade de gordura fornecida na dieta animal

(HURLEY, 1999 b). A vitamina lipossolúvel E pode ser produzida devido ao consumo de α -tocoferol durante a dieta alimentar (LARSON, 1985). A concentração da vitamina lipossolúvel K é baixa em leites (HURLEY, 1999 b).

1.3.3. Leite de consumo

Os leites destinados ao consumo humano podem ser classificados em leite cru ou tratado termicamente. Pela Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018 é definido que o leite cru refrigerado é um produto produzido em propriedades rurais, refrigerado e destinado aos estabelecimentos de leite e derivados após inspeção oficial. Além disso, o leite pasteurizado é um produto fluido que foi submetido a processos de pasteurização e envase automático em circuito fechado para destinação ao consumo humano direto (BRASIL, 2018).

O objetivo do tratamento térmico de leite cru é a eliminação de microrganismos indesejáveis e sua melhor conservação. Os processos de conservação por calor dependem da temperatura, do tempo, das características dos produtos a serem tratados e da resistência térmica dos microrganismos a serem destruídos (SILVA, 2000). Os tratamentos térmicos mais utilizados em leite são a pasteurização e a esterilização. A eficácia e os efeitos desses tratamentos estão relacionados às combinações temperatura-tempo, método de aquecimento utilizado e condições de pré-tratamento (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A pasteurização é um tratamento térmico relativamente brando, em que as temperaturas utilizadas são menores que 100 °C. Esse processo é comumente realizado para prolongar a vida útil do leite e de seus derivados lácteos (SILVA, 2000). Este método, que conserva os alimentos devido à inativação das enzimas e destruição dos microrganismos termossensíveis (por exemplo: bactérias não esporuladas, leveduras e fungos), provoca mudanças mínimas no valor nutritivo e nas características sensoriais do alimento em questão (SILVA, 2000). Por outro lado, o processo de esterilização mais utilizado para o tratamento térmico de leite é o UHT. Nesse processo, as bactérias esporuladas são eliminadas. Uma esterilização completa é difícil de conseguir já que alguns esporos termo resistentes podem permanecer no produto (VEISSEYRE, 1988).

Pela portaria Nº 370 de 04 de setembro de 1997 (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal), o leite UAT (Ultra Alta Temperatura) ou UHT (do inglês – *Ultra High Temperature*) é um produto

homogeneizado que foi tratado em fluxo contínuo a 130 °C entre 2 a 4 segundos, resfriado para temperatura inferior a 32 °C e envasado em condições assépticas utilizando embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. A esterilização de alimentos envasados dessa maneira modifica tanto o seu valor nutritivo como as suas características sensoriais. Os melhores processos de preparo de produtos assim são aqueles que eliminam a ação de microrganismos patogênicos, deterioradores e inativadores de enzimas. Contudo, eles não devem provocar modificações indesejáveis nas características gerais das matérias-primas. O termo “*esterilização comercial*” é utilizado para definir um alimento que é microbiologicamente estável, visto que os microrganismos que sobreviveram à esterilização são espécies termófilas. Esses tipos de microrganismos só conseguem se desenvolver em temperaturas superiores a 45 °C. Assim, eles não são capazes de se desenvolver em condições normais de armazenamento do leite (SILVA, 2000).

O leite UAT (UHT) pode ser classificado de acordo com o conteúdo da matéria gorda presente na amostra. Assim, o leite UAT (UHT) integral possui teor de gordura mínimo de 3,0%, o leite UAT (UHT) semidesnatado ou parcialmente desnatado possui teor de gordura variando entre 0,6 a 2,9% e o leite UAT (UHT) desnatado possui teor de gordura com valor máximo de 0,5%. Esses leites são comercialmente conhecidos como leite UAT (UHT) integral, leite UAT (UHT) semidesnatado e leite UAT (UHT) desnatado (BRASIL, 1997). Os teores de matéria gorda em cada tipo de leite são definidos por um processo padronizado na indústria durante o processamento. Normalmente, a padronização é realizada centrifugando o leite cru e retirando o creme. Posteriormente, o teor de gordura é ajustado pela adição de creme nas proporções estabelecidas para cada tipo de leite. O tratamento térmico do leite é um processo industrial que precisa ser avaliado antes da aplicação para não alterar a qualidade do alimento processado (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

1.3.4. Otimização de métodos analíticos

Otimização refere-se a melhorar o desempenho de um sistema, processo, ou um produto, a fim de obter o máximo benefício. O termo otimização tem sido comumente utilizado em análises químicas como um meio de descobrir as condições em que aplicar um procedimento que produz a melhor resposta possível (ARAÚJO; BRERETON, 1996). Para o processo de otimização de extração de vitaminas é necessário investigar

os fatores que influenciam a quantidade de vitamina extraída, bem como, a interação entre esses fatores. Assim, um planejamento fatorial composto central rotacional (DCCR) torna-se importante para prever esses efeitos.

A metodologia do planejamento composto central rotacional (DCCR) consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos, que podem ser usados no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) com inúmeros fatores (variáveis independentes). É uma técnica estatística baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida na década de 50, que, desde então, tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS NETO *et al.*, 1995). A fim de compreender as aplicações do DCCR na otimização de métodos analíticos, BEZERRA (2008) definiu alguns termos-chave:

- **Domínio experimental** é o campo experimental que deve ser investigado. É definido pelos limites mínimo e máximo das variáveis experimentais estudadas.
- **Design experimental** é um conjunto específico de experimentos definidos por uma matriz composta pelas diferentes combinações dos níveis de variáveis estudadas.
- **Fatores ou variáveis independentes** são variáveis experimentais que podem ser mudadas independentemente uma da outra. Exemplos: pH, temperatura, concentração de reagentes, tempo de irradiação, vazão, entre outros.
- **Respostas ou variáveis dependentes** são os valores obtidos dos resultados dos experimentos. Exemplos: recuperação de um analito, resolução entre picos cromatográficos, porcentagem de carbono residual e acidez final, entre outros.
- **Residual** é a diferença entre o resultado calculado e o resultado obtido experimentalmente para um determinado conjunto de condições.

A metodologia de superfície de resposta (RSM) originou-se a partir da perspectiva gráfica gerada após adequação do modelo matemático e seu uso tem sido amplamente adotado em textos sobre quimiometria. A metodologia de superfície de resposta é uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial de dados experimentais, que devem descrever o comportamento de um conjunto de dados com o objetivo de fazer previsões estatísticas (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Pode ser bem aplicado quando uma resposta ou um conjunto de respostas de interesse são influenciados por diversas variáveis. O objetivo é otimizar simultaneamente os níveis dessas variáveis para obter o melhor sistema desempenho (BEZERRA, 2008).

Alguns estágios na aplicação do RSM como uma técnica de otimização são os seguintes: (1) a seleção de variáveis independentes através de estudos de rastreio e delimitação da região experimental, de acordo com o objetivo do estudo e a experiência do pesquisador; (2) a escolha do delineamento experimental e realização dos experimentos de acordo com a matriz experimental selecionada; (3) o tratamento matemático-estatístico do estudo experimental dado através do ajuste de uma função polinomial; (4) a avaliação da adequação do modelo; (5) a verificação da necessidade e possibilidade de realizar um deslocamento em direção à região ótima; e (6) obter os valores ótimos para cada estudo variável (BEZERRA, 2008).

2. Capítulo 2

VITAMINA D₂ E D₃ EM LEITE FLUIDO: OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR ELL-CLAE-DAD

2.1. INTRODUÇÃO

As vitaminas são espécies orgânicas que não são comumente sintetizadas em quantidades suficientes pelos organismos humanos ou animais. Portanto, elas devem estar presentes na dieta alimentar diária (NESTOLA; THELLMANN, 2015). A vitamina D faz parte de um grupo de compostos chamados secosteroides (semelhantes a esteroides, porém com anel aromático aberto) de ocorrência natural que são lipossolúveis (NORMAN, 2008). Essa vitamina existe como ergocalciferol (D₂) ou colecalciferol (D₃). O ergocalciferol é convertido em ergosterol por fungos ou leveduras expostos à luz UVB. Similarmente, o colecalciferol é convertido em 7-desidrocolesterol (encontrado na pele humana) também por exposição à luz UVB (TANGPRICHA, 2012). A vitamina D é essencial para absorção de cálcio em organismos humanos e animais, além de ser importante na mineralização envolvida no crescimento ósseo. A forma biologicamente ativa da vitamina D após a ingestão é obtida pela hidroxilação no fígado (calcidiol) e nos rins (calcitriol) (NESTOLA; THELLMANN, 2015).

Em algumas pesquisas realizadas na última década têm sido sugerido que a vitamina D é importante para o combate de muitas doenças. Assim, sua deficiência no organismo pode aumentar o risco de osteoporose, doenças cardíacas, alguns tipos de câncer, esclerose múltipla e doenças infecciosas. Uma vez que poucos produtos alimentícios possuem vitamina D de forma natural, o enriquecimento de alimentos com este nutriente, principalmente com vitamina D₃, é de suma importância (ALLEN *et al.*, 2006). Pequenas quantidades de vitamina D₃ podem ser encontradas em partes comestíveis de peixes com elevada quantidade de gordura, fígado de mamíferos, ovos e produtos lácteos. A concentração de vitamina D₃ no leite varia com a estação do ano devido à quantidade de luz solar disponível para a conversão do 7-desidrocolesterol da pele do animal em colecalciferol (PROGRESS; HOLICK, 2008).

Vitaminas são instáveis na presença de luz, calor e produtos químicos, embora em alguns casos a vitamina D é relativamente estável durante o processamento e armazenamento de alimentos (HANSON; METZGER, 2010) (KASMI; VIETH;

ROUSSEAU, 2007). Alguns exemplos incluem a resistência dessa vitamina no processo de defumação do peixe, na pasteurização e esterilização do leite, e na secagem de ovos por pulverização. No enriquecimento de leites é comum ocorrer decomposição de 25 a 35 % da vitamina D durante o processamento (BENDER, 1979).

A determinação de vitamina D em fluídos biológicos pode ser realizada por diferentes métodos. No entanto, poucos foram desenvolvidos para a determinação em amostras de leite *in natura* e/ou não enriquecidos (KASALOVÁ *et al.*, 2015). A vitamina D em fluidos biológicos ou alimentos é encontrada ligada a proteínas e lipídios. Assim, é importante a aplicação de um método apropriado para a preparação da amostra antes da análise (PERALES *et al.*, 2005). A preparação de uma amostra de leite para a determinação de vitamina D pode ser realizada utilizando um processo de precipitação de proteínas e/ou saponificação. Tradicionalmente, a saponificação é utilizada para a preparação de amostras de alimentos lácteos, enquanto que a técnica de precipitação é utilizada para a preparação de amostras derivadas de plasma ou soro biológico. A técnica de precipitação é baseada na utilização de solventes aquosos ou orgânicos, os quais são utilizados para precipitar as proteínas por desnaturação. Subsequentemente, as proteínas precipitadas são removidas por centrifugação e o sobrenadante evaporado. O resíduo final é reconstituído em um solvente adequado e utilizado para análise (GOMES *et al.*, 2013). O preparo de amostras utilizando extração líquido-líquido é uma alternativa à precipitação e/ou saponificação (LUQUE DE CASTRO *et al.*, 1999). Na extração líquido-líquido as etapas simples ou múltiplas de extração são realizadas utilizando solventes com diferentes propriedades físico-químicas. Nesse caso, a transferência de massa entre duas fases imiscíveis levam a separação dos analitos na fase orgânica. Após isso, o solvente é evaporado e o extrato concentrado é redissolvido em solvente apropriado antes da análise. Uma das técnicas mais utilizadas para o preparo de amostras e a determinação de vitamina D e seus metabólitos é o imunoensaio. No entanto, a cromatografia é ainda uma das técnicas mais importantes para a determinação de vitamina D devido a sua exatidão e precisão (JIAO *et al.*, 2017).

Embora inúmeros trabalhos têm sido publicados sobre métodos para a determinação de vitamina D (GILL; ZHU; INDYK, 2016) (GOMES *et al.*, 2015) (PERALES *et al.*, 2005 b), poucos são focados na otimização dos parâmetros de preparo da amostra. Assim, o estudo das condições de precipitação e/ou extração líquido-líquido para reduzir o tempo de preparo da amostra, além da recuperação

máxima das vitaminas em matrizes alimentícias, é importante. Os métodos analíticos geralmente precisam ser validados antes da utilização na determinação de um analito em amostras reais. Para o processo de otimização de extração das vitaminas D₂ e D₃ é necessário investigar os fatores que influenciam a quantidade de vitamina extraída, bem como, a interação entre esses fatores. Assim, um planejamento fatorial de composto central rotacional (DCCR) é importante para prever esses efeitos. A metodologia de superfície de resposta é outra técnica estatística para o desenvolvimento e otimização de processos, nos quais a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis. Nessa metodologia são definidas as variáveis independentes e as variáveis dependentes para um determinado processo. Além disso, o uso desta metodologia possibilita a geração de modelos matemáticos fundamentais para a explicação dos dados experimentais (BAS; BOYACI, 2007) (BEZERRA *et al.*, 2008).

A técnica de DCCR é comumente utilizada para análise e modelagem matemática de processos. O número de testes necessários para aplicação de DCCR inclui o padrão fatorial 2^k com sua origem no centro. Os pontos 2k axiais são fixados a uma distância chamada α a partir do centro, em que k é o número de variáveis. Os pontos axiais são escolhidos com o objetivo de permitir a rotacionalidade e garantir a variância constante da previsão do modelo em todos os pontos equidistantes do centro. Repetições do teste no centro são importantes para fornecer uma estimativa independente do erro experimental (ASLAN, 2008) (BOX; HUNTER, 1957).

Em geral, o objetivo nesse capítulo foi otimizar e validar uma metodologia para determinar vitaminas D₂ e D₃ em leite fluido bovino e ovino. Para a preparação das amostras foi utilizada a técnica de precipitação de proteínas combinada à extração líquido-líquido. Para a determinação das baixas concentrações de vitaminas D₂ e D₃ nas amostras de leite previamente preparadas foi utilizado cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Amostras

As amostras de leite bovino e ovino cru foram obtidas em duas propriedades rurais da região Oeste do Estado de Santa Catarina, sendo congeladas a - 20 °C até serem utilizadas para análise. Amostras de leite UHT, de quatro marcas diferentes foram

compradas em supermercados da região Oeste do Estado de Santa Catarina, sendo mantidas sob refrigeração ($4,0 \pm 1,0$ °C) após abertas.

2.2.2. Reagentes

Foram utilizados como reagentes acetonitrila (J. T. BAKER), hexano (Synth), diclorometano (Synth) e metanol (J. T. Baker), todos de grau cromatográfico. A água utilizada foi purificada em um purificador de água Gehaka modelo Master All (São Paulo, SP, Brasil). Ergocalciferol (número CAS 50-14-6) e colecalciferol (número CAS 67-97-0) foram comprados na Sigma-Aldrich. As análises de colecalciferol e ergocalciferol foram realizadas utilizando solução estoque previamente preparada pela dissolução de 100 mg de padrão do analito em 100 mL de metanol. A concentração final da solução estoque foi de $1,0 \text{ g L}^{-1}$. A partir da solução estoque, preparou-se soluções para análise com concentrações de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ utilizando metanol como solvente. As soluções foram preparadas e armazenadas em frascos âmbar, e mantidas em temperatura de $4,0 \pm 1,0$ °C.

