

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

RENATA LUANA DE PÁDUA GANDRA

**PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA O
ESCOPO UMIDADE, CINZAS, GORDURA TOTAL E ACIDEZ
TITULÁVEL EM LEITE EM PÓ INTEGRAL**

Belo Horizonte, MG
2013

RENATA LUANA DE PÁDUA GANDRA

**PRODUÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA O
ESCOPO UMIDADE, CINZAS, GORDURA TOTAL E ACIDEZ
TITULÁVEL EM LEITE EM PÓ INTEGRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Scheilla Vitorino Carvalho de Souza

Co-orientadora: Renata Adriana Labanca

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Belo Horizonte, MG
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

[A ser substituída pela versão definitiva após a defesa, no momento da reprodução e encadernação. Será fornecida pela Secretaria do Programa.]

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento deste projeto e pelo apoio à Tecnologia Industrial Básica e consolidação de laboratórios metrológicos no estado de Minas Gerais.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO-MG) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pelas orientações sobre as metodologias e treinamento dos analistas.

A Cooperativa Central de Produtores de Leite Itambé (CCPR Itambé) pelo fornecimento do leite em pó.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Biblioteca da FAFAR e Secretaria do PPGCA pela assistência nas pesquisas bibliográficas e resolução de questões administrativas.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À professora Scheilla Vitorino Carvalho de Souza, pela orientação, ensinamentos, dedicação, confiança e amizade.

À professora Renata Adriana Labanca pela co-orientação, apoio e presteza.

Ao professor Roberto Gonçalves Junqueira por toda a colaboração e disponibilidade, principalmente na análise estatística.

Aos membros da banca examinadora professoras Dra. Mônica Pinho Cerqueira e Dra. Maria Aparecida Vieira Teixeira Garcia pelas importantes considerações que muito contribuíram para a qualidade deste trabalho.

Ao Pedro Paulo Borges dos Santos e Ana Luiza Soares dos Santos, alunos de iniciação científica mais que especiais, pela disposição, dedicação, responsabilidade e amizade.

À Ronália Leite Alvarenga, funcionária do Laboratório de Bromatologia, pela ajuda e boa vontade durante as análises e por ter me dado todo o suporte necessário dentro do laboratório.

Ao Marcos da Costa Lage - Marcão, funcionário do Laboratório de Bromatologia, pela disponibilidade e auxílio.

À Ázula, Carina, Carol, Cíntia e Fernanda pelo incentivo e companheirismo.

À Renata França, pelos conselhos e ajuda imprescindíveis na análise estatística.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pelos ensinamentos e pela agradável convivência.

Aos meus pais e irmãos por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Às minhas queridas amigas Mariana, Fernanda, Shaila, Aline, Juliana e Marcela pela força e amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS	16
RESUMO.....	19
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 LEITE - FLUIDO E EM PÃO	26
3.1.1 Definições e qualidade.....	26
3.1.2 Aspectos nutricionais.....	31
3.1.3 Aspectos econmicos.....	44
3.1.4 Métodos de análise para avaliação do PIQ	46
3.1.5 Estudos de embalagens para estabilidade de leite em pão.....	53
3.2 MATERIAIS DE REFERÊNCIA	58
3.2.1 Sistemas de gestão de qualidade em laboratórios (SGQ).....	58
3.2.2 Definições e aplicações	60

3.2.3 Disponibilidade - matrizes alimentares e leite em pó	62
3.2.4 Produção, avaliação e uso de MR	67
3.2.4.1 Homogeneidade	68
3.2.4.2 Estabilidade	72
3.2.4.3 Caracterização de um MRC.....	76
4. MATERIAL E MÉTODOS	78
4.1 EQUIPAMENTOS	78
4.2 MATERIAIS	78
4.3 REAGENTES	79
4.4 AMOSTRAS	80
4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO LABORATÓRIO	81
4.6 PRODUÇÃO DOS MATERIAIS.....	82
4.6.1 Preparo dos materiais.....	82
4.6.2 Testes de homogeneidade	83
4.6.3 Testes de estabilidade	84
4.7 MÉTODOS DE ENSAIO	86
4.7.1 Umidade	86
4.7.1.1. Preparo das cápsulas	86
4.7.1.2. Ensaio.....	86
4.7.1.3 Cálculos.....	87
4.7.2 Cinzas.....	87

4.7.2.1 Preparo dos cadinhos	88
4.7.2.2 Ensaio	88
4.7.2.3 Cálculos	88
4.7.3 Gordura total	89
4.7.3.1 Preparo da amostra	89
4.7.3.2 Preparo dos béquers	89
4.7.3.3 Ensaio	89
4.7.3.4 Cálculos	90
4.7.4 Acidez titulável	91
4.7.4.1 Padronização da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L	91
4.7.4.2 Preparo da amostra	91
4.7.4.3 Ensaio	92
4.7.4.4 Cálculos	92
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
5.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO LABORATÓRIO	93
5.2 PRODUÇÃO DOS MATERIAIS	94
5.2.1 Homogeneidade	94
5.2.2 Estabilidade	99
5.2.3 Incerteza da homogeneidade e estabilidade	127
6. CONCLUSÃO	130
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de qualidade estabelecidos para o leite em pó.....	29
Tabela 2. Parâmetros de qualidade adicionais estabelecidos para leite em pó instantâneo.....	29
Tabela 3. Carboidratos do leite fluido integral.....	32
Tabela 4. Composição de aminoácidos essenciais no leite fluido integral com 3,25 % de gordura.....	34
Tabela 5. Composição lipídica do leite fluido integral.	35
Tabela 6. Perfil de ácidos graxos no leite fluido integral com 3,25 % de gordura.	36
Tabela 7. Teor das principais vitaminas encontradas no leite fluido integral com 3,25 % de gordura.....	38
Tabela 8. Teor dos principais minerais encontrados no leite fluido integral com 3,25 % de gordura.....	41
Tabela 9. Composição nutricional do leite em pó integral.....	42
Tabela 10. Métodos analíticos para avaliação de parâmetros do PIQ do leite em pó citados na legislação brasileira e publicados por organismos de normalização internacionais.	51
Tabela 11. Materiais de referência para a matriz leite em pó de provedores internacionais.....	65
Tabela 12. Análise da variância para regressão linear.....	75
Tabela 13. Avaliação do desempenho do laboratório para ensaios de determinação de cinzas e gordura empregando material de referência certificado do <i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>	94

Tabela 14. Avaliação da homogeneidade do lote 1 do material, embalado em sachês tipo <i>stand-up pouch</i> de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade, segundo critérios da norma ISO 13528.....	96
Tabela 15. Avaliação da homogeneidade do lote 1 do material, embalado em sachês tipo <i>stand-up pouch</i> de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade, segundo critérios do protocolo harmonizado pela IUPAC.....	96
Tabela 16. Avaliação da homogeneidade do lote 2 do material, embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca, segundo critérios da norma ISO 13528.....	97
Tabela 17. Avaliação da homogeneidade do lote 2 do material, embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca, segundo critérios do protocolo harmonizado pela IUPAC.....	97
Tabela 18. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em sachês tipo <i>stand-up pouch</i> de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado a temperatura ambiente (MR1), segundo critérios da norma ISO Guia 35.....	102
Tabela 19. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em sachês tipo <i>stand-up pouch</i> de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob congelamento (MR2), segundo critérios da norma ISO Guia 35.....	103
Tabela 20. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em sachês tipo <i>stand-up pouch</i> de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob refrigeração (MR3), segundo critérios da norma ISO Guia 35.....	104
Tabela 21. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado a temperatura ambiente (MR4), segundo critérios da norma ISO Guia 35.....	105

Tabela 22. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob congelamento (MR5), segundo critérios da norma ISO Guia 35.....	106
Tabela 23. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob refrigeração (MR6), para os parâmetros do escopo, segundo critérios da norma ISO Guia 5.....	107
Tabela 24. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo <i>stand-up pouch</i> de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade (PET metalizado/PEBD) armazenado a temperatura ambiente (MR1), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528.....	117
Tabela 25. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo <i>stand-up pouch</i> de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade (PET metalizado/PEBD) armazenado sob congelamento (MR2), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528.....	117
Tabela 26. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo <i>stand-up pouch</i> de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade (PET metalizado/PEBD) armazenado sob refrigeração (MR3), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528.....	118
Tabela 27. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado a temperatura ambiente (MR4), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528.....	118
Tabela 28. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob congelamento (MR5),	

para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528119

Tabela 29. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob refrigeração (MR6), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528.....119

Tabela 30. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade (PET metalizado/PEBD) armazenado a temperatura ambiente (MR1), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC.....121

Tabela 31. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade (PET metalizado/PEBD) armazenado sob congelamento (MR2), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC.....121

Tabela 32. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade (PET metalizado/PEBD) armazenado sob refrigeração (MR3), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC.....122

Tabela 33. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado a temperatura ambiente (MR4), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC.....122

Tabela 34. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob congelamento (MR5), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC.....123

Tabela 35. Avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob refrigeração (MR6), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC.....123

Tabela 36. Fontes de contribuição para certificação: incertezas-padrão do teste de homogeneidade e estabilidade a longo prazo dos materiais de referência embalados em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade, para os parâmetros cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35128

Tabela 37. Fontes de contribuição para certificação: incertezas-padrão do teste de homogeneidade e estabilidade a longo prazo dos materiais de referência embalados em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca, para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.....128

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas características da produção de um MRC68
- Figura 2.** Fluxograma das etapas e condições de preparo da amostra de leite em pó integral na indústria81
- Figura 3.** Fluxograma das etapas e condições de preparo dos materiais de referência.....83
- Figura 4.** Delineamento experimental para testes de homogeneidade dos lotes produzidos.....84
- Figura 5.** Delineamento experimental para testes de estabilidade dos materiais de referência (MR) produzidos85
- Figura 6.** Materiais de referência de leite em pó integral acondicionados em sachês tipo *stand-up pouch* de 100 g de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade com zíper e selados e em frascos de vidro âmbar de 100 g com tampa de rosca.....95
- Figura 7.** Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado a temperatura ambiente (MR1), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.....110
- Figura 8.** Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob congelamento (MR2), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.....111
- Figura 9.** Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob

refrigeração (MR3), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.....112

Figura 10. Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado a temperatura ambiente (MR4), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.....113

Figura 11. Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob congelamento (MR5), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.....114

Figura 12. Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob refrigeração (MR6), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.....115

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

Aa	Atividade de água
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AI	Ingestão adequada
AL	Alumínio
ALA	Alfa-lactoalbumina
ALM	Departamento de Alimentos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BLG	Beta-lactoglobulina
BOPP	Polipropileno Biorientado
BPL	Boas Práticas de Laboratórios
BRO-UPAA	Laboratório de Bromatologia - Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos
BSA	Albumina do soro bovino
CCPR	Cooperativa Central de Produtores de Leite Ltda.
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CCS	Contagem de células somáticas
CLA	Ácido linoléico conjugado
DTA	Doenças transmissíveis por alimentos
EVA	Etileno Acetato de Vinila
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FAD	<i>Flavina Adenina Dinucleotídeo</i>
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FAPAS	<i>Food Analysis Performance Assessment Scheme</i>
FIL	<i>Fédération Internationale de Laiterie</i>
GQ	Gestão de Qualidade
GMP	Glicomacropéptídeos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	<i>International Dairy Federation</i>

IDR	Ingestão Diária Recomendada
Ig	Imunoglobulinas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
ISO	<i>International Standards Organization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JRC/EC	<i>Joint Research Centre/ European Commission</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MR	Material de Referência
MRC	Material de Referência Certificado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NMP	Número mais provável
OPA	Poliamida Orientada
PCB	Bifenil policlorados
PEAD	Poliétileno de Alta Densidade
PEBD	Poliétileno de Baixa Densidade
PEBDL	Poliétileno de Baixa Densidade Linear
PET	Politereftalato de Etileno
PETmetAB	Politereftalato de Etileno Metalizado de Alta Barreira
PEUAPM	Poliétileno de Ultra Alto Peso Molecular
PEUBD	Poliétileno de Ultra Baixa Densidade
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
PP	Polipropileno
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
PVDC	Policloreto de Vinilideno
PVR	Pressão de vapor relativa
SI	Sistema Internacional de Unidades
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
SNG	Sólidos não gordurosos
TRAM	Teste de redução do azul de metileno
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

UR

Umidade Relativa

RESUMO

Considerando a importância dos materiais de referência (MR) na estruturação e manutenção de sistemas de gestão da qualidade de laboratórios de análises de alimentos, representando uma ferramenta fundamental na garantia da confiabilidade e rastreabilidade dos resultados analíticos relativos à avaliação de padrões de identidade e qualidade, MR foram produzidos, experimentalmente, para o escopo de determinação de umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável em leite em pó integral. Dois tipos de embalagem (sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade e frascos de vidro âmbar com tampa de rosca) e três temperaturas de armazenamento (ambiente, refrigeração e congelamento) foram avaliados. Os lotes produzidos foram considerados homogêneos. Os materiais acondicionados nos sachês, nas diferentes temperaturas avaliadas, e os materiais acondicionados em frascos de vidro, armazenados sob temperatura ambiente, não apresentaram estabilidade para o parâmetro umidade. Contudo, para os parâmetros cinzas, gordura e acidez titulável, todos os materiais foram considerados estáveis durante seis meses. Os testes de homogeneidade e de estabilidade foram conduzidos conforme estabelecido no protocolo harmonizado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry*, ISO Guia 35 e norma ISO 13528, havendo concordância entre os resultados obtidos, apesar dos diferentes critérios. As contribuições das variâncias devidas à homogeneidade e estabilidade a longo prazo foram estimadas para certificação dos materiais.

Palavras-chave: leite em pó, material de referência, controle de qualidade analítico, padrões de identidade e qualidade, veracidade.

ABSTRACT

Considering the importance of the reference materials (RM) in the structuring and maintenance of quality management systems for food analysis laboratories, representing a fundamental tool to ensure the reliability and traceability of analytical results, RM were experimentally produced for the scope moisture, ash, total fat and titratable acidity in whole milk powder bovine. Two types of packaging (sachets stand-up pouch metallized polyethylene terephthalate / low density polyethylene and amber glass bottles with a screw cap) and three storage temperatures (ambient, refrigeration and freezing) were evaluated. The batches produced were homogeneous. The materials packed in sachets, evaluated at different temperatures, and materials packaged in amber glass bottles, stored at room temperature showed no stability for the parameter moisture. However, for the parameters ash, total fat and titratable acidity, all materials were considered stable for six months. The tests of homogeneity and stability were conducted in accordance with the protocol harmonized by International Union of Pure and Applied Chemistry, ISO Guide 35 and ISO 13528, with concordance between the results, despite the different criteria. The contribution of variances due to the homogeneity and stability were estimated for the materials certification.

Keywords: powder milk, reference material, analytical quality control, standards of identity and quality, trueness.

1. INTRODUÇÃO

O leite é definido como uma mistura complexa, composta por várias substâncias, como água, proteínas, gorduras, carboidratos, minerais e vitaminas, constituindo-se um alimento completo (HAUG *et al.*, 2007).

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), em 2011, a produção mundial de leite foi estimada em 727 milhões de toneladas, sendo 606 milhões de toneladas de leite bovino (FAO, 2013).

O Brasil produziu 32,1 milhões de toneladas de leite bovino em 2011, sendo o quarto maior produtor mundial, após Estados Unidos, Índia e China (FAO, 2013). Os estados maiores produtores no país são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Santa Catarina (IBGE, 2012).

No Brasil, o setor de laticínios só ganhou importância e porte industrial na passagem para o século 20. O aproveitamento de leite e a produção de seus derivados permaneceram, durante mais de três séculos, como atividade artesanal e doméstica nas fazendas. Mais tarde, com a modernização do setor leiteiro, foram necessárias a padronização do leite comercializado no país e a unificação dos sistemas de controle. Tanto o leite como seus derivados estão sujeitos à inspeção dos órgãos ligados à Agricultura (Federal, Estadual ou Municipal) (ALMEIDA-MURADIAN & PENTEADO, 2007).

Com a Instrução Normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002, que aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, tipo B, tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, foi proibido o consumo e a comercialização de leite *in natura* no Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2002).

Devido à alta perecibilidade do leite, além de questões de entressafra e custos de transporte e distribuição, a produção do leite em pó é de fundamental importância para garantir o armazenamento e viabilizar a logística de suprimento de leite no país (CAMPOS *et al.*, 1998).

Conforme as Portarias Nº 146 de 07 de março de 1996 e 369 de 4 de setembro de 1997, que aprovam o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do leite em pó, entende-se por leite em pó o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados. Nestas portarias são estabelecidos os parâmetros do PIQ e respectivos métodos de análise (MAPA, 1996; MAPA, 1997). O PIQ de um alimento é de extrema importância para o consumidor e para o fabricante. Havendo um PIQ, a fraude torna-se, pelo menos teoricamente, mais difícil. O PIQ compreende máximos e mínimos ou faixas de determinados índices, sendo praticamente impossível estabelecer um valor exato, devido às variações naturais de composição que tem o alimento. Normalmente, os índices do PIQ envolvem medidas de baixo custo, pois caso contrário, inviabilizariam o custo final do produto (GOMES, 2007).

A rotulagem dos alimentos, ao orientar o consumidor sobre a qualidade e a quantidade dos constituintes nutricionais dos produtos, pode promover escolhas alimentares apropriadas, sendo indispensável, no entanto, a fidedignidade das informações. Entretanto, o acesso à informação correta sobre o conteúdo dos alimentos, por ser um elemento que impacta a adoção de práticas alimentares e de estilos de vida saudáveis, configura-se, em seu conjunto, uma questão de segurança alimentar e nutricional (CÂMARA *et al.*, 2008).

Assim, informações erradas no rótulo podem prejudicar à saúde do consumidor e desestruturar a confiança dos consumidores e profissionais da área da saúde, os quais adotam o rótulo como uma referência para montagem de dietas e instruções de alimentação para seus pacientes. Tão importante quanto fornecer as informações nutricionais regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na rotulagem, é expressar corretamente os teores dos constituintes declarados. Neste sentido, para avaliação de conformidade de produtos em relação à rotulagem é admitida uma variação de vinte por cento entre os resultados analíticos e aos valores declarados no rótulo (ANVISA, 2003 a).

Desta forma, estudos relativos à verificação do PIQ e da composição nutricional dos alimentos são de extrema importância para ações de fiscalização e controle de qualidade na cadeia produtiva do leite. No entanto, tais ações dependem crucialmente da confiabilidade de resultados analíticos. Tanto na validação de

métodos quanto na estruturação de procedimentos de controle de qualidade analítico são necessários elementos de referência que assegurem a rastreabilidade das grandezas básicas relevantes (ABNT, 2000), como os Materiais de Referência (MR) ou Materiais de Referência Certificados (MRC) (ABNT, 2011).

Segundo o guia harmonizado pela *AOAC International*, *International Standards Organization* (ISO) e *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) para validação intralaboratorial de métodos, os valores de referência necessários para a realização de experimentos de veracidade podem ser obtidos com diferentes tipos de materiais, incluindo MR e MRC (THOMPSON *et al.*, 2002). Conforme descrito neste documento, os MRC podem ser utilizados em processos de validação, visando estabelecer todos os aspectos de tendência (do método, do laboratório e do ensaio), simultaneamente, assumindo que não haja efeitos de variações de matriz. Já os MR seriam utilizados quando um MRC não for disponível ou como adicional aos estudos com MRC, incluindo materiais caracterizados por um produtor de material de referência, mas cujos valores não são acompanhados da incerteza ou são qualificados de outra maneira.

O controle de qualidade interno é uma das ferramentas fundamentais para a garantia da qualidade dos resultados no âmbito de sistemas de gestão a qualidade (SGQ) de laboratórios (CITAC/EURACHEM, 2002; ABNT, 2005 a). Os principais objetivos deste tipo de controle são: i) monitorar a estabilidade dos parâmetros de desempenho de um método previamente validado durante seu uso em atividades de rotina; ii) manter um controle estatístico do processo de medição (VAN DER VOET *et al.*, 1999); e iii) indicar aceitação ou rejeição de um grupo de resultados, com necessidade de repetição dos ensaios (THOMPSON & WOOD, 1995). Desta forma, o controle de qualidade interno é requerido para fornecer evidências do desempenho do método durante sua aplicação, devendo ser realizado com frequência estabelecida para demonstrar o desempenho de métodos validados ao longo do tempo (HILL & REYNOLDS, 1999; THOMPSON *et al.*, 2002).

Embora os MR e MRC desempenhem um papel chave em processos de validação de métodos e no desenvolvimento de programas de controle de qualidade interno para avaliação da veracidade, não existem materiais disponíveis comercialmente para todas as análises químicas realizadas atualmente em laboratórios e os materiais são extremamente caros devido, principalmente, aos

custos das etapas de produção e certificação, além de taxas de importação. Desta forma, a preparação e certificação de material para aplicação na avaliação da qualidade de leite e seus derivados é um tema fundamental para o avanço da metrologia química e da gestão da qualidade (GQ) analítica no setor lácteo (DE NONI, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Dada a importância do leite para a economia mineira e brasileira, a posição de destaque deste alimento para a nutrição e, portanto, para a saúde da população, e à crescente demanda pela garantia da confiabilidade dos resultados de ensaios que subsidiam a verificação da adequação ao PIQ e à rotulagem nutricional obrigatória, este trabalho teve como objetivo a produção de MR para o escopo analítico umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável em leite em pó integral.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi produzir, experimentalmente, MR para determinação de umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável em leite em pó integral, sob diferentes condições experimentais, incluindo tipos de embalagens e temperaturas de armazenamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o desempenho do Laboratório de Bromatologia – Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA) do Departamento de Alimentos (ALM) da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) nas determinações dos parâmetros do PIQ do leite em pó.