2.2.3. Preparo das amostras

As amostras de leite cru foram descongeladas em banho-maria a $35,0 \pm 1,0$ °C e homogeneizadas por aproximadamente 30 min utilizando agitação mecânica (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil). As amostras de leite UHT foram abertas no momento da realização das análises e posteriormente armazenadas em temperaturas de $4,0 \pm 1,0$ °C. A precipitação das proteínas para análise cromatográfica foi realizada adicionando 8,0 mL de acetonitrila às amostras de leite (variável independente X_1), misturando em agitador vortex (Ika, Staufen, Alemanha) a 2500 rpm (pelos tempos estudados na variável independente X_2). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho de ultrassom (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) a 25 °C em uma frequência de 40 KHz (pelos tempos estudados na variável independente X_3), sendo posteriormente centrifugadas durante 10 min a 4400 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de centrifugação e adicionados 12,0 mL de uma solução de hexano/diclorometano (4:1 v/v). A proteína específica foi extraída com agitação de 2500 rpm utilizando um agitador vortex. A camada orgânica superior remanescente foi transferida para outro tubo de centrifugação e o processo foi repetido pela segunda vez. Os dois lotes de

sobrenadantes foram misturados e o solvente removido por evaporação em rotaevaporador (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) a 55 °C sob vácuo. O balão com o resíduo da evaporação foi lavado com 2,0 mL de metanol e filtrado utilizando filtro PTFE 0,22 µm (Hexis, Jundiaí, São Paulo, Brasil). Finalmente, o filtrado foi injetado no cromatógrafo.

As melhores condições experimentais para a extração líquido-líquido (ELL) de ergocalciferol e colecalciferol foram otimizadas utilizando delineamento central composto rotacional (DCCR). Nesse procedimento foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 contendo seis pontos axiais e três repetições do ponto central. As variáveis independentes utilizadas para otimização da ELL foram volume de amostra (mL) (X_1), tempo de agitação (min) (X_2) e tempo de irradiação de ultrassom (min) (X_3). Os fatores e níveis estudados são apresentados na Tabela 1. Dezesete experimentos foram gerados e executados em ordem aleatória. Como variáveis de resposta considerou-se a área do pico cromatográfico da vitamina D₂ (Y_1) e área do pico cromatográfico da vitamina D₃ (Y_2).

Tabela 1 – Níveis dos fatores e domínio experimental do DCCR aplicado à otimização das condições experimentais de ELL de vitaminas D₂ e D₃.

Fatores	Domínio Experimental				
	$-\alpha^a$	-1	0	+1	$+\alpha^a$
Volume de amostra (mL)	0,6	2	4	6	7,4
Tempo de agitação (min)	0,4	1	2	3	3,6
Tempo de irradiação de ultrassom (min)	7	10	15	20	23

^a $\alpha = 1,68$

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

2.2.4. Identificação e quantificação de vitamina D₂ e D₃ por CLAE-DAD

A identificação e quantificação de vitamina D₂ e D₃ em leite fluido foram realizadas utilizando a metodologia proposta por PERALES *et al.* (2005), com algumas modificações. O sistema cromatográfico foi um equipamento da marca Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, Califórnia, EUA) com sistema quaternário de bombas, injetor automático 1290, detector de arranjo de diodos (DAD) e software Lab Advisor. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de guarda (4,6 mm x 12,5

mm, 5 μm ; Zorbax ODS 4-Pack, da Agilent) e uma coluna analítica (4,6 mm x 250 mm, 5 μm ; Zorbax ODS 4-Pack, da Agilent) operando em temperatura de 37 °C. O eluente foi uma solução metanol/água (95:5 v/v) em vazão 0,8 mL min⁻¹ e eluição isocrática. O tempo total foi de 50 min e o volume de injeção de 20 μL . As áreas dos picos cromatográficos para as vitaminas D₂ e D₃ foram calculadas após observar o sinal analito do detector em 261 e 265 nm, respectivamente.

2.2.5. Figuras de mérito para o método cromatográfico

O método cromatográfico para a determinação das concentrações de vitaminas D₂ e D₃ foi validado considerando o Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (UNION *et al.*, 2002).

A seletividade do método foi assegurada por comparação entre os cromatogramas da amostra de leite integral bovino puro e leite integral bovino após adição de vitaminas D₂ e D₃ padrão em concentração de 22,5 ng 100 mL⁻¹. A partir desses cromatogramas, calculou-se o fator de separação pela divisão do tempo de retenção da vitamina D₃ pelo tempo de retenção da vitamina D₂.

A linearidade do método foi avaliada pela construção de duas curvas analíticas utilizando sete padrões de vitaminas D₂ e D₃ em cada curva e concentrações crescentes dos padrões. Todas as medidas experimentais das respostas analíticas no cromatógrafo foram realizadas em triplicata. A faixa de trabalho linear foi determinada pela plotagem da área dos picos cromatográficos dos padrões em função da concentração. Para cada curva foi determinado o coeficiente de determinação (R²).

O limite de detecção (LOD) foi o sinal analítico determinado no pico cromatográfico com valor três vezes maior do que o ruído da linha de base. O limite de quantificação (LOQ) foi a menor concentração determinada pela curva de calibração em que a relação sinal/ruído é no mínimo 10.

A precisão intra-corrída foi determinada a partir de seis injeções sucessivas (n = 06) de amostras de leite UHT integral contendo padrão das vitaminas D₂ e D₃ em três diferentes níveis de concentração. A precisão intermediária foi determinada em dois dias diferentes, injetando seis amostras de leite UHT integral (n = 6) contendo três diferentes níveis de concentração de vitamina D₂ e D₃. A precisão foi avaliada por meio do desvio padrão relativo, para cada nível de concentração estudado (DPR, %).

A exatidão foi determinada utilizando o método de recuperação. Nisso, foram adicionadas soluções padrão de vitaminas D₂ e D₃ em três concentrações diferentes na matriz da amostra de leite UHT integral. A recuperação foi expressa como a porcentagem do desvio padrão entre o valor calculado e o valor nominal.

2.2.6. Determinação de vitamina D₂ e D₃ em amostras reais

Vitaminas D₂ e D₃ foram identificadas nas amostras reais de leite por meio da comparação dos tempos de retenção na coluna cromatográfica. Para isso, foram medidos espectros de UV-Vis dos leites *in natura* e dos leites contendo padrões das vitaminas. Esses espectros foram comparados e os picos das vitaminas identificados. As áreas dos picos foram utilizadas para a quantificação das vitaminas empregando curva de calibração analítica. As concentrações das vitaminas D₂ e D₃ foram analisadas em triplicata e os valores foram reportados em ng 100 mL⁻¹.

2.2.7. Análises estatísticas

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados experimentais, considerando significativos os resultados associados a valores de $p < 0,05$. As diferenças significativas entre as amostras foram determinadas utilizando o Teste *t*-student. Foi utilizado para as análises estatísticas o software *Statistica* versão 10 (STATSOFT Inc., Tulsa, OK, EUA). As respostas analisadas pelos experimentos realizados com DCCR foram às áreas dos picos cromatográficas para as vitaminas D₂ e D₃. Os modelos matemáticos do planejamento fatorial foram avaliados utilizando ANOVA com 95 % de confiança, e a melhor condição de extração foi otimizada utilizando a função desejabilidade.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As condições experimentais codificadas para o DCCR, bem como as variáveis de resposta estão apresentadas na Tabela 2. As variáveis de resposta para o DCCR foram às áreas dos picos cromatográficos para as vitaminas D₂ e D₃. O erro experimental foi calculado utilizando os valores das replicatas do ponto central, com desvios padrão relativos de 0,39 e 0,89 % para as vitaminas D₂ e D₃, respectivamente.

Tabela 2 - Níveis investigados no DCCR e respostas obtidas.

Volume de amostra (X_1)	Tempo de agitação (X_2)	Tempo de irradiação de ultrassom (X_3)	Vitamina D_2 (área)	Vitamina D_3 (área)
-1	-1	-1	7523	6400
1	-1	-1	7491	3829
-1	1	-1	9171	8392
1	1	-1	4253	5966
-1	-1	1	3857	3998
1	-1	1	4253	5966
-1	1	1	5108	3715
1	1	1	8731	8183
-1,68	0	0	3857	3715
1,68	0	0	4253	5967
0	-1,68	0	3767	3369
0	1,68	0	9166	4022
0	0	-1,68	5108	3998
0	0	1,68	9354	8808
0	0	0	8880	8555
0	0	0	8800	8471
0	0	0	8820	8657

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Pelos resultados da análise de regressão e variância (ANOVA) observou-se que o efeito quadrático (X_1^2) foi significativo para a variável de resposta “vitamina D_2 ”, enquanto os efeitos quadráticos, X_1^2 e X_2^2 , foram significantes para a variável de resposta “vitamina D_3 ”. Esses resultados estão apresentados na Tabela 3. Não foram observadas significâncias para o efeito quadrático (X_3^2) nas duas variáveis de resposta. Não foi também observada falta de ajuste nos dois modelos matemáticos propostos, indicando que esses modelos podem ser utilizados para explicar a variância dos dados.

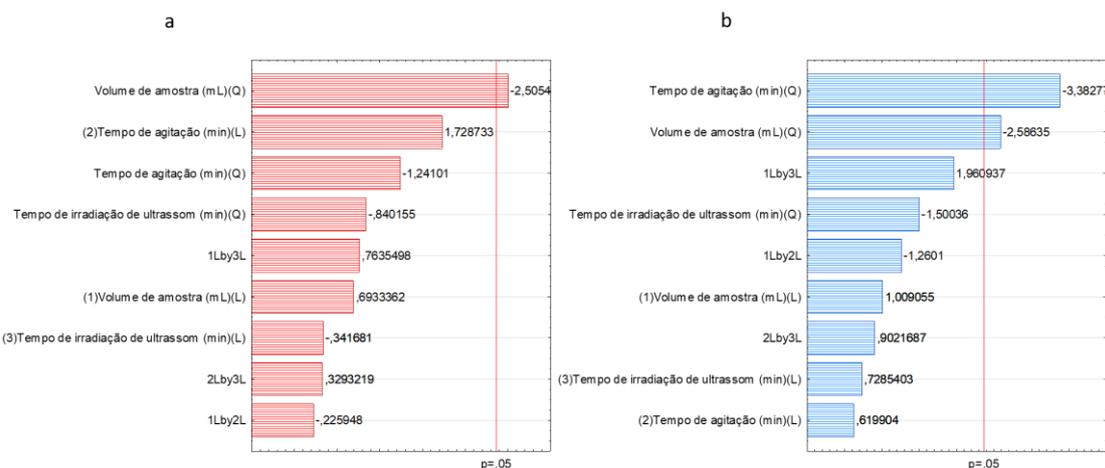
Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para os modelos matemáticos propostos aplicando a metodologia de superfície de resposta aos dados experimentais.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Vitamina D ₂		Vitamina D ₃	
		Soma dos quadrados	F	Soma dos quadrados	F
X ₁	1	5175	0,0013	1998787	0,8497
X ₁ ²	1	27608495	7,0020*	13195420	5,6094*
X ₂	1	12787739	3,2432	3757195	1,5972
X ₂ ²	1	5709976	1,4481	24933900	10,5995*
X ₃	1	30422	0,0077	2102236	0,8937
X ₃ ²	1	2194374	0,5565	3157442	1,3422
X ₁ .X ₂	1	344035	0,0872	874503	0,3717
X ₁ .X ₃	1	10055370	2,5502	16339186	6,9458*
X ₂ .X ₃	1	6695970	0,2337	602253	0,2560
Erro	7	27600459		16466580	
Total	16	85981858		72235270	

X₁ = volume de amostra (mL); X₂ = tempo de agitação (min); X₃ = tempo de irradiação de ultrassom (min); * Significativo ao nível $p \leq 0,05$.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Figura 1 - Diagramas de Pareto com os termos significativos para as áreas dos picos cromatográficos da vitamina D₂ (a) e D₃ (b).



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

A relevância de cada termo estudado pelo planejamento fatorial é apresentada por diagramas de Pareto nas Figuras 1a e 1b. As barras que ultrapassaram a linha

vertical indicam significâncias em um nível de 95 % de confiança. Em geral, observa-se que o volume de amostra ($-X_1$) utilizado na extração líquido-líquido influenciou negativamente o processo de extração de vitamina D₂, enquanto que o tempo de extração ($-X_2$) e o volume de amostra ($-X_1$) influenciaram negativamente o processo de extração de vitamina D₃. O modelo matemático para determinar a área do pico cromatográfico da vitamina D₂ o qual relaciona as variáveis independentes e variável de resposta é apresentado na Equação 1:

$$\text{Área do pico da vitamina D}_2 = 7658,37 - 2609,09 X_1^2 \quad (1)$$

Considerando como variável de resposta à área do pico cromatográfico da vitamina D₃, pode-se aplicar o modelo matemático apresentado na Equação 2 para relacionar as variáveis independentes e a variável de resposta:

$$\text{Área do pico da vitamina D}_3 = 7802 - 1811,28 X_1^2 - 2905,01 X_2^2 \quad (2)$$

A validação dos modelos foi realizada pela análise do teste de Fischer (Teste F), considerando o quociente entre os quadrados médios (QM) da regressão e dos resíduos. Para que o modelo seja aceito, o valor de F calculado deve ser maior do que o valor de F tabelado, ou seja, $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ (BARROS NETO *et al.*, 2003). Essa validação é realizada considerando os devidos graus de liberdade em nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para os modelos de regressão utilizados para explicar a extração de vitaminas D₂ e D₃ a partir de leites fluidizados.