Preparar MR, sob diferentes condições experimentais, incluindo tipos de embalagens e temperaturas de armazenamento.

Realizar testes de homogeneidade e estabilidade dos materiais preparados, em conformidade com os principais guias e normas nacionais e internacionais.

Comparar os diferentes tratamentos estatísticos propostos na literatura para avaliação de homogeneidade e estabilidade de MR.

Avaliar as condições mais adequadas de produção dos materiais.

Estimar as incertezas-padrão devidas à homogeneidade e estabilidade dos materiais preparados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 LEITE - FLUIDO E EM PÓ

3.1.1 Definições e qualidade

Leite, sem outra especificação, é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (MAPA, 2002). Trata-se de uma emulsão de glóbulos de gordura e uma suspensão de micelas (agrupamentos de várias moléculas de caseína junto com cálcio, fósforo e outros sais) (GONZÁLEZ *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2011), numa fase aquosa que contém solubilizadas moléculas de lactose, proteínas do soro do leite e alguns minerais (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

A composição do leite depende de uma série de fatores como: bem-estar animal, manejo, estágio de lactação, genética, nutrição, região, época do ano (BRITO & DIAS, 1998; RIBAS *et al.*, 2004; VIEIRA *et al.*, 2011) e contagem de células somáticas (CCS) (CUNHA *et al.*, 2008; RIGUEIRA, 2010).

O leite de alta qualidade pode ser caracterizado como um alimento livre de agentes patogênicos e outros contaminantes (resíduos de antibióticos e pesticidas), apresentando reduzida contaminação microbiana, sabor agradável, adequada composição e baixa CCS (SANTOS, 2004).

A preocupação com a qualidade do leite está pautada principalmente em dois princípios: o primeiro relacionado às questões nutricionais e o segundo relacionado às doenças transmissíveis por alimentos (DTA), associadas principalmente ao consumo de produtos de origem animal, entre eles o leite e seus derivados (AMARAL & SANTOS, 2011).

Além dos princípios supracitados, a determinação da composição do leite é de fundamental importância para as indústrias de laticínios por ser fator preponderante para o rendimento industrial de derivados lácteos como queijos, manteiga, leite em pó, creme de leite e requeijão (LEITE, 2006). Por exemplo, uma

redução de 0,5 % no teor de sólidos totais pode significar a perda de até cinco toneladas de leite em pó para cada milhão de litros de leite processado (FONSECA & SANTOS, 2000).

De acordo com a Instrução Normativa N° 51 (MAPA, 2002), a qualidade do leite cru integral tipos A, B ou C é definida pela composição e por parâmetros físicos, químicos e microbiológicos como: teores de gordura (g/100 g), proteína (g/100 g), sólidos não gordurosos (g/100 g), acidez (g ácido láctico/100 mL), densidade relativa (g/mL), índice crioscópico máximo, índice de refração do soro cúprico, redutase ou teste de redução do azul de metileno (TRAM), estabilidade ao alizarol (v/v), contagem padrão em placas em unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e CCS (CS/mL). Para o leite pasteurizado tipos A, B ou C, integral, padronizado, semi-desnatado ou desnatado, os parâmetros de qualidade são gordura (g/100 g) acidez, (g ácido láctico/100 mL), estabilidade ao alizarol 72 % (v/v), sólidos não gordurosos (g/100 g), índice crioscópico máximo, índice de refração do soro cúprico a 20 °C, contagem padrão em placas (UFC/mL), coliformes em número mais provável (NMP/mL a 30/35 °C), coliformes (NMP/mL a 45 °C), *Salmonella* spp/25 mL.

Com isso, a maior parte dos países, inclusive o Brasil, tem buscado executar programas de pagamento por qualidade, existindo, portanto, padrões mínimos a serem atendidos em relação à composição (teores de gordura e de proteína) (DURR *et al.*, 2004) e quanto aos aspectos de sanidade (nível de contaminação microbiana e contagem de células somáticas) (DURR *et al.*, 2004; LEITE, 2006; BARBOSA, 2007).

Segundo RIBAS *et al.* (2004) o pagamento do leite por componentes visa melhorar a qualidade da matéria-prima, aumentando o rendimento industrial para a fabricação de diversos derivados lácteos.

Apesar dos avanços recentes no âmbito da qualidade do leite, o Brasil ainda deverá passar por grandes transformações, pois, a qualidade do leite brasileiro está muito abaixo dos padrões verificados em outros países, sendo a diferença mais marcante em relação à contagem padrão em placas, o que acaba refletindo em menor rendimento industrial dos derivados, na redução da vida de prateleira e na menor qualidade do produto final (CARVALHO, 2010).

A instituição da Instrução Normativa N° 51, do sistema de coleta a granel e da rede leite, foi fundamental para o início do processo, contudo ainda se faz

necessário um esforço coletivo da cadeia produtiva, começando pela indústria de transformação. O sistema de pagamento por qualidade e por sólidos no leite ainda é embrionário e a grande maioria dos laticínios do País não valoriza estes itens na formação do preço ao produtor. Além disso, existem laticínios que pagam por qualidade, mas os valores adicionais não estimulam investimentos. Por fim, somente um número reduzido de empresas possui um sistema de pagamento de leite mais desenvolvido e que de fato valoriza os atributos de qualidade (CARVALHO, 2010).

Entende-se por leite em pó o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados (MAPA, 1996).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó tem por objetivo fixar a identidade e as características mínimas de qualidade que deverá apresentar o leite em pó e o leite em pó instantâneo destinados ao consumo humano. No regulamento é estabelecido como ingrediente obrigatório o leite de vaca, devendo-se apresentar como pó uniforme sem grumos, isento de substâncias estranhas macro e microscopicamente visíveis, coloração branca amarelada, com sabor e odor agradável. Tais produtos devem ainda ser acondicionados em recipientes de um único uso, herméticos, adequados para as condições previstas de armazenamento e que confirmem proteção apropriada contra a contaminação (MAPA, 1996).

Os parâmetros de qualidade estabelecidos para o leite em pó são matéria gorda (% m/m), umidade (% m/m), acidez titulável (mL NaOH 0,1N/10 g sólidos não gordurosos), índice de solubilidade (mL), leite de alto tratamento térmico e partículas queimadas (máximo) (**Tabela 1**). Já para o leite em pó instantâneo são apresentados requisitos adicionais de umectabilidade máxima (s) e dispersabilidade (% m/m), conforme critérios descritos na **Tabela 2** (MAPA, 1996).

Com relação ao tratamento térmico, o leite em pó desnatado pode ser classificado como de baixo, médio ou alto tratamento térmico, referindo-se ao conteúdo de nitrogênio da proteína do soro não desnaturada (MAPA, 1996). O grau de desnaturação da proteína de soro de leite em pó desnatado é tradicionalmente indicado pela diferença entre o índice de nitrogênio protéico de soro e o nível de nitrogênio protéico de soro não desnaturado (PATEL *et al.*, 2007). Estes tipos de leite diferenciam-se pelo grau de desnaturação das proteínas solúveis, que aumenta

proporcionalmente com o tratamento térmico. Há mercado para todos: em alguns casos existe o interesse em conservar intacta a maior parte destas proteínas, mas em outros, como por exemplo, o leite em pó de alta temperatura é mais utilizado em pastelarias (UFSC/EQA, 2013).

O parâmetro partículas queimadas avalia o processo de secagem do leite em pó, levando em consideração que o excesso de partículas queimadas altera a aparência (presença de pontos pretos) e sabor (queimado) do leite em pó. A metodologia apresenta a escala de valores padrão para comparação de 7,5 mg (Disco A), 15,0 mg (Disco B), 22,5 mg (Disco C) e 32,5 mg (Disco D).

Tabela 1. Parâmetros de qualidade estabelecidos para o leite em pó pela legislação brasileira

Requisitos	Integral	Parcialmente desnatado	Desnatado
Matéria Gorda (% m/m)	Maior ou igual a 26,0	1,5 a 25,9	Menor que 1,5
Umidade Máx. (% m/m)	3,5	4,0	4,0
Acidez titulável Máx. (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	18,0	18,0	18,0
Índice de solubilidade Máx. (mL)	1,0	1,0	1,0
Leite de alto tratamento térmico Máx. (mg/g)	-	-	2,0
Partículas queimadas Máx. (mg)	15 (Disco B)	15 (Disco B)	15 (Disco B)

Máx. = máximo.

Tabela 2. Parâmetros de qualidade adicionais estabelecidos para leite em pó instantâneo pela legislação brasileira

Requisitos	Integral	Parcialmente desnatado	Desnatado
Umectabilidade Máx. (s)	60	60	60
Dispersabilidade (%m/m)	85	90	90

Máx. = máximo.

Segundo o Ministério da Saúde, a rotulagem nutricional é toda inscrição destinada a informar ao consumidor sobre os constituintes nutricionais do alimento,

devendo, portanto, ser o meio de comunicação entre o produto e o consumidor, permitindo a escolha correta (ANVISA, 2003 b).

Visto que a rotulagem nutricional facilita ao consumidor conhecer as propriedades nutricionais dos alimentos, contribuindo para um consumo adequado dos mesmos e considerando que a informação que se declara na rotulagem nutricional complementa as estratégias e políticas de saúde dos países em benefício da saúde do consumidor (ANVISA, 2003 a,b), pode-se dizer que por meio deste importante elemento de informação é possível fazer modificações relevantes nas práticas alimentares da população.

No Brasil, a ANVISA é o órgão responsável pela regulamentação da Rotulagem de Alimentos Industrializados e, todas as portarias existentes buscam garantir produtos de qualidade e em boas condições de higiene para toda a população visando à manutenção da saúde (ANVISA, 2001). Nas Resoluções RDC N° 359 (Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para fins de Rotulagem Nutricional) e N° 360 (Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados), ambas de 23 de dezembro de 2003, a ANVISA afirma que todo alimento produzido, comercializado e embalado na ausência do cliente e pronto para ser oferecido ao consumidor deve conter, obrigatoriamente, rotulagem nutricional (ANVISA, 2003 a,b).

As informações nutricionais que devem constar em rótulo são: valor energético, carboidratos, proteínas, gorduras totais (saturadas e trans), fibra alimentar, sódio, outros minerais e vitaminas, sendo esses dois últimos obrigatórios apenas se fizer uma declaração de propriedades nutricionais ou outra declaração que faça referência a estes nutrientes (ANVISA, 2003 b; ANVISA, 2005).

Algumas regras foram estabelecidas quanto à forma de apresentação das informações nutricionais nos rótulos a fim de permitir uma busca facilitada pelo consumidor: a informação nutricional deve ser apresentada em um mesmo local, estruturada em forma de tabela (horizontal ou vertical conforme o tamanho do rótulo); todos os nutrientes devem ser declarados da mesma forma (tamanho e destaque); a declaração da medida caseira é obrigatória; a informação nutricional deve estar no idioma oficial do país de consumo do alimento em lugar visível, com letras legíveis, que não possam ser apagadas ou rasuradas, e em cor contrastante com o fundo onde estiver impressa (ANVISA, 2003 b; ANVISA, 2005).