Vitamina	Fonte	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{calculado}	F _{tabelado}
D ₂	Regressão	1,34 x 10 ⁹	9	149461760	34,34	3,68
	Resíduos	30553884	7	4364841		
	Total	1,38 x 10 ⁹	16	85981858		
D ₃	Regressão	1,14 x 10 ⁹	9	126487414	50,95	3,68
	Resíduos	17377591	7	2482513		
	Total	1,15 x 10 ⁹	16	72235270		

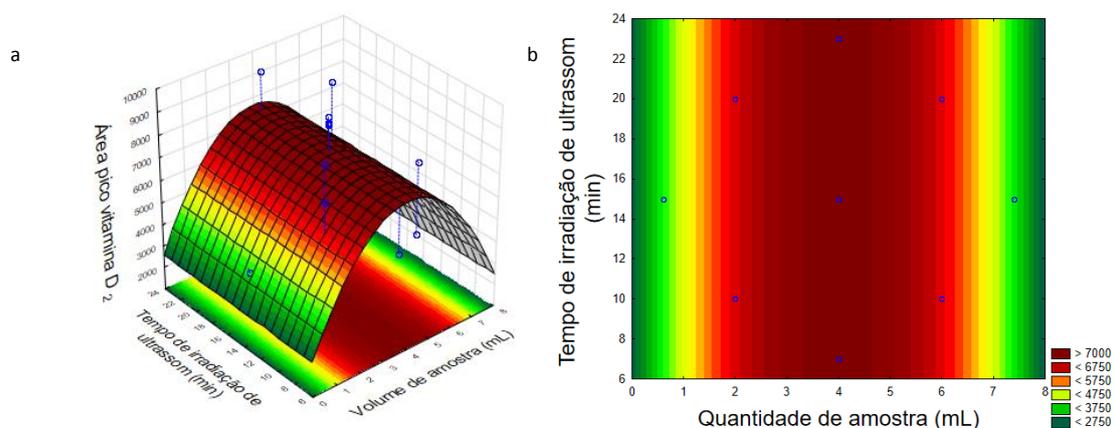
^a = Soma dos quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Para que o modelo seja não apenas significativo estatisticamente, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão entre o valor de F obtido da regressão e o valor de F tabelado deve ser no mínimo maior que quatro (BARROS NETO *et al.*, 2003). Observando os resultados da Tabela 4, verificou-se que os modelos podem ser utilizados para explicar as condições favoráveis para o preparo de amostras de leite, resultando em maior extração de vitaminas D₂ e D₃. Ainda, pode-se dizer que as regressões foram altamente significativas uma vez que foram encontradas razões $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ iguais a 9,33 e 13,84 para vitaminas D₂ e D₃, respectivamente.

Após a validação dos modelos foram geradas superfícies de resposta e curvas de contorno para exemplificar os resultados das extrações de vitaminas D₂ e D₃ a partir de leite fluido. A extração de vitamina D₂ foi mais efetiva quando utilizado entre 3,5 a 4,5 mL de amostra de leite, conforme mostrado na Figura 2. Segundo Moldoveanu e David (2002), uma razão maior de solvente orgânico em relação à fase aquosa promove uma partição mais eficiente durante a extração. Assim, a quantidade de amostra deve conter quantidades adequadas de analito com o objetivo de melhorar a sensibilidade analítica do método. Pelos volumes de amostras evidenciados nos resultados foi possível realizar a extração de vitamina D₂ na ordem de ng. 100 mL⁻¹, além de uma relação de solvente orgânico duas vezes superior à fase aquosa.

Figura 2 - Superfície resposta (a) e curva de contorno (b) relacionando a área do pico cromatográfico para vitamina D₂ extraída de leite fluido em função do volume de amostra e tempo de irradiação de ultrassom.

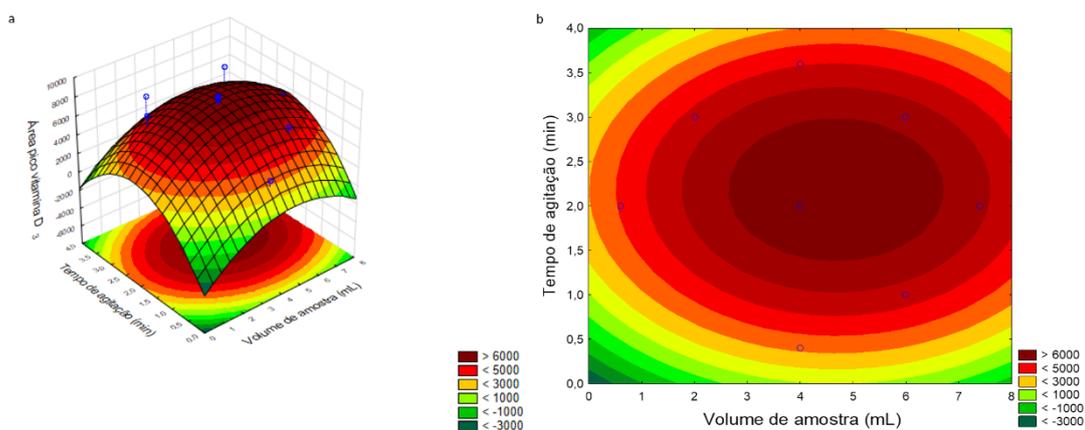


Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

A superfície de resposta e curva de contorno relacionadas com a extração de vitamina D₃ a partir de leite fluido estão representadas na Figura 3. Observa-se melhor

eficiência (maior área do pico cromatográfico) de extração empregando entre 3 a 6 mL de amostra, e entre 1,5 a 3 minutos de extração. O tempo de extração é um parâmetro importante desse tipo de processo. Porém, nem sempre tempos de agitação longos são indicados (MOLDOVEANU; DAVID, 2002) como observado experimentalmente.

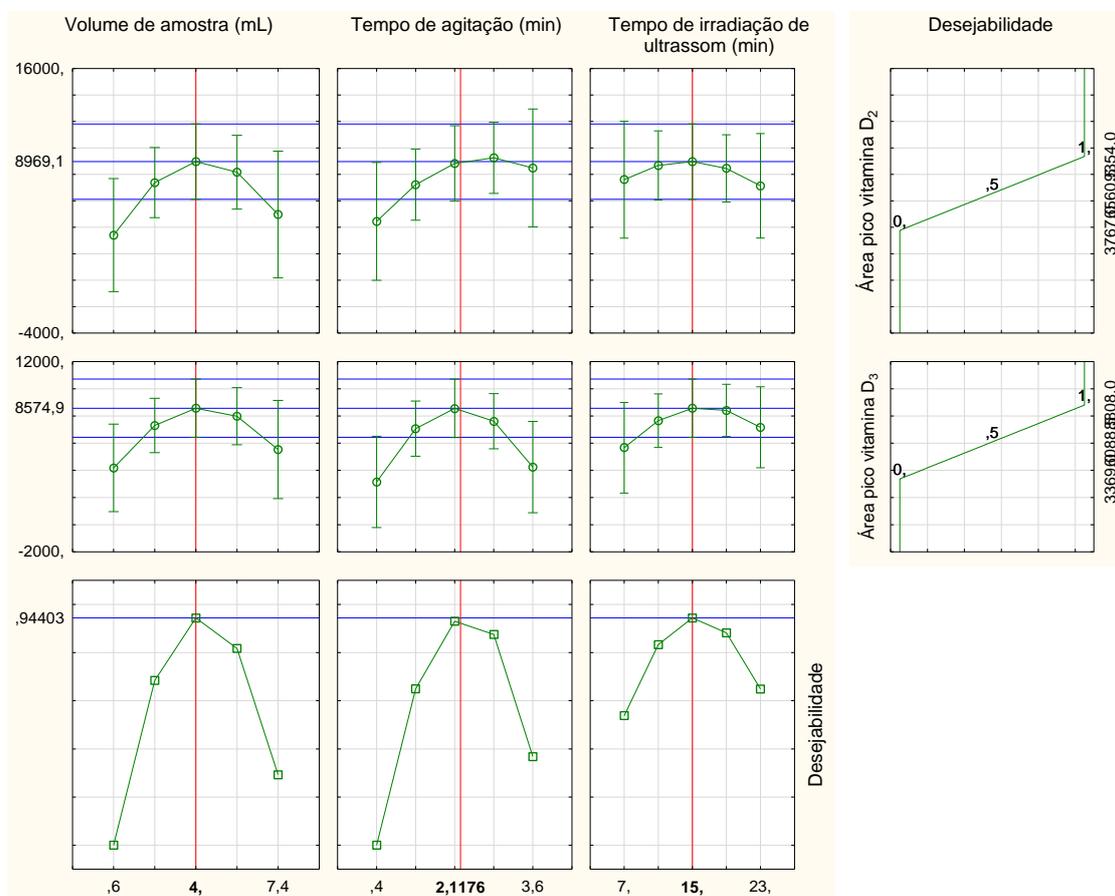
Figura 3 - Superfície resposta (a) e curva de contorno (b) relacionando a área do pico cromatográfico para vitamina D₃ extraída de leite fluido em função do volume de amostra e tempo de extração (agitação).



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

A melhor condição analítica otimizada para a extração líquido-líquido de vitaminas D₂ e D₃ a partir de leite fluido foi obtida utilizando 4,0 mL de amostra (X₁), 2 minutos de agitação (X₂) e 15 minutos de irradiação de ultrassom (X₃). Pelo uso da função desejabilidade foi possível correlacionar algumas respostas a fim de definir a metodologia mais apropriada realizando poucos experimentos (Figura 4). O modelo proposto foi validado determinando a capacidade máxima de extração, e os resultados experimentais foram comparados com os valores preditos. Não foram observadas diferenças significativas considerando $p \leq 0,05$.

Figura 4 - Perfil dos valores preditos e desejabilidade considerando o volume de amostra (X_1), tempo de agitação (X_2) e tempo de irradiação de ultrassom (X_3) durante a extração de vitaminas D_2 (Y_1) e D_3 (Y_2) a partir de leite fluido.



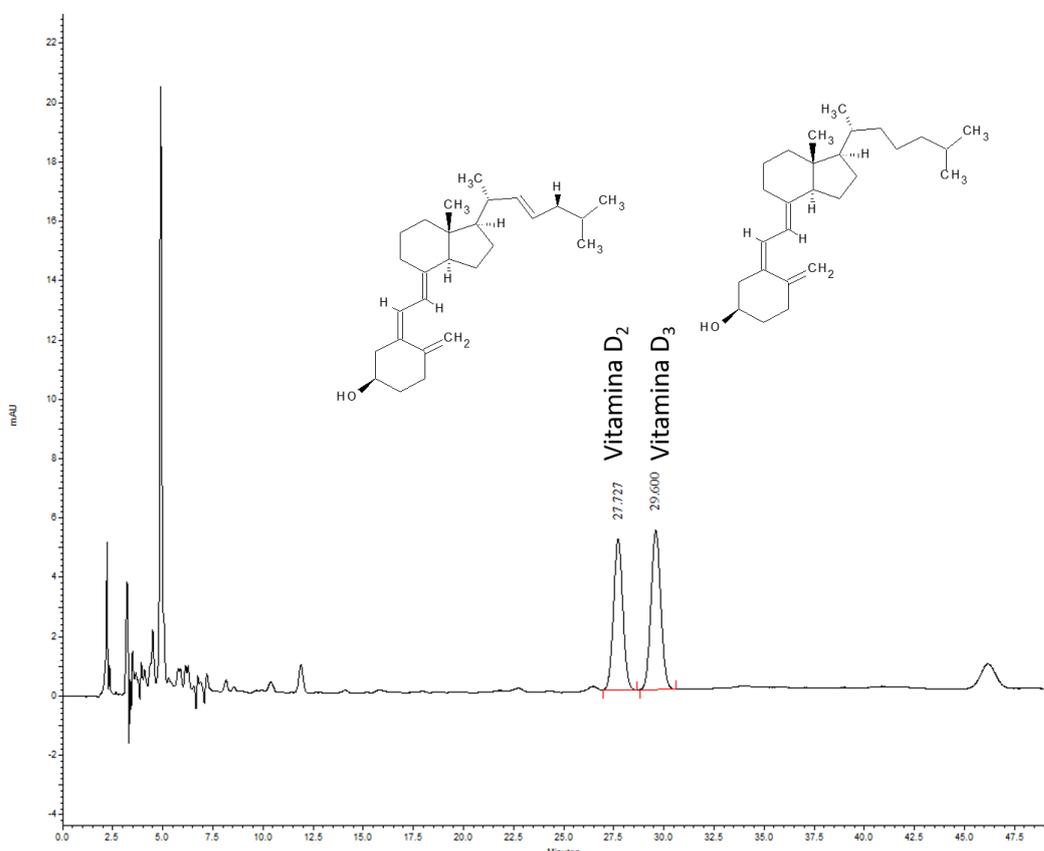
Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

2.3.1. Validação do método

O método proposto foi validado e aplicado para determinar a concentração das vitaminas lipossolúveis ergocalciferol (D_2) e colecalciferol (D_3) em leite fluido bovino e ovino. A seletividade do método foi avaliada considerando o formato dos picos cromatográficos, o tempo de retenção e a quantidade de interferentes no espectro. Não foram determinadas quantidades significativas de interferentes nos tempos de retenção dos analitos, observando-se pureza superior a 99 % para ambas as vitaminas. Pelo método proposto foi determinado um fator de retenção de 1,07, considerando o tempo de retenção do ergocalciferol de 27,13 min e do colecalciferol de 29,83 min (Figura 5). Foram observadas também boas linearidades, com coeficientes de determinação (R^2) de 0,9900 (Tabela 5). Na metodologia anteriormente proposta por GOMES *et al.* (2015),

os valores determinados para R^2 foram 0,998 e 0,999 para as vitaminas D₂ e D₃, respectivamente. Kwak *et al.* (2014) determinaram um valor de R^2 de 0,9999 para a vitamina D₃, enquanto que os valores de R^2 para essa mesma vitamina encontrados por Gill, Zhu e Indik (2015) foram maiores 0,9990. Pela análise de variância foi possível demonstrar que a regressão linear foi significativa para as faixas de concentrações estudadas ($p < 0,05$) e que não houve falta de ajuste nos modelos matemáticos ($p < 0,05$). Com base na faixa de trabalho obtida percebe-se que o método proposto é sensível, sendo possível a quantificação das vitaminas D₂ e D₃ em concentrações da ordem de nanogramas (10^{-9}) por 100 mililitros de amostra de leite fluido.

Figura 5 - Cromatograma com os tempos de retenção experimental para cada vitamina



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração de analito na amostra teste que pode ser distinguida de forma confiável e que é diferente de zero (UNION *et al.*, 2002). O limite de quantificação (LOQ) foi considerado como sendo o primeiro ponto da curva de calibração. Os limites de detecção obtidos para as vitaminas D₂ e D₃ foram 0,86 e 0,78 ng 100 mL⁻¹, respectivamente. Os limites de quantificação foram 1,25 ng

100 mL⁻¹ para ambas as vitaminas conforme apresentado na Tabela 5. Os valores de LOD e LOQ encontrados neste estudo foram menores do que os valores determinados por Jiao *et al.*, (2017) e Barba, Esteve e Frígola, (2011). Isso indica que o método proposto nesse trabalho pode ser útil na determinação e quantificação de vitaminas D₂ e D₃ contidas em amostras de leite fluido.

Tabela 5 - Faixa linear, coeficiente de determinação (R²), limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD) de vitaminas D₂ e D₃ em leite fluido.

Composto	Faixa linear (ng 100 mL⁻¹)	Coefficiente de determinação (R²)	LOQ (ng 100 mL⁻¹)	LOD (ng 100 mL⁻¹)
Ergocalciferol – D ₂	1,25 – 37,5	0,9900	1,25	0,86
Colecalciferol – D ₃	1,25 – 37,5	0,9900	1,25	0,78

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

A precisão analítica na faixa de trabalho é determinada pela repetibilidade, sendo confirmado pelo valor do desvio padrão relativo dos resultados obtidos. Testes de precisão do método proposto foram realizados determinando as vitaminas D₂ e D₃ em três concentrações diferentes. Os resultados dessas medidas são mostrados na Tabela 6. Os níveis de concentrações (baixa, intermediária e alta) foram distribuídos como pontos ao longo da faixa linear. A variação da precisão intracorrída em concentração baixa foi maior do que em concentrações intermediária ou alta. Os valores de precisão intracorrída e precisão intermediária estão de acordo com os valores recomendados pela AOAC (2011). A exatidão do método foi determinada por meio de ensaios de recuperação para cada uma das vitaminas em três concentrações diferentes (Tabela 6). Os valores obtidos para ambas as vitaminas variaram de 88,16 a 114,45 % e podem ser considerados adequados uma vez que estão de acordo com aqueles recomendados pela AOAC (2011).