Desta forma, a determinação laboratorial de parâmetros físico-químicos é de extrema importância no contexto da avaliação da conformidade de produtos como o leite em pó em relação ao seu PIQ e às informações nutricionais declaradas nos rótulos.

3.1.2 Aspectos nutricionais

O leite bovino é um fluido composto por diversos nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). A qualidade dos nutrientes do leite cru, ou de seus derivados, coloca-o entre os alimentos mais importantes da dieta humana, especialmente de crianças e jovens, que têm maior necessidade de proteínas, vitaminas e ácidos graxos essenciais (CAMPOS *et al.*, 1998). Além disso, o leite oferece grandes possibilidades de processamento industrial para a obtenção de diversos produtos para a alimentação humana (FONSECA & SANTOS, 2000).

É composto por mais de 100.000 tipos diferentes de moléculas, sendo os principais componentes a lactose, gordura, proteína, minerais, vitaminas e a água (FONSECA & SANTOS, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2001) e de enorme importância para os seres humanos ao longo de suas vidas, sendo considerado uma fonte de macro e micronutrientes e também de uma série de componentes bioativos (proteínas específicas, peptídeos e ácidos graxos) que desempenham um papel significativo na nutrição e saúde (BAUMAN *et al.*, 2006).

A lactose é o principal glicídeo presente no leite de todos os mamíferos. É um dissacarídeo composto pelos monossacarídeos D-glicose e D-galactose, ligados por ligações glicosídicas β - 1,4 (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). No sistema digestivo a lactose é hidrolisada em glicose e galactose, pois somente estes monossacarídeos são absorvidos no intestino delgado, para então serem metabolizados e utilizados como fonte de energia para o organismo (AMIOT, 1991).

A lactose compreende aproximadamente 52 % dos sólidos totais do leite desnatado e 70 % dos sólidos encontrados no soro do leite. A quantidade de água do leite e, conseqüentemente, o volume de leite produzido pela vaca, depende da quantidade de lactose secretada, pois a lactose atua atraindo a água do sangue

para equilibrar a pressão osmótica na glândula mamária. A concentração de lactose no leite é de aproximadamente 5 % (4,7 a 5,2 %) (BRITO *et al.*, 2011), enquanto no leite em pó desnatado seu teor é de cerca de 52 % (AMIOT, 1991).

A lactose contribui para o aumento da absorção e retenção do cálcio (GUÉGUEN & POINTILLART, 2000; DAMODARAN *et al.*, 2010), prolonga a ação da vitamina D (GUÉGUEN & POINTILLART, 2000) e aumenta a absorção de magnésio e manganês (MANAN *et al.*, 1999).

Além da lactose, outros glicídeos podem ser encontrados no leite, porém em concentrações muito baixas. Pequenas quantidades de glicose livre (cerca de 0,1 %) e galactose também são encontradas no leite de vaca e de outras espécies (AMIOT, 1991; GONZÁLEZ *et al.*, 2001) além de amino-açúcares, açúcar-fosfatos, açúcares nucleotídeos e oligossacarídeos (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). Na **Tabela 3** encontram-se relacionados os principais carboidratos encontrados no leite.

Tabela 3. Carboidratos do leite fluido integral

Carboidrato	Teor (mg/100 mL)
Lactose	5.000
Glicose	14
Galactose	12
Ácido N-acetilneuramínico	4-5
Mioinositol	4,5
Oligossacarídeos de lactose	0-0,01

Fonte: FONSECA & SANTOS (2000).

O leite constitui uma das principais fontes de proteínas na alimentação de animais jovens e de humanos de todas as idades e é constituído por várias proteínas específicas (SGARBIERI, 1996). As proteínas do leite são fontes importantes de aminoácidos essenciais, conforme ilustrado na **Tabela 4** (AMIOT, 1991; USDA, 2011).

Dentre as proteínas, a mais importante é a caseína, que perfaz cerca de 85 % do total das proteínas lácteas, sendo identificados vários tipos, α , β , κ , γ , similares na sua estrutura (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

As proteínas do soro do leite são constituídas de beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig) e glico-macropéptídeos (GMP) (HARAGUCHI *et al.*, 2006). MCINTOSH *et al.* (1998) e SGARBIERI (2004) realizaram levantamentos bibliográficos a respeito dos efeitos biológicos dessas proteínas e evidenciaram efeitos benéficos como atividade imunomoduladora, benefícios na função digestiva, efeito hipocolesterolêmico, anticarcinogênico, atividade antimicrobiana e antiviral.

De uma maneira geral, as proteínas desempenham grande importância ao desenvolvimento de novos tecidos. Fazem parte da composição da parede celular, pele, pêlos; catalisam enzimas, dentre outras funções. Elas têm um papel energético secundário no organismo humano, compondo 12 % das calorias ingeridas pelo ser humano (AMIOT, 1991).

Além da grande importância em alimentação, as proteínas do leite encontram inúmeras aplicações industriais, sendo muito utilizadas na formulação de produtos pelas suas propriedades espumante, emulsificante e geleificante (SGARBIERI, 1996).

Tabela 4. Composição de aminoácidos essenciais no leite fluido integral com 3,25 % de gordura

<i>Aminoácido</i>	<i>Teor (g/100 g)</i>
Fenilalanina	0,144
Histidina	0,073
Isoleucina	0,161
Leucina	0,260
Lisina	0,137
Metionina	0,073
Treonina	0,140
Triptofano	0,073
Valina	0,188

Fonte: USDA (2011).

A gordura é o principal componente energético no leite, sendo a razão de várias propriedades físicas, características de fabricação e qualidade sensorial do leite e dos produtos lácteos (BAUMAN & GRIINARI, 2003).

A gordura do leite, como todos os óleos e gorduras provenientes de fontes naturais, é uma mistura de vários tipos de triacilgliceróis. Fatores fisiológicos e ambientais são os principais responsáveis por essa variação (GONZÁLEZ *et al.*, 2001; BAUMAN *et al.*, 2006).

Com relação à importância nutricional, além de apresentar elevado valor energético, a gordura do leite de vaca contribui na ingestão de ácidos graxos essenciais e vitaminas, especialmente as lipossolúveis (A, D, E e K) (KRAUSE *et al.*, 2005). Apresenta, além dos triacilgliceróis, quantidades mensuráveis de fosfolipídios, esteróides (colesterol e seus precursores) e cerebrosídeos (AMIOT, 1991) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Composição lipídica do leite fluido integral

<i>Lípídeo</i>	<i>Teor (g/100 mL)</i>
Glicerídeos	3,85
Fosfolípídeos	0,035
Lecitinas	0,021
Cefalinas	0,011
Esfingomielinas	0,003
Colesterol	0,015
Cerebrosídeos	0,002
Carotenóides	-

- = não informado.
Fonte: AMIOT (1991).

Os ácidos graxos encontrados no leite são em sua maioria saturados (AGS), cerca de 60 % (AIGSTER *et al.*, 2000) os quais são apontados como precursores da lipoproteína de baixa densidade (LDL) sendo relacionados ao aumento do colesterol sérico e risco de doenças coronarianas (BHUPATHIRAJU & TUCKER, 2011). Porém, segundo BAUMAN *et al.* (2006), os ácidos graxos saturados presentes no leite variam em sua estrutura e muitos não têm efeito sobre o colesterol plasmático. Além disso, estes autores reforçam que vários estudos epidemiológicos não encontraram relação significativa entre o consumo de leite e derivados e o risco de desenvolvimento da aterosclerose.

A gordura do leite de vaca é a fonte natural mais rica de ácido linoléico conjugado (CLA), sendo que o que o isômero cis-9, trans-11 representa de 75 % a 90 % dos isômeros de CLA no leite. A presença de CLA na gordura do leite de ruminantes é consequência da isomerização e biohidrogenação de ácidos graxos insaturados pelas bactérias no rúmen, bem como da atividade da Δ^9 -desaturase na glândula mamária (COLLOMB *et al.*, 2006). O leite juntamente com seus derivados perfazem 75 % da recomendação de CLA na dieta. Há evidências de que esses

compostos, associados a outros componentes do leite (proteínas do soro do leite, caseína, dentre outros), promovem efeitos benéficos ao organismo como a redução da incidência de doenças coronarianas e proteção contra o câncer (BAUMAN *et al.*, 2006).

O leite apresenta ainda ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), cerca de 30 %, e poliinsaturados (AGPI), aproximadamente 4 % (AIGSTER *et al.*, 2000). O perfil de ácidos graxos do leite fluido encontra-se descrito na **Tabela 6**.

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos no leite fluido integral com 3,25 % de gordura

Ácidos graxos	Teor (g/100 g)
Saturados	1,865
Monoinsaturados	0,812
Poliinsaturados	0,195

Fonte: USDA (2011).

A gordura do leite, assim como dos lipídios em geral, apresenta como principais funções no organismo a estrutural, como parte integrante de membranas biológicas; de reserva de energia para realização dos processos metabólicos, além de fornecerem ácidos graxos essenciais e colesterol (WILLIAMS, 1997).

Como mencionado anteriormente, o leite contém vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) veiculadas pela gordura, sendo que a vitamina K está presente em pequenas quantidades (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). A vitamina A é considerada a mais importante no leite, sendo que um copo de leite integral (200 mL) contribui com aproximadamente 12 % da ingestão diária recomendada (IDR) para adultos (AMIOT, 1991). Sua deficiência além de provocar alterações oculares (xerofthalmia) pode causar aumento do risco de mortalidade e morbidade em crianças em idade pré-escolar (MILAGRES *et al.*, 2007) devido ao aumento do número de casos de infecção respiratória e do aumento e aumento da susceptibilidade a infecções (FERRAZ *et al.*, 2005).

A vitamina E é um potente agente oxidante e, sua ação envolve a inibição da lipoperoxidação das membranas celulares, impedindo assim a deterioração de ácidos graxos indispensáveis para o organismo. Assim, além dos benefícios para a saúde, a vitamina E tem ações benéficas sobre o alimento, minimizando a formação de radicais livres. No leite de vaca, a vitamina E se encontra na forma de α -tocoferol e a quantidade presente no leite tem uma estreita relação com a dieta do animal. O colostro contém de duas a sete vezes mais vitamina E que o leite normal (GONZÁLEZ, *et al.*, 2001). Porém, a principal fonte dessa vitamina são alimentos de origem vegetal (BATISTA *et al.*, 2007).