Tabela 6 - Resultados de precisão e exatidão para o método proposto.

Composto	Concentração (ng 100 mL⁻¹)	Precisão intracorrida (%)	Precisão intermediária (%)	Exatidão (%)
Ergocalciferol – D ₂	1,25	6,23	9,96	114,45
	22,5	7,03	7,08	99,44
	37,5	9,91	11,87	88,16
Colecalciferol – D ₃	1,25	5,99	8,81	105,81
	22,5	3,94	6,24	92,61
	37,5	10,00	12,77	93,94

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

2.3.2. Aplicação do método proposto em amostras reais

Para verificar a aplicabilidade do método proposto foram estudadas 6 (seis) amostras de leite fluido. Uma das amostras foi de leite cru bovino, outra de leite cru ovino e outras quatro de marcas diferentes de leites UHT provenientes de diferentes regiões dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Essas informações estão apresentadas na Tabela 7 para ensaios realizados em triplicata.

Tabela 7 - Aplicação do método proposto para determinação de vitaminas D₂ e D₃ em amostras reais de leite fluido.

Amostra	Município de Origem	Ergocalciferol – D₂ (ng 100 mL⁻¹)	Colecalciferol – D₃ (ng 100 mL⁻¹)
01	Concórdia – SC	2,96 ± 0,05 ^a	3,34 ± 0,07 ^b
02	Nova Petrópolis – RS	1,51 ± 0,10 ^b	n.q.
03	Pinhalzinho – SC	2,62 ± 0,06 ^a	9,57 ± 0,51 ^a
04	Teutônia – RS	2,82 ± 0,20 ^a	2,09 ± 0,02 ^c
05	Leite cru de vaca	1,86 ± 0,15 ^b	1,27 ± 0,07 ^c
06	Leite cru de ovelha	1,56 ± 0,13 ^b	3,36 ± 0,00 ^b

n.q. = não quantificado. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível significância $p < 0,05$.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Weir *et al.* (2017) relataram que fatores ambientais e genéticos influenciam no teor de vitamina D em leite bovino. Esses autores informaram também que variações sazonais, dieta, exposição à radiação UVB, fatores genéticos, entre outros, podem causar variações nas quantidades de vitamina D em amostras de leite. Por exemplo, a variação sazonal entre verão e inverno interfere na quantidade de vitamina D devido a diferenças nas práticas de criação e alimentação do animal. No período de inverno diminui a intensidade dos raios ultravioleta (UV) e ocorre a redução do consumo de pastagem. As pastagens são fontes de vitamina D₂ e a exposição solar é a precursora da vitamina D₃ (BARTLETT *et al.*, 1938) (LINDMARK-MÅNSSON; FONDÉN; PETTERSSON, 2003). A variação da quantidade de vitamina D₃ entre as quatro amostras de leite UHT provenientes de diferentes regiões deve-se ao fato das regiões possuírem variações sazonais, as quais podem alterar a quantidade de luz solar disponível para a conversão da 7-desidrocolesterol na pele do animal em colecalciferol (PROGRESS; HOLICK, 2008). A variação da quantidade de vitamina D₂ não foi muito acentuada visto que a presença dessa vitamina em amostras de leite fluido depende da quantidade de plantas ingeridas pelo animal (GILL; ZHU; INDYK, 2015).

Jakobsen e Saxholt (2009) investigaram a influência da estação do ano nos teores de gorduras e vitaminas em amostras de leite, comparando o leite bovino convencional com o leite orgânico. Eles perceberam que as concentrações de vitaminas D foram menores em meses mais quentes e com menos exposições solares, nos quais as pastagens eram também mais escassas. Assim, confirmou-se que a fonte de alimentação do animal e a exposição solar são variáveis importantes para estabelecer o teor de vitaminas D₂ e D₃ em amostras de leite fluido provenientes de diferentes regiões. Os resultados do presente estudo são similares aos obtidos por Jakobsen e Saxholt (2009) uma vez que no estado do Rio Grande do Sul os invernos são mais rigorosos e com menor incidência solar, enquanto que a região do estado de Santa Catarina onde foram coletadas as amostras, os dias são mais quentes e com maior exposição solar. Assim, seria esperado que os teores de vitaminas D₂ e D₃ em amostras de leite fluido fossem maiores. Os valores obtidos para as amostras testadas foram discrepantes dos encontrados em alguns trabalhos da literatura. Por exemplo, Blanco, Fernández e Gutiérrez (2000) encontraram concentrações de vitaminas D₂ e D₃ de 0,10 e 0,077 ng 100 mL⁻¹, respectivamente, em amostras de leites bovinos da Espanha. Além disso, Barba, Esteve e Frígola (2011) determinaram que a concentração de vitamina D₃ em leite foi 184 ng 100 mL⁻¹. Por fim, Gomis, Fernández e Gutiérrez (2000) encontraram

concentrações de vitaminas D₂ e D₃ próximas a 720 e 880 ng 100 mL⁻¹, respectivamente.

2.4. CONCLUSÃO

A metodologia de precipitação de proteínas combinada com ELL e CLAE-DAD pode ser eficientemente aplicada à quantificação de vitaminas ergocalciferol (D₂) e colecalciferol (D₃) em amostras de leite fluido. Além disso, essa metodologia é simples e possui boa repetibilidade. Com isso, seria possível a sua implementação em plantas industriais. Pelo planejamento fatorial, as melhores condições experimentais para extração de vitaminas D₂ e D₃ a partir de leite fluido incluem volume de amostra de 4,0 mL, tempo de agitação de 2 min e tempo de irradiação de ultrassom de 15 min. A validação da metodologia proposta foi eficaz devido a sua excelente sensibilidade, precisão, exatidão e linearidade na faixa de trabalho. Assim, essa metodologia pode ser aplicada para determinar a concentração de vitaminas D₂ e D₃ presentes em leites bovino e ovino contendo diferentes teores de gordura. Após a aplicação da metodologia proposta em amostras reais foi possível verificar que a concentração das vitaminas D₂ e D₃ no leite são influenciadas por variáveis como o tipo de alimentação e a exposição solar do animal.

3. Capítulo 3

DETERMINAÇÃO DE MINERAIS E OLIGOELEMENTOS EM LEITES BOVINOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

3.1 INTRODUÇÃO

Uma das grandes preocupações do produtor de leite até pouco tempo atrás era com a quantidade de produto produzido e não com a sua qualidade. Porém, esse conceito tem mudado devido ao desenvolvimento tecnológico do setor leiteiro brasileiro e ao conhecimento dos potenciais que esse produto tem na alimentação humana. Assim, a qualidade do leite produzido é um grande desafio para o setor atualmente. Nesse sentido, as determinações das concentrações de minerais e oligoelementos em amostras de leites provenientes de diferentes regiões e estações do ano é de suma importância (THALER NETO, 2006).

O leite é considerado um dos alimentos mais completos devido ao seu alto valor nutricional, contendo uma mistura de nutrientes cruciais para o bom funcionamento do corpo humano. Além disso, o leite possui uma variedade de nutrientes não energéticos e que são essenciais para o ser humano tais como: minerais (cálcio, fósforo, potássio, zinco, selênio, magnésio) e vitaminas (A, B6, B12, tiamina, riboflavina, niacina, ácido fólico e ácido pantotênico) (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006) (BISHOP-MACDONALD; FARMERS, 2005). A importância do leite bovino na nutrição humana tem sido frequentemente discutida porque contém a maioria dos vinte minerais essenciais para a dieta humana (FLYNN, 1992). As concentrações de minerais e oligoelementos em leite cru variam de acordo com a secreção da glândula mamária durante a lactação, espécie do animal, estado de saúde do animal, estação do ano, tipo de nutrição do animal e o meio ambiente onde o animal vive (NORO *et al.* 2006) (HECK *et al.* 2009) (LAMBERTZ; SANKER, 2014).

O leite bovino possui em média 87 % de água, 9 % de sólidos não gordurosos (3,3 % de proteína, 4,6 % de lactose e 0,7 % de cinzas) e 4,0 % de gordura (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Esse produto possui teores elevados de macroelementos (cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio) e teores baixos de microelementos (alumínio, bromo, zinco, manganês e ferro). De forma geral, os microelementos presentes em amostras de leites são encontrados associados às proteínas

(PINHEIRO; MOSQUIM, 1991). A composição físico-química do leite bovino pode ser descrita em termos das concentrações de minerais, proteínas, lipídeos, hidratos de carbono, citratos e aminoácidos (VEGARUD; LANGSRUD; SVENNING, 2000).

As determinações de macro e microelementos em amostras de leite bovino podem ser realizadas por espectrometria de absorção atômica em chama ou forno de grafite. Esses equipamentos podem conter fontes de catodo oco ou fontes contínuas de alta resolução. Essa determinação pode também ser realizada por emissão atômica em plasma indutivamente acoplado e espectrometria de massa (ATARO *et al.*, 2008)(BRANDAO; MATOS; FERREIRA, 2011)(DERVISOGLU *et al.*, 2014) (KOLETZKO *et al.*, 2005)(TARAKCI; KUCUKONER, 2008)(Z. GULER; 2007). As determinações de macro e microelementos em amostras de leites, e em produtos à base de leite, são particularmente difícil devido à complexidade da matriz. Assim, a preparação das amostras é um passo importante em todo o processo analítico e para isso existem diferentes processos. Em geral, a preparação de uma amostra de leite para a determinação de micro e macroelementos pode ser realizada por análise por via seca, análise por via úmida e digestão por micro-ondas (BAKIRCIOGLU; KURTULUS; UCAR, 2011).

Os objetivos nesse capítulo foram realizar a caracterização físico-química de amostras de leites produzidos na região Oeste do estado de Santa Catarina e determinar as concentrações de cálcio, sódio, potássio e magnésio. Além disso, foi verificado como esses parâmetros são alterados com o tratamento térmico durante o preparo da amostra e como são também alterados com as estações do ano.

3.2 MATERIAIS E METODOS

3.2.1 Amostras

As amostras de leite foram coletadas em um laticínio da região oeste do estado de Santa Catarina onde são recebidos diariamente os leites produzidos em toda região. As amostras de leite cru foram coletadas diretamente no silo de leite cru. As amostras de leite pasteurizado foram coletadas logo após o processo de pasteurização. As amostras de leite UHT foram coletadas após o processo UHT e envase. As amostragens foram realizadas nos meses de março, maio, julho e novembro de 2018. Foram coletadas nove amostras por mês, sendo três amostras de leite cru, três amostras de leite pasteurizado e

uma amostra para cada tipo de leite UHT (integral, semidesnatado e desnatado). As amostras utilizadas nas análises físico-químicas foram mantidas sob-refrigeração de $4,0 \pm 1,0$ °C até o momento dos ensaios. As amostras para a determinação de minerais foram congeladas e mantidas em ultrafreezer (Indrel Ultra Freezer - 86 °C) até o momento de preparo de análise.

3.2.2 Caracterização físico-química

Para a caracterização físico-química das amostras de leites foram realizados os seguintes ensaios: i) sólidos totais e sólidos não gordurosos pelo método gravimétrico (método 990.20 AOAC 2016), ii) resíduo mineral fixo (cinzas) por mufla a 550 °C (método 945.46 AOAC 2016), iii) lipídeos pelo método de Gerber (método 2000.18 AOAC 2016) e iv) proteína (nitrogênio total) pelo método de Kjeldahl (método 991.20 AOAC 2016). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram preparadas com água ultrapura.

3.2.3 Determinação de minerais

Para a determinação das concentrações dos minerais nas amostras dos leites foi utilizada a metodologia descrita pela AOAC, 2016 (metodologia 985.35). A quantificação foi realizada por espectrometria de absorção atômica em chama (SpectrAA 220, lâmpadas de cátodo oco, Varian). Para a preparação das amostras e análises foram utilizados ácido nítrico (Synth) e ácido clorídrico (Synth). Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (MILLIPORE Type 1 UltraPure Water Systems). Os padrões analíticos de sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) foram comprados na Sigma-Aldrich. O equipamento foi calibrado antes de cada análise utilizando o método de curva de calibração com solução padrão externo. Foram utilizados como gases no equipamento de absorção atômica o acetileno, óxido nítrico e ar comprimido (Linde Gás, São Paulo, Brasil).

3.2.4 Análises estatística

As caracterizações físico-químicas das amostras de leites foram realizadas em duplicata e a quantificação dos minerais em triplicata. Análise de variância (ANOVA)

foi aplicada aos dados experimentais considerando um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Para essas análises foi utilizado o software Statistica, versão 10 (STATSOFT Inc., Tulsa, OK, EUA).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSOES

3.3.1 Caracterização físico-química

Na Tabela 8 são apresentados os resultados das caracterizações físico-químicas das amostras de leite cru em diferentes estações do ano. Para esses ensaios foi aplicada análise de variância (ANOVA) em um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Caracterizações físico-químicas das amostras de leite cru coletadas em diferentes estações do ano.

Ensaio	Estação do ano	Média \pm DP	Valor mínimo	Valor máximo
Proteína %	V	3,32 \pm 0,04^a	3,25	3,38
	O	3,27 \pm 0,12^a	3,15	3,43
	I	3,27 \pm 0,07^a	3,09	3,39
	P	3,12 \pm 0,05^b	3,06	3,18
Lipídeos %	V	3,93 \pm 0,05^b	3,85	4,00
	O	4,13 \pm 0,05^a	4,10	4,20
	I	4,14 \pm 0,09^a	4,00	4,25
	P	3,59 \pm 0,07^b	3,50	3,70
Extrato Seco Total %	V	12,71 \pm 0,09^a	12,56	12,82
	O	12,56 \pm 0,04^a	12,54	12,61
	I	12,70 \pm 0,16^a	12,52	12,98
	P	12,04 \pm 0,08^b	11,93	12,14
Resíduo Mineral Fixo %	V	0,73 \pm 0,03^a	0,70	0,77
	O	0,72 \pm 0,03^a	0,68	0,75
	I	0,71 \pm 0,01^a	0,69	0,72
	P	0,65 \pm 0,03^b	0,61	0,68

* letras iguais significam que não há diferença significativa (^a) e letras diferentes indicam que há diferença significativa (^b).

*V= verão, O=outono, I=inverno e P=primavera.

Fonte: Elaborado pelos autores (2019).