A vitamina D do leite se encontra nas formas de vitamina D₂, que resulta da irradiação do ergosterol da dieta, e D₃, um derivado do 7-deidrocolesterol, produzido por ação direta dos raios ultravioleta sobre o animal. O colostro contém de três a dez vezes mais vitamina D que o leite normal (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

O leite de vaca contém também vitaminas hidrossolúveis (vitamina C e vitaminas do grupo B), sendo a riboflavina ou vitamina B-2 a mais importante encontrada nos produtos lácteos. Um copo (200 mL) de leite contribui com aproximadamente 21 % da IDR (Ingestão Diária Recomendada) para adultos humanos. Como a maior parte das vitaminas hidrossolúveis do grupo B, a riboflavina forma parte da composição de um nucleotídeo, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), coenzima transportadora de hidrogênio que intervém nas reações de oxidação dos aminoácidos e da glicose. O leite contém também quantidades apreciáveis de vitamina B₁₂, vitamina B₁ ou tiamina, vitamina B₆ ou piridoxina e vitamina C ou ácido ascórbico (AMIOT, 1991).

A vitamina C está presente no leite nas duas formas ativas: ácido ascórbico (estável e reduzido) e ácido dehidroascórbico (reversivelmente oxidado). O conteúdo é pouco afetado por fatores como dieta, idade, raça, etapa da lactação ou época do ano. Porém o leite não constitui uma fonte importante de vitamina C, uma vez que, grande parte do conteúdo em ácido ascórbico do leite fresco é destruído no processo de pasteurização (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). A **Tabela 7** indica o teor das principais vitaminas encontradas no leite.

Tabela 7. Teor das principais vitaminas encontradas no leite fluido integral com 3,25 % de gordura

<i>Vitamina</i>	<i>Teor (/100 g)</i>
Lipossolúveis	
Vitamina A (µg)	46
Vitamina D (UI)	2,0
Vitamina E (mg)	0,07
Vitamina K (µg)	0,3
Hidrossolúveis	
Ácido ascórbico (Vitamina C) (mg)	0,00 (0,9* e 1,2**)
Tiamina (B1) (mg)	0,046
Riboflavina (B2) (mg)	0,169
Cianocobalamina (B12) (µg)	0,45
Niacina (B3) (mg)	0,089
Piridoxina (B6) (mg)	0,036

- = não informado; * = leite fluido com teor reduzido de sódio; ** = leite fluido com 1% de gordura, fortificado com proteína e vitaminas A e D.
Fonte: USDA (2011).

O conteúdo mineral presente no leite é uma propriedade nutricional muito importante dos produtos lácteos, sendo o cálcio e o fósforo os mais abundantes. Eles estão basicamente associados com a estrutura das micelas de caseína. Assim, o soro do leite tem relativamente pouco cálcio e fósforo, comparado com o leite (GONZÁLEZ *et al.*, 2001).

O cálcio é um elemento fundamental ao organismo, sendo necessário em funções biológicas como a contração muscular, mitose, coagulação sanguínea, transmissão do impulso nervoso ou sináptico (MILLER & ANDERSON, 1999) e sua maior importância está relacionada às funções que desempenha na mineralização

óssea, desde a formação, manutenção da estrutura e rigidez do esqueleto (sais de cálcio) (FAO, 2001).

Por não ser produzido endogenamente, o cálcio é adquirido somente pela ingestão diária de alimentos que o contenham (GRÜDTNER *et al.*, 1997). O leite fornece grande parte da necessidade diária de cálcio da dieta humana, sendo que, um copo (200 mL) de leite fornece a metade da ingestão adequada (AI) de cálcio por dia de uma criança de um ano de idade (500 mg/dia) (BUENO & CZEPIELEWSKI, 2008) e quatro copos de leite são suficientes para atingir as recomendações para indivíduos acima de 50 anos (PEREIRA *et al.*, 2009).

O cálcio nos produtos lácteos apresenta maior biodisponibilidade, o que está relacionado com o conteúdo de vitamina D e com a presença de lactose, que aumentam a sua absorção no intestino (BUZINARO *et al.*, 2006). Além disso, como o pH do leite é alcalino, o cálcio se mantém em suspensão pela formação de caseinato de cálcio, de citrato de cálcio e de um complexo com a lactose. Assim, estas formas presentes no leite e derivados parecem explicar a melhor absorção de cálcio proveniente destas fontes em relação às outras (GRÜDTNER *et al.*, 1997).

Segundo PEREIRA *et al.* (2009), a baixa ingestão de cálcio da população brasileira deve-se, provavelmente, ao custo dos produtos, hábitos culturais e alimentares. Tendo em vista a importância da ingestão adequada de cálcio, o Brasil possui políticas públicas que contribuem para melhoria da ingestão de cálcio como o programa nacional de distribuição de leite e a merenda escolar.

O fósforo está intimamente associado ao cálcio na nutrição humana e a sua assimilação aos ossos e dentes é regulada pela vitamina D e paratormônio. Na alimentação, deve haver uma proporção na relação cálcio/fósforo de 1/1 ou 1,5/1, sendo essa relação fundamental para a absorção e excreção de cálcio e fósforo: quando um está em excesso, obrigatoriamente a excreção do outro será aumentada (MOURA, 2009).

SHAPIRO & HEANEY (2003) concluíram que se a dieta for pobre em fósforo, a suplementação de cálcio por si só será insuficiente e pode até agravar a deficiência, sendo preferível a suplementação de cálcio e fósforo que apenas a suplementação com cálcio.

Assim como o cálcio, a biodisponibilidade do fósforo é maior nos produtos de origem animal (70 %) do que nos de origem vegetal, sendo encontrado

principalmente como composto orgânico e, quando hidrolisado no trato gastrointestinal, libera fósforo inorgânico que fica disponível para absorção (SHAPIRO & HEANEYB, 2003).

Além do cálcio e fósforo, o leite bovino possui ainda traços de outros minerais, ferro, enxofre, cobre, zinco, magnésio, flúor, cobalto, iodo, molibdênio, mas não contribui de forma significativa a satisfazer as necessidades do organismo humano (AMIOT, 1991). A **Tabela 8** apresenta o teor dos principais minerais encontrados no leite.

O leite é um produto altamente perecível (CAMPOS *et al.*, 1998; SERT *et al.*, 2009), sendo a deterioração química e microbiológica os principais fatores que limitam o tempo de armazenamento (SERT *et al.*, 2009). Além disso, o leite está sujeito a entressafra, quando o volume produzido pode diminuir significativamente (CAMPOS *et al.*, 1998). Nesse aspecto, a produção do leite em pó é fundamental, permitindo a armazenagem, facilitando manuseio e/ou reduzindo custos de transporte (GAIANI *et al.*, 2011), contribuindo para a regulação da política comercial e de mercado consumidor (CAMPOS *et al.*, 1998). Além de exercer papel importante para aplicações na engenharia e tecnologia de alimentos (SERT *et al.*, 2009). Considerando-se as dimensões territoriais do Brasil, o leite na forma em pó reduz ainda os custos logísticos, viabilizando a distribuição e comercialização do produto.

Tabela 8. Teor dos principais minerais encontrados no leite fluido integral com 3,25 % de gordura

<i>Minerais</i>	<i>Valor (/100 g)</i>
Potássio (mg)	132
Cálcio (mg)	113
Fósforo (mg)	84
Sódio (mg)	43
Magnésio (mg)	10
Zinco (mg)	0,37
Ferro (mg)	0,03
Cobre (mg)	0,025
Manganês (mg)	0,004
Selênio (µg)	3,7

Fonte: USDA (2011).

Durante o processo de secagem do leite para obtenção do produto em pó, os nutrientes são conservados quase que completamente (GUERRA *et al.*, 2005), como se pode observar nas tabelas de composição química de alimentos, o valor nutricional do leite em pó é praticamente o mesmo do leite fluido. INDYK *et al.* (1996) avaliaram a estabilidade da vitamina D3 no leite durante o processo de *spray-drying* e não encontraram perdas estatisticamente significantes após esse processamento.

A composição nutricional do leite em pó encontra-se detalhada na **Tabela 9**.

Tabela 9. Composição nutricional do leite em pó integral

<i>Componente</i>	<i>Teor por 100g</i>				
	TACO (2006)	IBGE (1999)	CAMPOS et al. (1998)	TORRES et al. (2000)	USDA (2011)**
Umidade (%)	2,7	2,0	2,12	2,98	2,47
Energia (Kcal)	497	502	498	495	496
Proteína (g)	25,4	26,4	24,39	25,68	26,32
Lipídeos (g)	26,9	27,5	27,98	25,72	26,71
Colesterol (mg)	85	-	-	-	97
Carboidratos (g)	39,2	38,2	37,09 (lactose)	40,19	38,42
Fibra alimentar (g)	NA	-	-	-	0,0
Cinzas(g)	5,8	5,9	8,42	5,34	6,08
Cálcio (mg)	890	909	-	-	912
Magnésio (mg)	77	-	-	-	85
Manganês (mg)	Tr	-	-	-	0,040
Fósforo (mg)	1242	708	-	-	776
Ferro (mg)	0,5	0,5	-	-	0,47
Sódio (mg)	323	-	-	-	371
Potássio (mg)	1132	-	-	-	1330
Cobre (mg)	0,11	-	-	-	0,080
Zinco (mg)	2,7	-	-	-	3,34
Vitamina A (mcg)	361	270	-	-	253
Tiamina (B1) (mg)	0,24	0,29	-	-	0,283

Continua

Tabela 10. Composição nutricional do leite em pó integral (continuação)

<i>Componente</i>	<i>Teor por 100g</i>				
	TACO (2006)	IBGE (1999)	CAMPOS et al. (1998)	TORRES et al. (2000)	USDA (2011)**
Riboflavina (B2) (mg)	1,03	1,46	-	-	1,205
Piridoxina (B6) (mg)	Tr	-	-	-	0,302
Niacina (B3) (mg)	*	0,7	-	-	0,646
Vitamina C (mg)	-	6	-	-	8,6
Vitamina D (IU)	-	-	-	-	20
Vitamina E (mg)	-	-	-	-	0,58
Vitamina K (mcg)	-	-	-	-	2,2
Cianocobalamina (B12) (mcg)	-	-	-	-	3,25
Ácidos graxos saturados	16,3	-	-	-	16,742
Ácidos graxos monoinsaturados	7,1	-	-	-	7,924
Ácidos graxos poliinsaturados	0,5	-	-	-	0,665
Fenilalanina (g)	-	-	-	-	1,271
Histidina (g)	-	-	-	-	0,714
Isoleucina (g)	-	-	-	-	1,592
Leucina (g)	-	-	-	-	2,578
Lisina (g)	-	-	-	-	2,087
Metionina (g)	-	-	-	-	0,660
Treonina (g)	-	-	-	-	1,188
Triptofano (g)	-	-	-	-	0,371
Valina (g)	-	-	-	-	1,762

Tr = traços; - = não informado; NA = Não aplicável; * as análises estão sendo reavaliadas; ** referente a leite em pó integral sem adição de vitamina D.