Os teores de proteína, extrato seco total e resíduo mineral fixo (cinzas) foram menores na primavera do que nas outras estações do ano. Os teores de lipídeos foram menores na primavera e verão quando comparado ao outono e inverno. Heck *et al.* (2009) atribuíram a redução do teor de gordura durante o verão a uma dieta animal fresca e à base de capim. A menor quantidade de alimento verde ingerido pelo animal pode diminuir o índice de fermentação no rúmen que converte o acetato em propionato. Como o propionato é o principal componente do rúmen utilizado na produção de lipídios no organismo, sua redução diminui o teor de lipídeo no leite. Em estudos realizados no estado do Rio Grande do Sul (Brasil) foram encontrados teores menores de proteína e gordura nos leites coletados no verão e na primavera. Assim, conclui-se que nas estações mais quentes do ano o teor de lipídeo no leite será quase sempre menor (NORO *et al.*, 2006) (BONDAN *et al.*, 2018). É importante salientar que não foram encontradas diferenças significativas nos teores de proteínas no verão.

As gramíneas forrageiras temperadas possuem maiores teores de fibras no final do outono e inverno, e início da primavera no clima temperado do sul do Brasil. Além disso, há maior concentração de carboidratos solúveis em gramíneas forrageiras temperadas do que em gramíneas forrageiras tropicais. Isso influencia a produtividade dos gados e os teores de compostos químicos no leite (FONTANELI *et al.* 2009). Assim, as gramíneas forrageiras temperadas são melhores para o equilíbrio nutricional do animal. Isso também auxilia na explicação das maiores concentrações de gordura, proteína e sólidos totais no leite durante o inverno (BONDAN *et al.*, 2018). LAMBERTZ e SANKER, (2014) concluíram que vacas que sofrem estresse térmico no verão têm menor produção de leite e menores teores de gordura e proteína. Isso é consistente com os resultados obtidos no presente estudo.

Observou-se que a sazonalidade é fundamental para o estudo da produção de leite e para a determinação da sua composição. Em geral, houve maiores teores de gordura, proteína, sólidos totais e lactose em leites produzidos no inverno. Quando isso foi detectado em leites produzidos no sul do Brasil pode-se concluir que o resultado estava relacionado à melhor composição de forragem nesta estação. Por outro lado, o verão é a estação em que ocorre menor teor de gordura em amostras de leite devido a menor quantidade de forrageiras verdes para a alimentação animal (BONDAN *et al.*, 2018).

3.3.2 Ensaio de minerais

As concentrações médias de minerais nas amostras de leite bovino coletadas na região oeste do estado de Santa Catarina foram comparadas com os resultados obtidos por Walstra, Wouters e Geurts, (2006) e por Gaucheron (2005). Seus valores estão apresentados na Tabela 9.

Observou-se que os teores de minerais nos leites da região oeste do estado de Santa Catarina foram similares aos valores determinados em outros trabalhos (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação dos teores de minerais em diferentes amostras de leite bovino.

Mineral	Presente Estudo (mg/100ml)	WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006 (mg/100g)	GAUCHERON, 2005 (mg/100g)
Na	56	48	39,1 - 64,4
K	116	143	121,2 - 168,1
Mg	15	11	9,7 - 14,6
Ca	123	117	104,3 - 128,3

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

3.3.3 Efeitos do tratamento térmico e estação do ano nos teores de minerais no leite

Os efeitos do tratamento térmico aliado ao efeito da estação do ano nas amostras de leite coletadas na região oeste do estado de Santa Catarina foram avaliados comparando os teores de minerais em leite cru, pasteurizado e UHT. Os teores dos minerais com o tratamento térmico e estação do ano estão apresentados na Tabela 10. Os dados estatísticos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) em um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

Foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos teores de cálcio durante o verão, com valores menores do que nas outras três estações do ano. Além disso, observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de sódio no outono, com valores menores quando comparado às outras três estações do ano. Já em relação ao potássio em leite cru houve diferença significativa ($p < 0,05$) somente para o inverno e para o leite pasteurizado e UHT houve diferença significativa ($p < 0,05$) na primavera. Os teores de magnésio foram maiores no verão e menores na primavera. Essas

discrepâncias foram também reportadas na literatura. Por exemplo, Rodríguez, Alaejos e Romero (2001) determinaram a concentração de minerais em leite bovino de animais das Ilhas Canárias durante 12 meses. Como resultado observaram que não houve diferença significativa entre os teores de Na e Ca. No entanto, houve diferença significativa quando estudado Mg. Além disso, menores concentrações dos minerais foram determinadas no outono.

Tabela 10 - Efeitos do tratamento térmico e estação do ano nos teores de minerais em leite.

Tratamento	Estação	Cálcio	Sódio	Potássio	Magnésio
Térmico	do ano	(mg/ 100g)	(mg/100 g)	(mg/100 g)	(mg/ 100 g)
Cru	Verão	100,11±5,70 ^d	55,22±3,08 ^{cd}	104,67±3,00 ^c	17,27±0,76 ^a
	Outono	138,29±8,45 ^{ab}	37,51±0,68 ^e	123,02±3,75 ^c	15,66±0,34 ^{ab}
	Inverno	125,15±2,80 ^{bc}	62,82±1,69 ^{bcd}	142,47±10,52 ^{bc}	13,61±1,40 ^{ab}
	Primavera	120,56±3,61 ^{bcd}	71,81±3,81 ^{ab}	114,87±5,32 ^c	13,00±0,81 ^{ab}
Pasteurizado	Verão	104,92±8,26 ^{cd}	73,06±1,36 ^{abcd}	115,88±3,35 ^{abc}	18,48±0,63 ^{ab}
	Outono	161,19±5,00 ^a	51,13±2,07 ^{cde}	136,71±1,09 ^{abc}	15,39±0,79 ^{ab}
	Inverno	162,74±4,46 ^a	58,73±5,22 ^{abcd}	122,21±4,73 ^{abc}	17,83±3,24 ^{ab}
	Primavera	123,10±5,62 ^{bcd}	74,61±5,93 ^{ab}	188,13±25,25 ^{ab}	10,41±1,52 ^b
UHT	Verão	100,97±2,87 ^{cd}	75,17±1,18 ^{abc}	117,30±6,50 ^{abc}	20,00±0,78 ^a
	Outono	137,69±7,63 ^{abc}	48,19±1,06 ^{de}	139,29±6,40 ^{abc}	14,76±0,07 ^{ab}
	Inverno	141,57±7,63 ^{abc}	70,33±4,26 ^{abcd}	125,47±7,10 ^{abc}	14,11±2,04 ^{ab}
	Primavera	123,77±3,96 ^{bcd}	79,59±6,02 ^a	197,43±23,07 ^a	9,56±1,07 ^b

* letras iguais na coluna significam que não há diferença significativa ($p < 0,05$) e letras diferentes indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

Os teores de Ca e K no leite produzido no inverno e primavera por animais alimentados com pasto verde não são estatisticamente significantes. Porém, diferenças significativas podem ser encontradas nos estudos dos teores de Na e Mg, com valores mais elevados no inverno (NANTAPO; MUCHENJE, 2013). Diferenças significativas nos teores de minerais podem também ser encontradas em leites produzidos entre estações mais frias e mais quentes. Isso deve-se ao efeito de diluição o qual está relacionado à alimentação do animal (Z. GULER, 2007). No inverno a alimentação é em sua maioria com concentrado mais fibroso, enquanto na primavera com pastos mais

suculentos e menos fibrosos. Assim, a absorção dos minerais pela alimentação sofre variações, e conseqüentemente, a quantidade de minerais disponíveis no leite também irá variar. O estágio de lactação dos animais e as práticas de gerenciamento também alteram os teores de Ca, P e K no leite. Maiores valores podem ser determinados em amostras de leite de animais que consumiram suplementação mineral durante a alimentação (DUNSHEA *et al.*, 2019). Por esses resultados pode-se concluir que a alimentação do animal influencia diretamente no teor de minerais do leite. Independente da estação do ano, práticas de gerenciamento, principalmente em relação à alimentação do animal, podem prevenir oscilações no conteúdo de minerais do leite. Em alguns casos, os teores de Na e Mg em leites e produtos lácteos não dependem da ingestão dietética do animal, mas sim, do período de lactação. Isso pode aumentar ou diminuir o teor de minerais no leite bovino. Os teores de K em leites e produtos lácteos são aqueles que mais dependem das quantidades de minerais ingeridos na dieta animal (ZAMBERLIN *et al.*, 2012). Em uma revisão da literatura verificou-se que o teor de mineral presente em leite bovino não é influenciado pela dieta do animal. Por outro lado, esse teor é influenciado pelas estações do ano e pelo período de lactação (FLYNN 1992).

Em relação ao tratamento térmico, a literatura indica que temperaturas moderadas, como a utilizada no processo de pasteurização e ultrapasteurização não teriam grandes influências no teor de minerais em leite. O tratamento térmico de uma amostra de leite utilizando temperatura maior que 95 °C durante alguns minutos, como no tratamento de leite UHT em 121 °C entre 3 e 4 minutos, modifica os equilíbrios que são considerados reversíveis na solução aquosa. Porém, aquecimentos severos, como por exemplo, a 120 °C durante 20 min causam alterações irreversíveis nas micelas de caseína e na partição de sais (GAUCHERON, 2005). Por exemplo, o fosfato de cálcio migra para dentro e para fora das micelas de caseína com mudanças na temperatura, e esse processo de migração torna-se reversível em temperaturas moderadas. Assim, isso não afetaria as propriedades nutricionais dos minerais presentes no leite. Em temperaturas muito elevadas, o fosfato de cálcio pode se precipitar no soro do leite, provocando mudanças irreversíveis na estrutura da caseína (FOX; MCSWEENEY, 1998). Assim, pode-se concluir que os teores de diversos minerais como Na, K e Mg presentes em amostras de leite cru e leite UHT não serão estatisticamente diferentes. Por outro lado, o teor de Ca pode ser menor em leite UHT (RODRÍGUEZ, ALAEJOS e ROMERO 2001).

Além disso, outras situações podem ter favorecido as variações observadas nos teores dos minerais estudados. A coleta das amostras de leite cru foi realizada diretamente no silo de leite cru como já citado anteriormente. Porém, não é garantido que o leite cru coletado nesse silo é o mesmo daquele que está no silo para pasteurização devido à entrada e saída de amostra constante. Na comparação do leite pasteurizado e UHT, pode-se afirmar que o leite está totalmente homogêneo e que não está ocorrendo variação de entrada e saída de leite. Isso está relacionado com as coletas dessas amostras que só foram realizadas após a finalização do processo térmico e padronização. Esse pode ser um dos motivos de ter sido evidenciada diferença significativa ($p < 0,05$) maior entre o leite cru quando comparado ao leite pasteurizado e UHT para todos os minerais estudados.

Os minerais estão distribuídos nas amostras de leites nas frações difusas e não difusas (essencialmente micelas de caseína). Por exemplo, o potássio, sódio e cloreto estão essencialmente na fração difusa, enquanto que cálcio, fosfato e magnésio são encontrados na fração não difusa. Cerca de um terço do cálcio, metade do fosfato, dois terços de magnésio e mais de 90 % de citrato são encontrados em fase aquosa do leite. Uma pequena proporção de cálcio também pode ser encontrada ligada a α -lactalbumina. Assim, os teores de cálcio e fosfato são maiores em leites ricos em proteínas e nenhum mineral é ligado em quantidade importante aos glóbulos de gordura e lactose (GAUCHERON, 2005). Portanto o processo de padronização do leite, não parece ter efeito significativo na redução de minerais. Assim, leite semidesnatado ou desnatado não teriam teores de minerais menores quando comparados aos leites integral ou cru.

3.4 CONCLUSÃO

Pelos resultados da caracterização do leite cru coletado em diferentes estações do ano pode-se concluir que a sazonalidade influenciou a produção e a composição do produto. Isso se deve à variação na dieta do animal. Nos períodos mais frios há maior consumo de gramíneas, aumentando os teores de gordura, proteína e sólidos totais nas amostras de leite. Houve diferença estatística significativa nos teores de sódio em leite no outono e de cálcio no verão. Porém, os teores dos minerais presentes no leite bovino podem não ser influenciados pela dieta do animal, mas sim, pelas estações do ano. No entanto, o período de lactação do animal poderia ser mais influente nos teores dos metais do que a própria alimentação ou as estações do ano. Contudo, os teores de

minerais presentes nas dietas dos animais poderiam gerar influência significativa na composição final do leite e de seus derivados lácteos. Um dos motivos das diferenças significativas nos teores dos minerais em diferentes amostras de leite pode ser devido a coleta em silos que armazenavam leites de diferentes origens. Assim, seriam importantes estudos mais detalhados para afirmarmos precisamente quais fatores seriam aqueles que mais influenciariam nos teores dos minerais no leite bovino.

O tratamento térmico moderado não causou efeitos nos teores dos minerais uma vez que não foi encontrada diferença significativa entre o leite pasteurizado e UHT. A diferença significativa observada nos teores de minerais entre o leite cru e tratado termicamente provavelmente deve-se ao fato de não ser possível coletar exatamente o mesmo leite. Isso é resultado da entrada e saída constante de matérias primas nos silos.

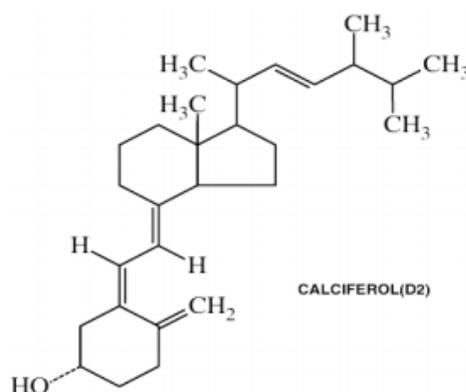
4 Capítulo 4

DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS D₂ E D₃ EM LEITE FLUIDO BOVINO POR CLAE-DAD

4.1 INTRODUÇÃO

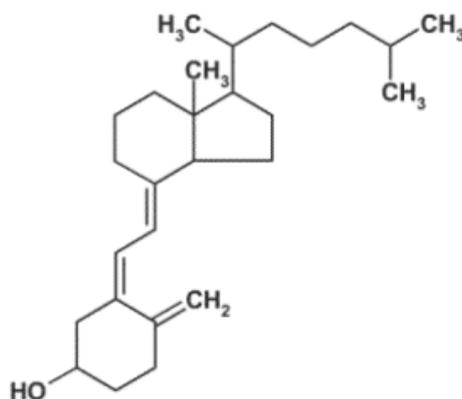
A vitamina D é uma molécula da classe dos secosteroides de ocorrência natural e lipossolúvel. Essa espécie é conhecida como ergocalciferol ou vitamina D₂ (Figura 6), e colecalciferol ou vitamina D₃ (Figura 7). As fórmulas moleculares estruturais das vitaminas D₂ e D₃ diferem apenas devido à presença de uma ligação dupla e um grupo metila incorporados ao longo da cadeia lateral (WACKER; HOLICK, 2013).

Figura 6 - Ergocalciferol ou vitamina D₂



Fonte: BARRAL, BARROS e ARAÚJO, 2007.

Figura 7 - Colecalciferol ou vitamina D₃



Fonte: BARRAL, BARROS e ARAÚJO, 2007.