3.1.3 Aspectos econômicos

Em 2011, a produção mundial de leite bovino foi estimada em 606 milhões de toneladas (FAO, 2013). O Brasil é o quarto país maior produtor de leite bovino do mundo, após Estados Unidos, Índia e China. Com uma produção que ultrapassou pela primeira vez a barreira dos 30 milhões de toneladas produzidos em 2010, atingindo 32,1 milhões de toneladas em 2011, a produção brasileira cresce a uma taxa média anual de aproximadamente 4 %, superior à grande maioria dos países que ocupam os primeiros lugares. A produção brasileira de leite corresponde a 70 % do volume total de leite produzido nos países que compõem o Mercosul (FAO, 2013).

A atividade leiteira é praticada em todo o território nacional (VILELA *et al.*, 2002; ZOCCAL *et al.*, 2004), pois as condições edafoclimáticas do país permitem a adaptação da atividade às peculiaridades regionais (ZOCCAL *et al.*, 2004). Em mais de um milhão de propriedades rurais e, somente na produção primária, esta atividade gera acima de três milhões de empregos e agrega mais de seis bilhões de reais ao valor da produção agropecuária nacional. Na última década, três fatores importantes marcaram o setor leiteiro nacional: o aumento da produção, a redução do número de produtores e o decréscimo dos preços recebidos pelos produtores (VILELA *et al.*, 2002).

No Brasil, observa-se ainda a existência de diversas formas ou modelos de produção de leite. Existem sistemas com diferentes graus de especialização, desde propriedades de subsistência, utilizando técnicas rudimentares e produção diária menor que dez litros, até produtores comparáveis aos mais competitivos do mundo, usando tecnologias avançadas e com produção diária superior a 50 mil litros (ZOCCAL & GOMES, 2005). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), o país possui aproximadamente 1,2 milhões de produtores de leite, dos quais os 200 mil maiores detêm 65 % da produção nacional. Uma das conseqüências desta grande disparidade é a baixa produtividade média, indicando que muito ainda precisa ser aprimorado do ponto de vista genético, nutricional e principalmente de manejo para se atingir os patamares alcançados pelos principais produtores mundiais.

A indústria de alimentos sempre desempenhou um importante papel na economia brasileira, representando uma das mais tradicionais estruturas produtivas

existentes no País. Dentre os diversos setores da indústria alimentícia, o setor de laticínios destaca-se entre os quatro principais, sendo a liderança ocupada pelo setor de derivados de carne. Em 2001, no entanto, o setor de laticínios chegou a ocupar a segunda posição nessa indústria, perdendo espaço para o setor de beneficiamento de café, chá e cereais e para o setor de açúcares. Estima-se que a participação dos laticínios no faturamento total da indústria de alimentos seja de aproximadamente 10 % (CARVALHO, 2010).

Mesmo com auto-suficiência, o Brasil participa do mercado internacional, ora importando, ora exportando, dependendo da demanda interna e dos preços doméstico e internacional praticados (ZOCCAL *et al.*, 2004). Ao longo das últimas décadas o Brasil conviveu com surtos de importações de produtos lácteos devido ao câmbio sobrevalorizado, tabelamento de preços para combate à inflação e mudanças nas políticas de apoio à produção de leite. Além disso, com a implementação do Plano Real e fim da inflação, ocorreram momentos de forte crescimento no consumo interno. O resultado dessas transformações culminou em mais investimentos no setor, com ganhos na produção primária, nos processos logísticos e no amadurecimento da cadeia produtiva (CARVALHO, 2010).

Os estados maiores produtores de leite no país são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Santa Catarina (IBGE, 2013). Historicamente, Minas Gerais é o maior produtor de leite do país, representando em média 28 % da produção nacional. Esta é a principal cadeia produtiva do agronegócio mineiro, estando presente em todas as regiões, empregando mão-de-obra, gerando excedentes comercializáveis e garantindo renda para grande parte da população (MINAS GERAIS, 2007). A produção de leite no estado em 2012 foi estimada em 8,3 milhões de toneladas, representando 25,9 % do total de 32,1 milhões de toneladas produzidos no Brasil (IBGE, 2013). O excedente exportável de produtos lácteos torna-se fundamental na composição da renda do Estado (MINAS GERAIS, 2007).

Nos últimos anos, a produção de leite tem migrado do Sul de Minas para a região dos cerrados, em busca de terras baratas e proximidade com a produção de grãos. Do volume produzido anualmente, 28,4 % vem da região do Triângulo/Alto Paranaíba. As regiões Sul e Sudoeste de Minas respondem por 21,6 % da produção, enquanto a Zona da Mata e Rio Doce, somados, alcançam 18,8 % do leite

produzido. As regiões Centro-Oeste e Vertentes produzem 16,9 % e as demais regiões 14,3 % (MINAS GERAIS, 2007).

O significativo crescimento da produção de leite na região de cerrado, especialmente em Goiás e nas regiões do Triângulo Mineiro e do Alto Paranaíba, em Minas Gerais, é influenciado, principalmente, pelo menor custo de produção do leite nestas regiões, em razão do menor preço de alguns insumos e da prioridade ao pasto como alimento volumoso do rebanho, durante o verão. Além de menor custo, os sistemas de produção nestas regiões podem suportar um menor preço do leite para sua sobrevivência e são menos vulneráveis às crises do mercado de lácteos, em razão da maior flexibilidade para serem conduzidos (ZOCCAL & GOMES, 2005).

Havendo abertura de mercado e incentivos, Minas Gerais tem potencial e vocação para, dentro de poucos anos, duplicar a sua produção de leite, bastando que os produtores adotem medidas gerenciais simples nas suas propriedades e que sejam geradas políticas públicas de desenvolvimento para o setor (MINAS GERAIS, 2007).

Dados mostram que em termos de geração de emprego, uma elevação de demanda final por produtos lácteos em R\$ 1 milhão, gera anualmente 195 empregos permanentes no setor, suplantando setores importantes como o automobilístico, a construção civil, a siderurgia e a indústria têxtil (MINAS GERAIS, 2007).

3.1.4 Métodos de análise para avaliação do PIQ

Investigações em ciência e tecnologia de alimentos, quer na indústria alimentícia, agências governamentais ou universidades, sempre requerem determinação de características dos alimentos (composição química, propriedades físicas e sensoriais), as quais são utilizadas para responder questões específicas para fins de regulamentação e controle da qualidade. A exatidão e precisão na análise quantitativa e qualitativa dos lipídios em alimentos são fundamentais para a confiabilidade da rotulagem nutricional, para determinação dos padrões de qualidade e para assegurar especificações de produção. A falta de precisão nas análises pode causar prejuízos para a indústria e resultar em produtos de qualidade e funcionalidade indesejáveis (NIELSEN, 2010).

O teor de lipídeos totais de um alimento é comumente determinado por métodos que empregam extração com solvente orgânico ou por hidrólise ácida ou alcalina. A precisão dos métodos diretos de extração com solventes (ou seja, sem ácido prévio ou hidrólise alcalina) depende muito da solubilidade dos lipídios no solvente utilizado e da capacidade de separar os lipídios complexados com outras macromoléculas. O conteúdo lipídico de um alimento determinado pela extração comum com solvente pode diferir bastante se utilizados solventes de polaridades diferentes. Alguns lipídeos ocorrem como complexos de lipoproteínas e lipopolissacarídeos em alimentos. Portanto, para a análise desses compostos são necessárias etapas prévias, como, por exemplo, hidrólise, para quebra das ligações com os carboidratos e proteínas e conseqüente separação da fração lipídica. Além dos métodos de extração com solvente, existem também os métodos instrumentais que utilizam propriedades físicas e químicas de lipídios em alimentos para a determinação do teor de gordura (NIELSEN, 2010).

De acordo com a Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996, que define o PIQ para o leite em pó, este produto pode ser classificado de acordo com o conteúdo de matéria gorda em integral (maior ou igual a 26,0 %), parcialmente desnatado (entre 1,5 e 25,9 %) e desnatado (menor que 1,5 %), sendo o método de Rose-Gottlieb referenciado para análise deste requisito (MAPA, 1996). Na Instrução Normativa Nº 68 de 12 de dezembro de 2006, na qual são definidos os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos é descrito o método butirométrico para leite em pó desidratado, além do método de Rose-Gottlieb (MAPA, 2006). Esta IN está em fase de revisão, com o principal propósito de padronização dos métodos em relação àqueles normalizados pela *International Standard Organization* (ISO) e *International Dairy Federation* (IDF) (comunicação pessoal, F. S. COELHO & E. G. ESTEVES, MAPA, 2012). Conforme publicações da ISO e IDF, os métodos de Rose-Gottlieb (ISO, 2008 a) e Gerber (ISO, 2008 b,c; ISO, 2009) são considerados de referência e de rotina para determinação gordura em leite desidratado, respectivamente.

O método de Rose-Gottlieb baseia-se no uso de hidróxido de amônio para solubilizar a caseína, neutralizar a acidez e reduzir a viscosidade; no álcool etílico para quebrar a emulsão gordura-caseína e na mistura éter etílico-éter de petróleo para extrair a gordura. Esta mistura é mais eficaz na extração de diferentes lipídeos,

com hidrofobicidades diferentes. O éter de petróleo é usado, ainda, para diminuir a solubilidade das substâncias não lipídicas, solúveis no éter etílico. A gordura assim extraída é determinada gravimetricamente (MAPA, 2006). Esse método é muito utilizado para amostras úmidas ou líquidas (NIELSEN, 2010).

O método butirométrico baseia-se na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido dissolve as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, devido à liberação de calor proveniente da reação, o que favorece a separação da gordura pelo extrator (álcool amílico). A leitura é feita na escala do butirômetro, após centrifugação e imersão em banho-maria (MAPA, 2006; NIELSEN, 2010). No caso do leite, esse método é bastante utilizado, visto que a emulsão de óleo em água pode ser quebrada e o filme protéico removido antes da determinação volumétrica da gordura separada (POMERANZ & MELOAN, 1994).

O método de extração Soxhlet é um método de determinação da gordura bruta em diversos produtos alimentícios. No entanto, este método requer amostra seca para extração com éter etílico ou de petróleo. Comparados com a análise do teor de gordura pelo método de cromatografia gasosa da AOAC 996,06, os três métodos Goldfish, Soxhlet, e Roese-Gottlieb são mais rápidos e mais baratos (NIELSEN, 2010).

A determinação da umidade consiste uma das análises mais importantes realizadas em alimentos e, ainda, uma das mais difíceis de obter dados exatos e precisos (NIELSEN, 2010).

Os métodos para determinação de umidade podem ser divididos em métodos de secagem, procedimentos de destilação, ensaios químicos e procedimentos físicos, sendo os métodos de secagem os mais utilizados por serem simples, relativamente rápidos e permitirem análise simultânea de grande número de amostras (POMERANZ & MELOAN, 1994).

A umidade máxima permitida para o leite em pó integral é de 3,5 % enquanto para o leite em pó semi-desnatado e desnatado é de 4,0 %. Os métodos estabelecidos pela Instrução Normativa Nº 68 para obtenção do extrato seco total e desengordurado são o método gravimétrico, que consiste na perda da umidade e voláteis por dessecação entre 100 e 104 °C e pesagem do resíduo assim obtido, e o

método do Disco de Ackermann, cujo princípio baseia-se na utilização de instrumento apropriado para determinar o teor de extrato seco total por meio dos valores de densidade e do teor de gordura (MAPA, 2006). Contudo, o método normalizado pela ISO/IDF como método de referência para determinação da umidade em leite desidratado prevê secagem em estufa de ventilação forçada a 87 °C por 5 h (ISO, 2004).

Nos métodos de secagem, a amostra é aquecida sob condições especificadas e a perda de peso é usada para calcular o teor de umidade da amostra. O teor de umidade determinado é altamente dependente do tipo e das condições da estufa, do tempo e da temperatura de secagem (NIELSEN, 2010).

A matéria seca que permanece após a remoção da umidade é comumente referida como sólidos totais, de grande importância econômica para as indústrias de alimentos, pois retardará a deterioração dos produtos (POMERANZ & MELOAN, 1994; NIELSEN, 2010).

No entanto, existem técnicas distintas para secagem como a secagem a vácuo (entre 24 e 100 mm Hg), capaz de obter remoção mais eficiente da água e voláteis sem decomposição e num período de 3 a 6 h, porém, as estufas a vácuo necessitam de uma purga de ar seco, além de controle de temperatura e de vácuo (NIELSEN, 2010). Na maioria dos materiais biológicos, grande parte da água é removida com relativa facilidade, porém, remover o último 1 % é bem difícil. A água residual pode ser mais facilmente e mais rapidamente removida e com menores mudanças nos componentes orgânicos com associação do vácuo com outros métodos de secagem (POMERANZ & MELOAN, 1994).

A estufa de circulação forçada de ar, na qual, acomoda um grande número de amostras e atinge a temperatura de desidratação mais rapidamente depois que as amostras são inseridas. É bastante precisa no controle da uniformidade da temperatura em diferentes locais (POMERANZ & MELOAN, 1994).

A secagem por infravermelho envolve penetração direta de calor na amostra, diferente dos métodos convencionais de secagem tradicionais que ocorre por condutividade térmica ou convecção, sendo o tempo necessário de secagem reduzido em 12-33% (POMERANZ & MELOAN, 1994; NIELSEN, 2010).

A secagem por micro-ondas é uma técnica precisa e rápida e que, permite a alguns segmentos da indústria de alimentos ajustar o teor de umidade em produtos

alimentares antes da embalagem final. Porém, existem algumas considerações quando se utiliza o micro-ondas para a determinação de umidade: a amostra deve ser de tamanho uniforme; a amostra deve ser posicionada centralmente e distribuída uniformemente, para evitar que algumas partes se queimem e outras áreas não sofram alteração; e o tempo utilizado deve ser apropriado para o peso da amostra para minimizar a perda ou ganho de umidade antes da determinação do peso (NIELSEN, 2010).

A acidez titulável máxima estabelecida como PIQ do leite em pó é de 18 mL/10 g de sólidos não gordurosos, sendo estabelecido pela Instrução Normativa Nº 68 (MAPA, 2006) um método baseado na titulação potenciométrica até pH 8,4 de determinada massa de amostra reconstituída correspondente a 10 g de sólidos não gordurosos (SNG), com solução alcalina de concentração conhecida. Este método é bastante similar ao método de referência descrito pela ISO/IDF, prevê titulação com NaOH 0,1 mol/L até pH 8,40 de massa de amostra reconstituída correspondente a 5 g de SNG (ISO, 2010). Outro método descrito na Instrução Normativa Nº 68 (MAPA, 2006) e tido como método de rotina pela ISO/IDF (IDF, 1981) baseia-se na titulação de determinada massa da amostra reconstituída, correspondente a 10 g de SNG por uma solução alcalina de concentração conhecida, utilizando como indicador a fenolftaleína.

O índice de insolubilidade fundamenta-se na determinação do volume, em mililitros, de sedimento (resíduo insolúvel), obtido quando um leite em pó ou produto lácteo em pó é reconstituído e centrifugado (ISO, 2005 a; MAPA, 2006).

O método partículas queimadas descrito na IN 68 é o método *Water Disc* que se fundamenta na reconstituição da amostra, posterior filtração através de discos de algodão e comparação com discos padrões. O filtro é fixado num cartão apropriado ou folha de papel quadriculada (quadrados com cerca de 6 cm de lado, identificados com o número da amostra), os quais são secos em atmosfera livre de partículas ou em estufa entre 30 e 40 °C por breve período de tempo. Compara-se então o disco seco com as fotos dos padrões, sob luz uniforme e indireta. Quando a leitura situar-se entre dois padrões, a amostra é classificada de acordo com a letra mais alta ((MAPA, 2006).

Para determinação do teor de leite de alto tratamento térmico, após determinação da proteína total, a caseína e as proteínas do soro desnaturadas são

precipitadas a partir de leite em pó reconstituído utilizando cloreto de sódio. Posteriormente, as proteínas do soro do leite não desnaturadas, presentes no sobrenadante, são determinadas. O teor de proteína desnaturada é obtido por diferença. Métodos como Kjeldahl e espectrofotométricos (*dye-binding* ou de complexação com corantes) podem ser empregados (PATEL *et al.*, 2007).

Os métodos descritos na legislação brasileira para avaliação dos parâmetros do PIQ do leite em pó encontram-se relacionados na **Tabela 10**. Contudo, pode-se observar que, como a legislação relacionada ao PIQ (MAPA, 1996) e aos métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos (MAPA, 2006) não são recentes, muitos métodos já foram cancelados e substituídos por publicações atualizadas dos organismos de normalização na área como a ISO/IDF.

Tabela 11. Métodos analíticos para avaliação de parâmetros do PIQ do leite em pó citados na legislação brasileira e publicados por organismos de normalização internacionais

Parâmetro do PIQ Leite em Pó	Método Analítico		
	Portaria Nº 146 - PIQ (MAPA, 1996)	Instrução Normativa Nº 68 - Métodos Oficiais (MAPA, 2006)	Normas ISO/IDF Vigentes
Matéria Gorda	FIL/IDF 9C:1987 (Método de Referência para leite desidratado - Rose Gottlieb)	Lipídeos Método A: FIL/IDF 9C:1987 (Método de Referência para leite desidratado - Rose Gottlieb)	ISO 1736/IDF 009:2008 (Método de Referência para leite desidratado - Rose Gottlieb) Cancela e substitui FIL/IDF 9C:1987 (ISO, 2008 a)
	-	Método D: referências diversas (Método butirométrico para leite desidratado) Método E: referências diversas (Método butirométrico para leite desidratado e creme de leite pelo butirômetro de leite)	ISO 488/IDF 105:2008, ISO 2446/IDF 226:2008 e ISO 11870/IDF 152:2009 (Butirométrico Gerber) (ISO, 2008 b,c; ISO, 2009)
Umidade	FIL/IDF 26:1982 (Método de Referência para leite desidratado - Secagem em estufa de ventilação forçada a 87 °C por 5 h)	-	ISO 5537/IDF 26:2004 (Método de Referência para leite desidratado - Secagem em estufa de ventilação forçada a 87 °C por 5 h) Cancela e substitui FIL/IDF 26:1982 (ISO, 2004)
	-	Extrato seco total e desengordurado Método A: FIL/IDF 21B:1987 (Método gravimétrico para leite fluido - perda da umidade e voláteis por dessecação a 100-104 °C) Método B: referências diversas (Método do Disco de Ackermann - uso de instrumento apropriado para determinar o teor de extrato seco total por meio dos valores de densidade e do teor de gordura)	-

Tabela 12. Métodos analíticos para avaliação de parâmetros do PIQ do leite em pó citados na legislação brasileira e publicados por organismos de normalização internacionais (continuação)

Parâmetro do PIQ Leite em Pó	Método Analítico		
	Portaria Nº 146 - PIQ (MAPA, 1996)	Instrução Normativa Nº 68 - Métodos Oficiais (MAPA, 2006)	Normas ISO/IDF Vigentes
Acidez titulável	FIL/IDF 86:1981 (Método de Referência para leite desidratado - Titulação com NaOH 0,1 mol/L até pH 8,40 de massa de amostra reconstituída correspondente a 5 g de sólidos não gordurosos)	Método A: FIL/IDF 86:1981 (Método de Referência para leite desidratado - Titulação com NaOH 0,1 mol/L até pH 8,4 de massa de amostra reconstituída correspondente a 10 g de sólidos não gordurosos) Método B: FIL/IDF 81:1981 (Método de Rotina para leite desidratado – Titulação com NaOH 0,1 mol/L na presença de indicador fenolftaleína de massa da amostra reconstituída, correspondente a 10 g de sólidos não gordurosos)	ISO 6091/IDF 86:2010 (Método de Referência para leite desidratado - Titulação com NaOH 0,1 mol/L até pH 8,40 de massa de amostra reconstituída correspondente a 5 g de sólidos não gordurosos) Cancela e substitui FIL/IDF 86:1981 (ISO,2010) IDF 81:1981 (Método de Rotina para leite desidratado – Titulação com NaOH 0,1 mol/L na presença de indicador fenolftaleína de massa da amostra reconstituída, correspondente a 10 g de sólidos não gordurosos) (IDF, 1981)
Índice de solubilidade	FIL/IDF 81:1981 (Método de Rotina para leite desidratado – Titulação com NaOH 0,1 mol/L na presença de indicador fenolftaleína de massa da amostra reconstituída, correspondente a 10 g de sólidos não gordurosos)*	Método único: FIL/IDF 129A:1988 (Determinação do índice de insolubilidade para leite desidratado)	ISO 8156/IDF 129:2005 (Determinação do índice de insolubilidade para leite desidratado) Cancela e substitui FIL/IDF 129A:1988 (ISO, 2005 a)
Leite de alto tratamento térmico	FIL/IDF 129A:1988 (Determinação do índice de insolubilidade para leite desidratado)*	-	-
Partículas queimadas	ADMI 916	Método A: ADMI 916 (Water Disc para leite desidratado - Reconstituição da amostra, posterior filtração em discos de algodão e comparação com discos padrões)	-

*Erro identificado na portaria 146 de 1996: o método FIL 81:1981 refere-se a acidez titulável e não ao índice de solubilidade e o método FIL 129A:1988 refere-se ao índice de insolubilidade e não ao leite de alto tratamento térmico.

Com relação às cinzas, os valores não são estabelecidos pelo PIQ, mas são importantes determinações para a rotulagem nutricional obrigatória. O conteúdo de cinzas é estabelecido pelo método resíduo mineral fixo que fundamenta-se na eliminação da matéria orgânica a temperatura de 550 °C, sendo o produto obtido denominado de resíduo mineral fixo (MAPA, 2006).