A vitamina D é produzida principalmente na epiderme da pele após a exposição à luz solar, embora pequenas quantidades também possam ser encontradas no corpo após a ingestão por dietas alimentares (HOLICK, 2006). O ergosterol e o 7-desidrocolesterol são precursores da vitamina D bastante reativos a luz ultravioleta (UV) de comprimento de onda entre 290 a 315 nm. Os produtos dessas reações são as vitaminas D₂ e D₃, respectivamente. As moléculas de vitamina D são biologicamente inertes e precisam estar ativas para atuar na homeostase do cálcio (WACKER e HOLICK, 2013). A vitamina D₃ (colecalfiferol) é metabolizada no fígado durante uma reação de hidroxilação para formar a 25-hidroxitamina D₃ (calcifediol) (BARRAL; BARROS; ARAÚJO, 2007). Após isso, esse produto pode ser transportado para os rins e nesse órgão ocorrer uma segunda hidroxilação para formar 1,25-di-hidroxitamina D₃ (calcitriol) (NORMAN, 2008). Acredita-se que a vitamina D₂ tem uma via metabólica similar à vitamina D₃. A 1,25-di-hidroxitamina D biologicamente ativa pode ligar-se ao receptor da vitamina D e desempenhar funções fisiológicas importantes como o aumento da eficiência de absorção de cálcio no intestino (NORMAN, 2008).

A deficiência de vitamina D em um organismo pode desencadear várias doenças. Essa deficiência pode ser gerada pela falta de absorção de vitaminas D provenientes de dietas alimentares ou ausência de absorção da luz solar UV-B. Alguns problemas associados à ausência de vitamina D no organismo incluem o raquitismo em crianças, além de osteomalácia e osteoporose em adultos (BATTALTA *et al.*, 2013) (HOLICK *et al.*, 2008). Além disso, níveis mais elevados de vitamina D₃ no organismo podem reduzir as taxas de câncer de mama, ovário, próstata e colorretal, bem como diminuir o risco de desenvolver esclerose múltipla (VIETH, CHAN e MACFARLANE, 2001).

Em climas temperados como no Brasil, a exposição solar pode garantir 80 % da quantidade de vitamina D necessária para o organismo humano, enquanto 20 % podem ser obtidas por uma dieta alimentar balanceada (WEBB *et al.*, 1990). A vitamina D₃ é comumente encontrada em gorduras de animais e a vitamina D₂ pode estar presente em gorduras vegetais. A vitamina D ingerida por um alimento é rapidamente absorvida no duodeno e no jejuno. Subsequentemente, ela é distribuída para a circulação sanguínea, sendo liberada do tecido adiposo em pequenas quantidades (ADAMI *et al.*, 2011). A maior quantidade de vitamina D₃ no organismo pode ser formada pela conversão do 7-desidrocolesterol após exposição aos raios ultravioleta. No entanto, a vitamina D proveniente de uma dieta alimentar balanceada e/ou a partir de suplementos alimentares específicos é importante para funções fisiológicas do organismo (CHEN *et al.*, 2007).

Peixes têm maior teor de vitamina D e são considerados fontes essenciais desta vitamina, enquanto que a carne bovina e os produtos lácteos têm menor teor de vitamina D do que os peixes. Contudo, a ingestão de carne bovina e derivados lácteos pode auxiliar no aumento do teor total de vitamina D no organismo humano (JAKOBSEN *et al.*, 2015). A vitamina D é encontrada no leite como vitamina D₂ devido o metabolismo do ergosterol e como vitamina D₃ a qual é produzida após a exposição direta do animal aos raios ultravioletas solares. Os teores de vitaminas em leites também podem ser devido à presença de gorduras na dieta animal (NORO, 2001). As determinações de vitaminas lipossolúveis em alimentos e em soro sanguíneo são importantes para correlacionar determinadas patologias e poder prescrever dietas apropriadas para os indivíduos (CHYTYAKUL, 2014) (BLANCO; FERNÁNDEZ; GUTIÉRREZ, 2000).

O objetivo nesse capítulo foi quantificar o teor de vitaminas D₂ e D₃ em leite fluido bovino empregando CLAE-DAD. Assim, foi possível verificar a influencia do processo de padronização de gordura, tratamento térmico e estações do ano na qualidade do leite produzido na região oeste do estado de Santa Catarina.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostras

As amostras de leite cru, pasteurizado e UHT foram coletadas em um laticínio da região oeste do estado de Santa Catarina onde são recebidos diariamente o leite produzido em toda região. As amostras de leite cru foram coletadas diretamente no silo de armazenagem desse tipo de produto. As amostras de leite pasteurizado foram coletadas após o processo industrial de pasteurização. As amostras de leite UHT foram coletadas após o processo UHT e posterior envase. Foram utilizadas amostras de leite pasteurizado e UHT com diferentes teores de gordura (integral, semidesnatado e desnatado). As amostras de leite foram coletadas nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2018. As amostras de leite cru e pasteurizado foram congeladas a -20 °C após a coleta, enquanto as amostras de leite UHT foram mantidas em temperatura ambiente até o momento da utilização.

4.2.2 Reagentes

Foram utilizados para os experimentos acetonitrila (J.T. Baker), hexano (Synth), diclorometano (Synth) e metanol (J. T. Baker), todos de grau cromatográfico. Água ultrapura foi preparada em um purificador de água Gehaka modelo Master All, São Paulo, SP, Brasil. Ergocalciferol (número CAS 50-14-6) e colecalciferol (número CAS 67-97-0) foram comprados na Sigma-Aldrich. Foram preparadas soluções estoque de vitaminas D₂ e D₃ com 1,0 g L⁻¹ dissolvendo 100 mg de padrão em 100 mL de metanol. A partir das soluções estoque foram preparadas as soluções de trabalho contendo 1,0 mg L⁻¹ em metanol. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar sob-refrigeração de 4,0 ± 1,0 °C.

4.2.3 Preparo de amostras

As amostras de leite cru e pasteurizado foram descongeladas em banho-maria a 35,0 ± 1,0 °C e homogeneizadas por 30 min utilizando agitador mecânico (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil). As amostras de leite UHT foram abertas no momento da realização dos ensaios e posteriormente armazenadas sob-refrigeração de 4,0 ± 1,0 °C. Todas as amostras foram preparadas conforme já descrito no Capítulo 2. Assim, 8,0 mL de acetonitrila foram misturados em 4,0 mL de leite utilizando agitador vortex (Ika, Staufen, Alemanha) operando em 2500 rpm durante 2 min. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho de ultrassom (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) a 25 °C operando com frequência de 40 kHz por 15 min. Após isso, as amostras foram centrifugadas durante 10 min em 4400 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrifugação, sendo adicionados 12,0 mL de solução de hexano/diclorometano (4:1 v/v) sob agitação em vortex de 2500 rpm por 2 min. A camada orgânica superior foi transferida para outro tubo de centrifugação e o processo de extração repetido. Os dois lotes de sobrenadantes foram misturados em um frasco e os solventes evaporados utilizando rotaevaporador (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) operando a 55 °C com vácuo. O balão com o material de evaporação foi lavado com 2,0 mL de metanol, filtrado em filtro PTFE de 0,22 µm (Hexis, Jundiaí, São Paulo, Brasil) e o líquido obtido injetado no cromatógrafo para a separação e quantificação das vitaminas D₂ e D₃.

4.2.4 Identificação e quantificação de vitamina D₂ e D₃ por CLAE-DAD

A identificação e quantificação das vitaminas D₂ e D₃ em amostras de leites foram realizadas conforme metodologia já previamente validada e descrita no Capítulo 2. Para isso, foi utilizado um equipamento Agilent 1260 Infinity, Santa Clara, Califórnia, EUA, operando com um sistema quaternário de bombas, injetor automático 1290, detector de arranjo de diodos (DAD) e software Lab Advisor. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de guarda (4,6 mm x 12,5 mm, 5 µm; Zorbax ODS 4-Pack, da Agilent) e uma coluna analítica (4,6 mm x 250 mm, 5 µm; Zorbax ODS 4-Pack, da Agilent) operando à 37 °C com eluição isocrática. Como fase móvel foi utilizada uma solução de metanol e água (95:5, v:v) e vazão de 0,8 mL min⁻¹. O tempo total para o processo de separação cromatográfica foi de 50 min e o volume de injeção de 20 µL. A área dos picos cromatográficos foi monitorada em 261 e 265 nm. A identificação dos picos cromatográficos foi realizada utilizando os sinais analíticos gerados no detector DAD. As vitaminas D₂ e D₃ foram identificadas por meio da comparação dos tempos de retenção e dos sinais gerados pelo detector. Tal comparação foi realizada utilizando os sinais dos padrões dos analitos e das amostras de leite fluido. As áreas dos picos foram utilizadas para a quantificação com o emprego de curva de calibração com padrão externo. As concentrações das vitaminas foram determinadas em triplicata e os valores apresentados em ng 100 mL⁻¹.

4.2.5 Análises estatística

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas considerando um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). As diferenças significativas entre os teores de vitaminas nas amostras em diferentes condições experimentais foram determinadas utilizando o Teste de Tukey. Os resultados das análises estatísticas foram obtidos utilizando o software *Statistica*, versão 10 (STATSOFT Inc., Tulsa, OK, EUA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os teores de vitaminas D₂ e D₃ nas amostras de leites cru, pasteurizado e UHT em diferentes meses do ano estão apresentados na Tabela 15. Houve diferenças significativas nos teores de vitaminas D₂ e D₃ entre o leite cru (sem tratamento térmico)

comparado ao leite pasteurizado e UHT. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os leites pasteurizado e UHT.

Tabela 11 - Quantidade de vitamina D₂ e D₃ nos leites integral, semidesnatado e desnatado coletado nos meses de maio, julho, setembro e novembro de 2019.

Teor de gordura	Tratamento térmico	Mês de produção	Vitamina D ₂ (ng.100 mL ⁻¹)	Vitamina D ₃ (ng.100 mL ⁻¹)
Integral	Cru	Julho	384,40 ± 137,7 ^{aAab}	3,90 ± 1,14 ^{aAc}
		Maio	66,95 ± 1,82 ^{aAb}	46,39 ± 7,29 ^{aAab}
		Novembro	250,83 ± 4,74 ^{aAa}	35,73 ± 1,58 ^{aAa}
		Setembro	77,11 ± 8,66 ^{aAb}	11,22 ± 1,27 ^{aAbc}
	Pasteurizado	Julho	55,32 ± 4,87 ^{aBab}	11,57 ± 3,90 ^{aBc}
		Maio	33,71 ± 0,20 ^{aBb}	14,57 ± 1,96 ^{aBab}
		Novembro	82,29 ± 17,63 ^{aBa}	12,94 ± 2,30 ^{aBa}
		Setembro	90,07 ± 17,56 ^{aBb}	21,24 ± 1,70 ^{aBbc}
	UHT	Julho	29,97 ± 2,88 ^{aBab}	12,26 ± 1,06 ^{aBc}
		Maio	46,04 ± 3,92 ^{aBb}	58,83 ± 4,87 ^{aBab}
		Novembro	267,89 ± 11,58 ^{aBa}	14,08 ± 2,12 ^{aBa}
		Setembro	83,20 ± 1,40 ^{aBb}	12,70 ± 0,30 ^{aBc}
Semidesnatado	Cru	Julho	61,23 ± 5,03 ^{bAab}	n.q.
		Maio	22,54 ± 0,88 ^{bAb}	38,84 ± 1,87 ^{bAab}
		Novembro	108,45 ± 2,66 ^{bAa}	13,31 ± 0,80 ^{bAa}
		Setembro	22,65 ± 1,40 ^{bAb}	8,48 ± 1,07 ^{bAc}
	Pasteurizado	Julho	18,38 ± 2,36 ^{bBab}	4,89 ± 1,56 ^{bBc}
		Maio	32,12 ± 3,20 ^{bBb}	11,97 ± 0,43 ^{bBab}
		Novembro	54,87 ± 12,86 ^{bBa}	9,38 ± 1,31 ^{bBa}
		Setembro	38,97 ± 12,19 ^{bBb}	10,17 ± 1,34 ^{bBc}
	UHT	Julho	15,22 ± 0,54 ^{bBab}	11,23 ± 0,54 ^{bBc}
		Maio	27,25 ± 3,98 ^{bBb}	12,70 ± 1,48 ^{bBab}
		Novembro	49,78 ± 0,47 ^{bBa}	9,08 ± 0,96 ^{bBa}
		Setembro	20,90 ± 1,23 ^{bBb}	11,88 ± 0,66 ^{bBc}
Desnatado	Cru	Julho	12,44 ± 3,74 ^{bAab}	n.q.
		Maio	n.q.	3,13 ± 1,00 ^{bAab}
		Novembro	20,22 ± 0,02 ^{bAa}	3,37 ± 0,14 ^{bAa}
		Setembro	14,13 ± 0,67 ^{bAb}	3,04 ± 0,68 ^{bAc}

Teor de gordura	Tratamento térmico	Mês de produção	Vitamina D ₂ (ng.100 mL ⁻¹)	Vitamina D ₃ (ng.100 mL ⁻¹)
	Pasteurizado	Julho	15,61 ± 0,70 ^{bBab}	n.q.
		Maio	24,46 ± 2,93 ^{bBb}	1,96 ± 0,77 ^{cBab}
		Novembro	16,67 ± 1,42 ^{bBa}	2,55 ± 0,69 ^{cBa}
		Setembro	29,58 ± 1,63 ^{bBb}	5,95 ± 1,70 ^{cBc}
	UHT	Julho	n.q.	n.q.
		Maio	n.q.	5,03 ± 0,4 ^{cBab}
		Novembro	16,18 ± 2,38 ^{bBa}	2,05 ± 0,60 ^{cBa}
		Setembro	n.q.	n.q.

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao teor de gordura. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao tratamento térmico. Letras minúsculas em itálico diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) relativa ao mês de produção do leite.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

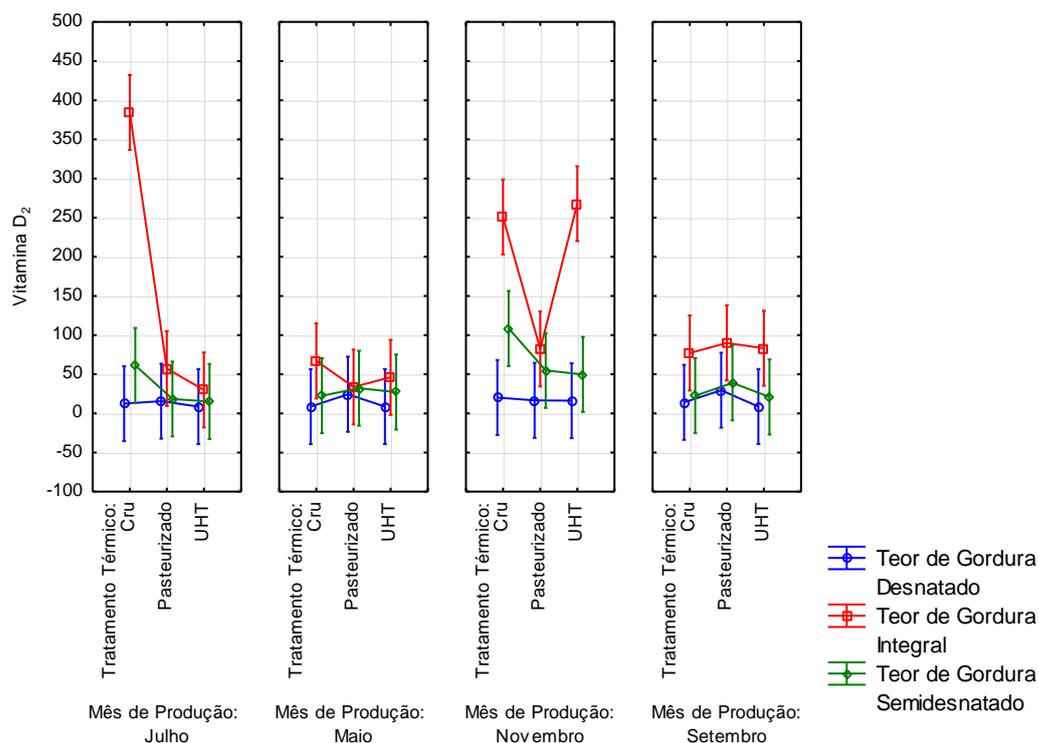
Os resultados descritos na Tabela 11 diferem de alguns encontrados na literatura os quais indicaram que o tratamento térmico não afeta o teor de vitamina D em leites (HANSON; METZGER, 2010). Os tratamentos térmicos podem não afetar significativamente ($p < 0,05$) a composição de leites processados que contêm 2 % de gordura e pasteurização rápida como observado por Wagner *et al.* (2008) e Kasmi, Vieth e Rousseau (2007). Nesse caso, não foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre leites semidesnatado e desnatado, os quais foram enriquecidos com vitamina D e processados por HTST. A variação do teor de vitamina D em leite de vaca cru é maior do que no leite UHT sem enriquecimento (BULGARI *et al.*, 2013). Essa variação pode ser resultado da degradação das vitaminas D com o processo térmico (TSAI *et al.* 2017). A partir de análises de DSC (calorimetria de varredura diferencial), os autores concluíram que os teores de vitaminas D₂ e D₃ podem permanecer inalterados se o processamento de alimentos ou tratamento térmico for realizado em temperaturas menores que 166 e 156 °C, respectivamente (TSAI *et al.*, 2017).

A sazonalidade pode também afetar o teores de vitaminas D₂ e D₃ em amostras de leite. Diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores de vitamina D₂ foram encontradas entre as amostras produzidas em novembro quando comparado com aquelas produzidas em maio e julho. Além disso, o teores de vitamina D₃ foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os leites produzidos em novembro, julho e setembro. De maneira semelhante ao ser humano, podem ser produzidas vitaminas D no

organismo do gado devido a síntese endógena ou dérmica. Além disso, as vitaminas D podem ser ingeridas pelo animal com a dieta alimentar. A vitamina D₃ (colecalfiferol) pode ser produzida pela síntese dérmica após a exposição à radiação UV-B (HYMOLLER; JENSEN, 2010) ou ser ingerida na alimentação. A vitamina D₂ pode ser produzida e entrar nos organismos dos animais após o consumo de fungos que crescem no meio da vegetação (RICHARDSON; LOGENDRA, 1997). A vitamina D₃ pode ser também fornecida ao animal por meio de aditivos sintéticos concentrados na ração (HYMOLLER; JENSEN, 2011). Portanto, diferenças nos teores de vitaminas no leite podem ser originadas das práticas de manejo do gado, da alimentação, das diferentes estações do ano, dentre outros (JAKOBSEN *et al.*, 2015).

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas nos teores de vitaminas D₂ e D₃ em amostras com quantidades de gorduras diferentes. As diferenças foram observadas entre as amostras de leite integral, semidesnatado e desnatado. Os teores de vitaminas A e E em leite bovino cru, pasteurizado e UHT (integral, semidesnatado e desnatado) são afetados pelo teor de gordura (CHOTYAKUL *et al.*, 2014). Esses valores diminuem conforme diminuiu os teores de gorduras. O mesmo efeito pode ser observado no monitoramento das vitaminas D. Os teores de vitamina D₂ foram maiores nas amostras de leite integral do que em leite semidesnatado e/ou desnatado. Esses resultados estão apresentados na Figura 8. Verificou-se também que houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos teores de vitaminas D durante os processamentos térmicos no mês de julho. Essa diferença foi bem mais acentuada no leite cru em comparação aos leites pasteurizados e integrais. As variações foram também acentuadas entre os meses de maio e setembro, considerando os teores de vitamina D₂ em diferentes tratamentos térmicos e teores de gorduras. Em geral, observou-se que no mês de novembro houve um aumento do teor de vitamina D₂ entre a pasteurização e ultrapasteurização. Porém, isso pode ter ocorrido porque a amostra de leite pasteurizado não estava totalmente homogênea na hora do ensaio ou podem ter ocorrido perdas durante o processo ou armazenamento.

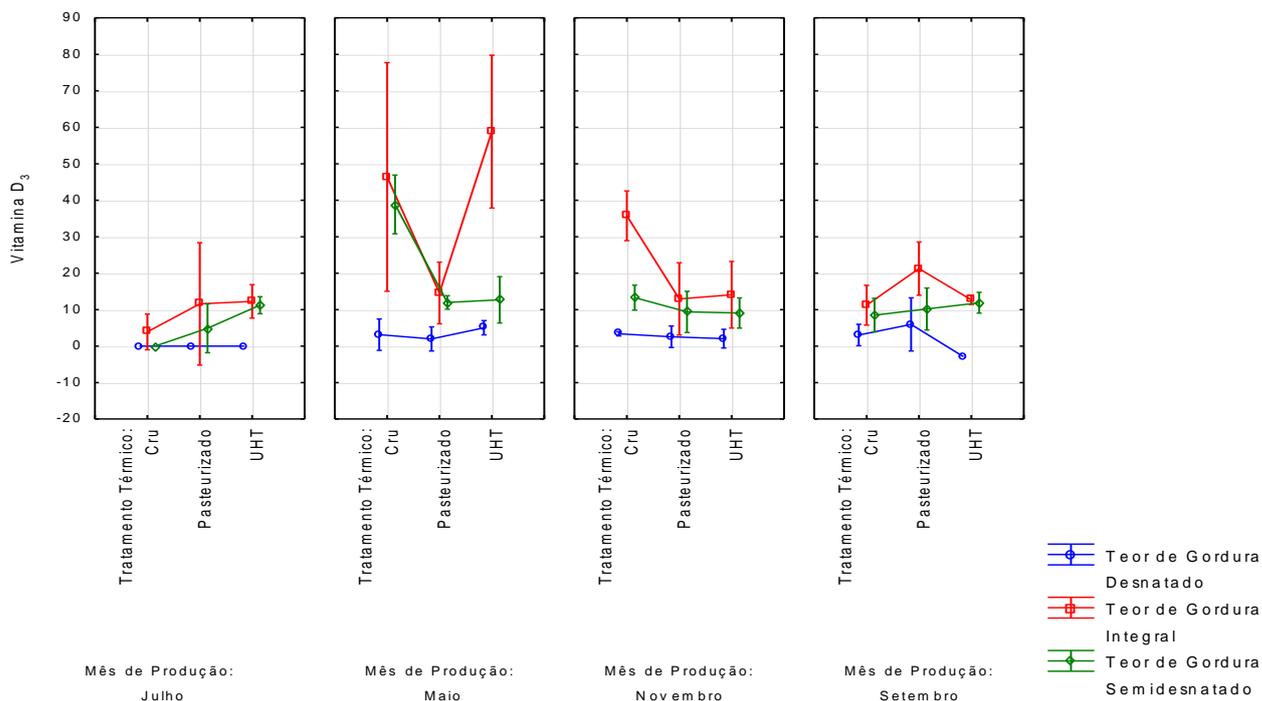
Figura 8 - Teores médios de vitamina D₂ em função do teor de gordura, tratamentos térmicos e meses de produção.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

O teor de vitamina D₃ variou bastante entre os meses de estudo como pode ser observado pela Figura 9. Nota-se que houve variabilidade significativa nos teores de vitaminas entre os meses de produção, com destaque para o mês de novembro. Nesse mês houve diminuição do teor de vitaminas D com o tratamento térmico. Ocorreu variação significativa dos teores de vitaminas em maio entre o leite cru, pasteurizado e UHT. Isso indica que podem ter ocorrido perdas durante os experimentos ou durante o armazenamento da amostra. Os teores de vitamina D₃ no leite semidesnatado em maio e novembro diminuíram com o tratamento térmico. Porém, o teor dessa vitamina não variou significativamente ($p < 0,05$) no desnatado. No geral, os teores de vitamina D₂ nas amostras de leite foram significativamente ($p < 0,05$) maiores do que os teores de vitamina D₃. Essa diferença deve-se ao fato de que as vitaminas são sintetizadas a partir de diferentes fontes, sendo que a vitamina D₂ está mais relacionada a dieta do animal e a vitamina D₃ com a exposição à luz solar. Concluindo, é importante estudar e determinar o teor das vitaminas D₂ e D₃ em alimentos que são amplamente consumidos como o leite e seus derivados.

Figura 9 - Teores médios de vitamina D₃ em função do teor de gordura, tratamentos térmicos e meses de produção.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2019.

4.4 CONCLUSÃO

Nesse estudo foram demonstrados que as vitaminas D não são estáveis com os tratamentos térmicos. Os teores de vitaminas em amostras de leite podem também variar com as estações do ano e com o tipo de alimentação do gado. Isso confirma a perda significativa tanto de vitamina D₂ quanto de vitamina de D₃ durante os ensaios experimentais. Além disso, pode-se definir que o processo de padronização da gordura no leite foi um dos responsáveis pelas perdas de vitaminas em leites semidesnatados e desnatados. Para uma melhor compreensão do comportamento e estabilidade da vitamina D, seriam necessários estudos adicionais em que fosse variado um fator por vez. Por exemplo, coletar a amostra a partir de um único animal, variar a dieta e a exposição à luz solar, ou então, variar somente a estação do ano. Finalmente, foi possível demonstrar que este tema é bastante amplo e ainda é necessário muitos outros estudos para melhorar a compreensão de todos os parâmetros se faz necessário para gerar dados que oportunizem melhorias para os produtores e consumidores de leite e derivados.

5 Considerações finais

Atualmente, a produção de leite no estado de Santa Catarina segue uma trajetória de crescimento acentuado e constante, apresentando taxas superiores às observadas em outros estados do país. A atividade leiteira é uma das mais importantes atividades socioeconômicas do estado, sendo um dos pilares da agricultura familiar.

O leite de vaca é um dos produtos alimentícios mais consumidos e processados em todo o mundo. Sua composição é altamente variável, podendo ser influenciada por vários fatores como a raça, o estágio de lactação, o manejo, a nutrição, o estado de saúde, a variação durante a ordenha do animal, entre outros.

Bilhões de pessoas ao redor do mundo consomem leite e seus produtos lácteos todos os dias. Além de ser uma grande fonte de nutrição humana, esses produtos possuem teores significativos de proteínas com alto valor biológico. Além disso, os leites e seus derivados são meios de subsistência e oportunidades para agricultores, processadores, comerciantes e outros segmentos da cadeia láctea. Os 20 minerais considerados essenciais na dieta humana estão presentes no leite. Além disso, esses tipos de alimentos possuem treze tipos de vitaminas que têm contribuições significativas nos metabolismos do corpo humano. Devido a tantos benefícios que o leite e sua cadeia produtiva podem trazer para determinadas regiões, justifica-se a necessidade de estudos cada vez mais aprofundados na área com o objetivo de entender e melhorar os processos de produção e a qualidade nutricional do produto final.

Os resultados dessa dissertação foram importantes para demonstrar que as estações do ano influenciam nas produções e nas composições do leite. Variações significativas foram encontradas tanto na caracterização físico-química do leite quanto nos teores de vitaminas D₂ e D₃, além de minerais. Informações conflitantes são descritas na literatura, em que muitos defendem não haver influências, enquanto outros afirmam que essas variações ocorrem principalmente devido a dieta do animal. Como se trata de um assunto bastante abrangente e importante, mais estudos são necessários para compreender as fontes de variação dos teores de proteínas, gordura, minerais, vitaminas em amostras de leite bovino.

Para entender bem o comportamento e a estabilidade das vitaminas presentes em amostras de leite pode-se variar o tipo de alimentação do animal, as estações do ano e o teor de gordura em etapas individuais do estudo. Nem sempre é possível encontrar na literatura informações sobre ensaios padronizados para a determinação de vitaminas e

minerais presentes em quantidades pequenas no leite. Com base nos resultados obtidos nessa dissertação, um planejamento fatorial de composto central rotacional (DCCR) pode ser uma excelente alternativa para compreender os efeitos de determinadas variáveis. Além disso, a validação de métodos não padronizados aumenta a confiabilidade dos métodos analíticos.

REFERÊNCIAS

ABREU, Luiz Ronaldo de. **Leite e derivados, caracterização físico-química, qualidade e legislação**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005.

ADAMI, S. *et al.* Linee guida su prevenzione e trattamento dell'ipovitaminosi D con colecalciferolo. **Reumatismo**, v. 63, n. 3, p. 129–147, 2011.

ALLEN, L. *et al.* **Guidelines on Food Fortification With Micronutrients** Who, Fao Un, 2006.

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International, Annex I: **Validation Study Protocols**. p. 1–27, 2011.

AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. 20 ed. Rockville: 2016.

ARAÚJO, P.W.; BRERETON, R.G. Experimental design II. Optimization. **Trends in analytical chemistry**, v. 15, n. 2, 1996.

ASLAN, N. Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling and optimization of a multi-gravity separator for chromite concentration. **Powder Technology**, v. 185, n. 1, p. 80-86, 2008.

ATARO, A. *et al.* Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). v. 111, p. 243–248, 2008.

BAKIRCIOGLU, D.; KURTULUS, Y. B.; UCAR, G. Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 202–207, 2011.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A. Determination of vitamins E (α -, γ - and δ -tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 5, p. 829–836, 2011.

BARRAL, D.; BARROS, A. C.; ARAÚJO, R. P. C. DE. Vitamina D : Uma Abordagem Molecular Vitamin D : **A Molecular Approach**. v. 7, n. 3, p. 309–315, 2007.

BARROS NETO, B. *et al.*, **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas, SP: Unicamp, 1995.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª ed. Campinas: Bookman, 2003.

BARTLETT, B. Y. S. *et al.* 196 . The influence of various fodder supplements on the production and the nutritive value of winter milk. **Fodder Supplements and Nutritive Value of Milk**. 1938.

BAŞ, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of food engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.

BATTAULT, S. *et al.* Vitamin D metabolism , functions and needs : from science to health claims. **European Journal of Nutrition**, v. 25, p. 429–441, 2013.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13o ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1984. 320p.

BENDER, A. E. The effects of processing on the stability of vitamins in foods BT - The Importance of Vitamins to Human Health: Proceedings of the IV Kellogg Nutrition Symposium held at the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, London, on 14–15 December, 1. In: **TAYLOR, T. G.** (Ed.). . Dordrecht: Springer Netherlands, 1979. p. 111–125.

BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BISHOP-MACDONALD, H.; FARMERS, D. Dairy Food Consumption and Health : State of the Dietary Protein : An **Essential Nutrient For Bone Health**. v. 24, n. 6, p. 525–591, 2005.

BLANCO, D.; FERNÁNDEZ, M. P.; GUTIÉRREZ, M. D. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column. **Analyst**, v. 125, n. 3, p. 427–431, 2000.

BONDAN, C. *et al.* Milk composition of Holstein cows : a retrospective study. **Ciência Rural**, vol. 48, n.12, p. 1-8, 2018.

BOX, G. EP; HUNTER, J. S. Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. **The Annals of Mathematical Statistics**, p. 195-241, 1957.

BRANDAO, G. C.; MATOS, G. D.; FERREIRA, S. L. C. Slurry sampling and high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry using secondary lines for the determination of Ca and Mg in dairy products. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 2, p. 231–233, 2011.

BRASIL. Instrução Normativa nº. 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A, na forma desta Instrução Normativa e do Anexo Único. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. nº 172, Seção 1, p. 19.700 , 1997.

BRASIL. Instrução Normativa n°. 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 dez. 2006, Seção 1, p. 8. 2006.

BRITO, M.A. *et al.* Agronegócio do leite. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasília, DF. Maio, 2007. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 01/06/2019.

BULGARI, O. *et al.* Variation of Vitamin D in Cow's Milk and Interaction with β -Lactoglobulin. p. 10122–10131, 2013.

CASHMAN, K. D. Milk minerals (including trace elements) and bone health. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1389–1398, 2006.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p. 434-439, 2010.

CHEN, T. C. *et al.* Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. **Arch Biochem Biophys**, v. 460 (2), p. 213–217, 2007.

CHOTYAKUL, N. *et al.* Simultaneous HPLC – DAD quantification of vitamins A and E content in raw , pasteurized , and UHT cow ' s milk and their changes during storage. **European Food Research and Technology**, v. 238 (4), p. 535–547, 2014.

DEPETERS, E. J.; CANT, J. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: **A Review. Journal Dairy Science**, v. 75, 2043-2070 p. 1992.

DERVISOGLU, M. *et al.* Toxic and essential elements in butter from the Black. **Food Additives & Contaminants: Part B**, p. 37–41, 2014.

DUNSHEA, F. R. *et al.* Mineral and Citrate Concentrations in Milk Are Affected by Seasons , Stage of Lactation and Management Practices. **Agriculture**, p. 17, 2019.

EPAGRI/CEPA. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola. Estado de Santa Catarina. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2016-2017. v. 1. Florianópolis: Epagri/Cepa. 2017.

Disponível em: < http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/publicacoes/Sintese-Anual-da-Agricultura-SC_2016_17.pdf>. Acesso em: 20/05/2019.

FAO. Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura - Leite e produtos lácteos na nutrição humana. Brasil, maio de 2014. Disponível em: <https://www.g100.org.br/site/images/LIVROS/leite_produtos_Lacteos%20nutrio_humana_protegido.pdf> . Acesso em: 01/06/2019.

FLYNN, A. Minerals and Trace Elements in Milk. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 36, p. 209–252, 1992.

FONTANELI R. S., SANTOS H.P. & FONTANELI R. S. **Forrageiras para integração lavoura-pecuária-floresta na região sul-brasileira**. Passo Fundo: Embrapa Trigo. 2009. 340p.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry. **Dairy Chemistry and Biochemistry**, v. 1542, n. 9, p. 478, 1998.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction, nutrition, development**, v. 44, n. 6, p. 89–98, 2004.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences**. v. 45, n. 4, p. 473–483, 2005.

GILL, B. D.; ZHU, X.; INDYK, H. E. A Rapid Method for the Determination of Vitamin D₃ in Milk and Infant Formula by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 2, p. 431–435, 2015.

GILL, B. D.; ZHU, X.; INDYK, H. E. The determination of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in early lactation and seasonal bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 63, p. 29–34, 2016.

GOMES, F. P. et al. Recent trends in the determination of vitamin D. **Bioanalysis**, v. 5, n. 24, p. 3063–3078, 2013.

GOMES, F. P. et al. Simultaneous quantitative analysis of eight vitamin D analogues in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 891, p. 211–220, 2015.

GOMIS, D. B.; FERNÁNDEZ, M. P.; GUTIÉRREZ ALVAREZ, M. D. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 891, n. 1, p. 109–114, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. N.; FONTANELI, R. S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 5-21.

GRIINARI, J.M.; BAUMAN, D.E.; CASTAÑEDA-GUTIÉRREZ, E. Novos conceitos relacionados á manipulação da gordura do leite. In: DÜRR, J.W.; CARVALHO, M.P. ; SANTOS, M.V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. p.210-234.

HANSON, A. L.; METZGER, L. E. Evaluation of Increased Vitamin D Fortification in Milk , UHT-Processed 2 % Fat Chocolate Milk , and Low-Fat Strawberry Yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 801–807, 2010.

HECK, J. L. *et al.* Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4745–4755, 2009.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance for musculoskeletal function and health, in: I. Kohlstadt (Ed.), *Scientific Evidence for Musculoskeletal, Bariatric, and Sports Nutrition*, Ch. 10, **Taylor & Francis**, Boca Raton, 2006, pp. 153–174.

HOLICK, M. F. *et al.* Vitamin D₂ is as effective as vitamin D₃ in maintaining circulating concentrations of 25-Hydroxyvitamin D. **J. Clin. Endocrinol Metab.**, v. 25, n. 3, p. 677–681, 2008.

HYMOLLER, L.; JENSEN, S. K. Stability in the rumen and effect on plasma status of single oral doses of vitamin D and vitamin e in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5748–5757, 2010.

HYMOLLER, L.; JENSEN, S. K. Vitamin D 2 impairs utilization of vitamin D 3 in high-yielding dairy cows in a cross-over supplementation regimen. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3462–3466, 2011.

HURLEY W. L. 1999 a. Lactose synthesis. *Lactation Biology*. Department of Animal Sciences. University of Illinois. Disponível em <<http://classes.aces.uine.edu/AnSei308/lactosesynthesis.html>>. Acesso em: 01/06/19.

HURLEY W. L. 1999 b. Minerals and vitamins. *Lactation Biology*. Department of Animal Sciences. University of Illinois. Disponível em <<http://classes.aces.uine.edu/AnSei308/mineralandvitamin.html>>. Acesso em: 01/06/19

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção da pecuária municipal*, Rio de Janeiro, v. 44, p. 1-51. 2018.

JAKOBSEN, J.; SAXHOLT, E. Vitamin D metabolites in bovine milk and butter. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 5, p. 472–478, 2009.

JAKOBSEN, J. *et al.* Short communication: artificial ultraviolet B light exposure increases vitamin D levels in cow plasma and milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6492–6498, 2015.

JENSEN, R. G. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 295–350, 2002.

JENKINS, T. C. *et al.* Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 397–412, 2008.

JIAO, Z. *et al.* Determination of Trace Vitamin D in Milk Samples by Graphene-Based Magnetic Solid-Phase Extraction Method Coupled with HPLC. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 3, p. 820–826, 2017.

JOCHIMS, F.; DORIGON, C; PONTES, V. M. O leite para o Oeste Catarinense. **Agropecuária Catarinense**, v.29, n.3, p. 1-4, 2016.

KASALOVÁ, E. *et al.* Recent trends in the analysis of vitamin D and its metabolites in milk - A review. **Food Chemistry**, v. 171, p. 177–190, 2015.

KASMI, S. A.; VIETH, R.; ROUSSEAU, D. Vitamin D₃ fortification and quantification in processed dairy products. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 753–759, 2007.

KOLETZKO, B. *et al.* 1. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), **Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR)**. v. 3336, n. November, p. 1–4, 2005.

KWAK, B. M. *et al.* Rapid determination of vitamin D₃ in milk-based infant formulas by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 165, p. 569–574, 2014.

LARSON, B. L. Ed. Lactation. Ames, Iowa State University Press, Ames, 267 p. 1985

LAMBERTZ, C.; SANKER, C. Climatic effects on milk production traits and somatic cell score in lactating Holstein-Friesian cows in different housing systems. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 319–329, 2014.

LINDMARK-MÅNSSON, H.; FONDÉN, R.; PETTERSSON, H. E. Composition of Swedish dairy milk. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 409–425, 2003.

LUQUE DE CASTRO, M. *et al.* Determination of vitamin D₃ metabolites: state-of-the-art and trends. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, n. 1–2, p. 1–17, jun. 1999.

MEPHAN T B, GAYE P, MARTIN P, MERCIER J C. Biosynthesis of milk protein. In: Fox, P.F. (Ed.). **Advanced dairy chemistry – Proteins**. London, Elsevier Applied Science. 1992. v.1, 457-491 p.

MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; COELHO, K.O. A qualidade do leite na região Centro-Oeste. In: MESQUITA, A.J., DÜRR, J.W., COELHO, K.O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento. 2006. 352p.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Solvent extraction. In: MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. Sample preparation in chromatography. **J. Chromatogr.**, Cap 10, p. 287-340, 2002.

NANTAPO, C. T. W.; MUCHENJE, V. Winter and spring variation in daily milk yield and mineral composition of Jersey, Friesian cows and their crosses under a pasture-based dairy system. **South African Journal of Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 17–22, 2013.

NESTOLA, M.; THELLMANN, A. Determination of vitamins D₂ and D₃ in selected food matrices by online high-performance liquid chromatography-gas chromatography-mass spectrometry (HPLC-GC-MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 1, p. 297–308, 2015.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: Fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 2, 2008.

NORO, G. Síntese e secreção do leite. **Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal**, n. Vet 00036, p. 1–21, 2001.

NORO, G. *et al.* Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. Effects of environmental factors on milk yield and composition of dairy herds assisted by cooperatives in Rio Grande do Sul, **Revista Brasileira de Zootecnia Brazil**. 2006.

PERALES, S. *et al.* Review: Determination of Vitamin D in Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography. **Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 11, n. 6, p. 451–462, 2005 a.

PERALES, S. *et al.* Liquid chromatographic determination of Vitamin D3 in infant formulas and fortified milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 543, n. 1–2, p. 58–63, 2005 b.

PROGRESS, M.; HOLICK, M. F. Vitamin D Deficiency. **The New England journal of medicine**, p. 266–281, 2008.

PINHEIRO, A. J. R.; MOSQUIM, M. C. A. V. Apostila: Processamento de leite de consumo. Dep. Tecnologia de Alimentos. UFV: Viçosa, 1991.

RIBEIRO NETO, A.C.; BARBOSA, S.B.P.; JATOBÁ, R.B. Presença de Células Somáticas em Leite de Tanques no Estado de Pernambuco. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Salvador, 47., 2010. Salvador: UFBA, 2010, 3p.

RICHARDSON, M. D.; LOGENDRA, S. Ergosterol as an Indicator of Endophyte Biomass in Grass Seeds. **Neotyphodium/Grass Interactions**: New York, p. 267-270, 1997.

RODRÍGUEZ, E. M.; ALAEJOS, M. S.; ROMERO, C. D. H. Mineral Concentrations in Cow ' s Milk from the Canary Island. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 4, p. 419–430, 2001.

SOLA-LARRAÑAGA, C.; NAVARRO-BLASCO, I. Chemometric analysis of minerals and trace elements in raw cow milk from the community of Navarra , Spain. **Food Chemistry**, v. 112, p. 189–196, 2009.

SOUZA, A. S. **Leite: Importância, Síntese e Manipulação da Composição**. Dissertação (Dissertação em Zootecnia) - UFV. Viçosa - MG, p. 24. 2015.

SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 15, Juiz de fora, 2000. **Anais do XV Congresso nacional de laticínios**. Juiz de Fora: EPAMIG- Centro Tecnológico – ILTC, 2000. 500p. p. 157-163.

THALER NETO, A. Melhoria genética aplicado à produção do leite. In: SIMPÓSIO DE BOVINOCULTURA DE LEITE, 2. Chapecó - SC. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários, p. 143-161. 2006.

TARAKCI, Z.; KUCUKONER, E. Original article Comparison of basic nutrients , mineral and heavy metal contents of herby dairy products. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 216–219, 2008.

TANGPRICHA, V. Vitamin D in food and supplements 1 , 2. **Am J Clin Nutr**, v. 95, n. July, p. 1299–1300, 2012.

TEÓFILO, R.F., FERREIRA, M.M.C. “Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial”. **Química Nova**, vol. 29, n.2, p.338-350, 2006.

TRONCO, V. M. **Manual de Inspeção da Qualidade do Leite**. 4ª ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2010.

TSAI, S. *et al.* Evaluation of preliminary causes for vitamin D series degradation via DSC and HPLC analyses. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, n. 3, p. 1357–1369, 2017.

UNION, I. *et al.* QUALITY ASSURANCE SCHEMES FOR ANALYTICAL LABORATORIES * HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE- LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS (IUPAC Technical Report) **Harmonized guidelines for single-laboratory** (IUPAC Technical Report). v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

VEGARUD, G. E.; LANGSRUD, T.; SVENNING, C. Mineral-binding milk proteins and peptides ; occurrence , biochemical and technological characteristics. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p 91-98, 2000.

VEISSEYRE, R. Lactologia técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. 2º ed. Zaragoza: Acribia, p. 629, 1988.

VIETH, R.; CHAN, P. R.; MACFARLANE, G. D. Efficacy and safety of vitamin D 3 intake exceeding the lowest observed adverse effect level. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 73, p. 288–294, 2001.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Food Science and Technology**. Second ed. [s.l.] Taylor & Francis Group, 2006.

WACKER, M.; HOLICK, M. F. Vitamin D—Effects on Skeletal and Extraskelatal Health and the Need for Supplementation. **Nutrients**, v. 5, p. 111–148, 2013.

WAGNER, D. *et al.* Vitamin D 3 Fortification , Quantification , and Long-Term Stability in Cheddar and Low-Fat. **J. Agric. Food Chem**, v. 56, n. 17, p. 7964–7969, 2008.

WEBB, A. R. *et al.* An evaluation of the relative contributions of exposure sunlight and of diet to the circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D in an elderly nursing home population in Boston. **Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 1075-1081, 1990.

WEIR, R. R. *et al.* Environmental and genetic factors influence the vitamin D content of cows' milk. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 76, n. 01, p. 76–82, 2017.

ZAMBERLIN, Š. *et al.* Mineral elements in milk and dairy products. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, p. 111–125, 2012.

Z.GULER. Levels of 24 minerals in local goat milk , its strained yoghurt and salted yoghurt (tuzlu yo ğurt). **Small Ruminant Research** 71, v. 71, p. 130–137, 2007.