O teor de cinzas representa o conteúdo mineral total em alimentos. A incineração é o primeiro passo na preparação de uma amostra de um alimento para específica análise. Água e compostos voláteis são vaporizados e as substâncias orgânicas são queimadas na presença de oxigênio do ar para dióxido de carbono e óxidos de nitrogênio. A maioria dos minerais são convertidos em óxidos, sulfatos, fosfatos, cloretos e silicatos. A incineração seca convencional é realizada em muflas, e apresenta a vantagem de ser um método seguro, não requerer adição de reagentes ou subtração em branco, e de demandar pouca atenção uma vez que a incineração tenha sido iniciada. Além disso, um grande número de cadinhos pode ser tratado de uma só vez e as cinzas resultantes podem ser utilizadas adicionalmente em outras análises para a maioria dos elementos individuais (NIELSEN, 2010).

3.1.5 Estudos de embalagens para estabilidade de leite em pó

A estabilidade é uma característica extremamente desejável em alimentos. Ao adquirir um produto, o consumidor deseja que ele mantenha a sua qualidade pelo maior tempo possível, tanto do ponto de vista sensorial, quanto do microbiológico. Termodinamicamente, um material estável é aquele que se encontra em equilíbrio com as condições de temperatura e pressão do ambiente, de forma que ele não apresente alterações em seu estado físico ao longo do tempo (LEITE *et al.*, 2005).

A vida de prateleira de leite em pó integral depende claramente do tratamento de pré-aquecimento do leite, da atividade de água do produto e da temperatura de armazenamento (STAPELFELDT *et al.*, 1997).

Apenas o conhecimento do teor de umidade não é suficiente para prever a estabilidade de um alimento. A disponibilidade da água para a atividade microbiológica, enzimática ou química é que determina a vida de prateleira de um alimento, e isso é medido pela atividade de água (A_a), também conhecida como pressão de vapor relativa (PVR) (FELLOWS, 2006).

Uma proporção do total de água está fortemente ligada a pontos específicos (grupos hidroxila de polissacarídeos, grupos carbonila e amino de proteínas e pontes de hidrogênio) e, quando todos esses pontos estão ocupados por água absorvida, o teor de umidade é chamado de valor de monocamada de BET (Brunauer-Emmett-

Teller), o que acontece com o leite integral seco em secador de *spray*, cujo teor de umidade é próximo a 3 % (FELLOWS, 2006).

O valor de monocamada de BET representa o teor de umidade no qual o alimento está em seu estado mais estável. Em teores de umidade abaixo desse nível, ocorre uma maior taxa de oxidação lipídica, devido à concentração dos catalisadores, hidroperóxidos e maior ação dos radicais livres. Acima do valor de monocamada de BET, antioxidantes e agentes quelantes (que seqüestram catalisadores de metal residual) tornam-se solúveis e reduzem a taxa de oxidação. Em valores de A_a mais altos, a atividade catalítica dos metais é reduzida por hidratação e formação de hidróxidos, porém, em valores muito altos, catalisadores de metal tornam-se solúveis, e a estrutura do alimento incha-se para expor pontos mais reativos (FELLOWS, 2006).

Em A_a baixa, a mobilidade dos reagentes é restrita e o escurecimento por Maillard é reduzido. Já em A_a mais altas (0,65), ele atinge seu máximo, sendo que, em A_a elevadas (acima de 0,75) a água dilui os reagentes e a taxa de escurecimento cai. A atividade enzimática praticamente cessa em valores de A_a abaixo do valor de monocamada de BET, devido à baixa mobilidade do substrato e sua inabilidade para difundir-se até o ponto reativo da enzima (FELLOWS, 2006).

A autooxidação da gordura é uma reação química que afeta os ácidos graxos insaturados livres ou esterificados, sendo os principais produtos da reação os hidroperóxidos. Apesar de não possuírem aroma, são instáveis e degradam-se formando numerosas substâncias, como carbonilas insaturadas de C-6 e C-11, aldeídos, cetonas e alguns ácidos e álcoois, provocando ranço. Essa reação depende de oxigênio, sendo catalisadas pela luz, pelo calor e por metais como ferro e cobre (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Para aumentar a vida útil de alimentos processados como o leite em pó, as embalagens devem fornecer proteção contra a ação de agentes externos como umidade, oxigênio (GÁLIC *et al.*, 2011), luz, danos mecânicos durante o manuseio, estocagem e transporte, microrganismos, insetos e sujidades (FELLOWS, 2006). Tradicionalmente, o leite em pó integral, desnatado e modificado tem sido acondicionado em embalagens metálicas (ALVES *et al.*, 2008).

As embalagens metálicas flexíveis podem ser revestidas externamente por filmes de politereftalato de etileno (PET), PET revestido com copolímero de

policloreto de vinilideno (PVDC) ou metalizado, poliamida orientada (OPA) e polipropileno biorientado (BOPP). Já a camada interna pode ser composta de polietileno de baixa densidade linear (PEBDL), polietileno de baixa densidade (PEBD), copolímero de etileno acetato de vinila (EVA), metaloceno ou polipropileno (PP). A folha de alumínio também pode ser incorporada à estrutura para aumentar a barreira a gases, além de proporcionar rigidez, barreira ao vapor d'água e à luz (COLTRO *et al.*, 2002).

As embalagens contendo PET metalizados e BOPP apresentam boas propriedades mecânicas e de barreira a gases e a umidade e, portanto, são excelentes opções para conferir propriedades de barreira a materiais laminados com espessura total reduzida (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Dependendo das condições reacionais e do sistema catalítico empregado na polimerização, cinco tipos diferentes de polietileno podem ser produzidos: PEBD, PEBDL, polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM), polietileno de ultra baixa densidade (PEUBD). O PEBD tem uma combinação única de propriedades: tenacidade, alta resistência ao impacto, alta flexibilidade, boa processabilidade, estabilidade e propriedades elétricas notáveis. A permeabilidade à água do PEBD é baixa quando comparada a de outros polímeros (COUTINHO *et al.*, 2003).

A gordura presente no leite em pó integral (mínimo de 26 %) reage rapidamente com o oxigênio disponível no interior da embalagem, numa reação em cadeia que pode ser favorecida pela ação catalítica da luz. Há formação de peróxidos e de produtos de sua decomposição, que dão origem a compostos voláteis responsáveis pelo sabor e odor rançosos que comprometem a qualidade sensorial do produto. Para controlar esse processo oxidativo deve-se evitar a incidência de luz e a presença de oxigênio no interior da embalagem (atmosfera inertizada) (ALVES *et al.*, 2008).

CAMPOS *et al.* (1998) utilizaram embalagens metálicas flexíveis, constituídas de verniz, tintas, poliéster, metalização, adesivo e filme de polietileno de baixa densidade (PEBD), para leite em pó, empregando atmosfera normal e modificada (inertização de nitrogênio com cerca de 1 e 4 % de oxigênio residual), durante 12 meses de armazenamento. Aumento da acidez e da umidade foi observado com o tempo de estocagem, provavelmente, devido às reações químicas de oxidação do

produto e à taxa de permeabilidade ao oxigênio pela embalagem. Com relação ao processo oxidativo, os níveis de peróxidos, atingiram pico máximo aos 120 dias de armazenamento e decaíram até os níveis da fase inicial, aos 365 dias. Não houve diferença significativa nos valores de acidez, umidade e peróxidos para os diferentes tratamentos empregados. Desta forma, os autores concluíram que não houve necessidade de inertização com nitrogênio nesse tipo de embalagem, sob temperatura ambiente e umidade relativa médias de 18,21 °C e 79,6 %, respectivamente, num período de 12 meses.

ALVES *et al.* (2000) estudaram três tipos de materiais flexíveis para cappuccino: PET/PEBD/Al (alumínio)/PEBD; PET metalizado de alta barreira (PET metAB)/PEBDL (polietileno de baixa densidade linear) e PET metalizado/PEBDL, em *sachet* convencional e *stand up*. Foi evidenciado que a substituição de laminado com folha de alumínio, que apresenta excelente barreira ao vapor d'água, por estruturas de PET metalizado, só seria viável se fossem aceites maiores teores de umidade no final da vida útil. O período de vida útil do cappuccino em embalagem *sachet* estrutura PET met AB/PEBDL, a 30 °C e 80 %UR, foi de oito a nove meses para o *cappuccino* tradicional e superior a um ano para o *cappuccino diet*.

ROMEU-NADAL *et al.* (2007) analisaram três diferentes fórmulas de leite em pó, uma sem suplementação de ácidos graxos e as outras duas com diferentes níveis de suplementação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), acondicionadas em embalagens de alumínio de 400 g inertizadas com nitrogênio e avaliaram a estabilidade à oxidação da fração lipídica. As fórmulas foram armazenadas em temperaturas controladas (25 e 37 °C) durante 15 meses. A validade do leite em pó integral foi afetada pelo conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, temperatura e tempo de armazenamento. A relativa estabilidade das fórmulas foi medida como hidroperóxidos, tempo lag dos compostos voláteis e análise sensorial. A fórmula sem suplementação apresentou melhor estabilidade a 25 °C seguida da fórmula suplementada com 0,83 e 0,47 % de n-3 e n-6 PUFA, respectivamente. As fórmulas suplementadas com 27,8 e 3,51 % de n-3 e n-6 PUFA, respectivamente, obtiveram a menor estabilidade, sendo que as embalagens armazenadas a 37 °C tiveram alterações maiores que aquelas armazenadas a 25 °C.

ALVES *et al.* (2008) compararam o desempenho de dois tipos de estruturas flexíveis: PET metalizado/PEBD e PET/polipropileno biorientado (BOPP)

metalizado/PEBD, em relação à embalagem metálica (lata de aço), quanto à manutenção da qualidade de leite em pó integral durante estocagem em três condições controladas de temperatura e umidade relativa. A embalagem metálica apresentou melhor desempenho, ou seja, o produto se manteve aceitável durante 12 meses, independente da condição de estocagem. Os resultados indicaram que a estrutura flexível PETmet/PEBD ofereceu melhor proteção ao leite em pó integral na condição de estocagem com baixa umidade relativa (50 a 75 %), enquanto a embalagem PET/BOPPmet/PEBD apresentou melhor desempenho sob condição ambiente com umidade relativa elevada (75 a 90 %).

FONSECA (2010) avaliou o efeito do tempo de armazenamento nas características microbiológicas, físico-químicas, bioquímicas e físicas tanto do leite de cabra *in natura* como do leite de cabra em pó, além dos efeitos sobre a qualidade e estabilidade deste utilizando embalagens do tipo pouche (bolsa com múltiplas camadas de material laminado e flexível, com 3 a 4 soldas). As embalagens eram compostas por poliéster (PET) metalizado e tereftalato de etileno (Poli) 45, densidade de 70 g/m², com aplicação de vácuo e atmosfera modificada para o leite em pó, armazenadas em estufa a 25 °C, por até 180 dias. Houve uma redução significativa da quantidade de gordura, embora não tenha sido observado efeito na umidade durante o período de armazenamento, sugerindo que a embalagem flexível utilizada foi eficiente como barreira ao vapor d'água do ambiente.

3.2 MATERIAIS DE REFERÊNCIA

3.2.1 Sistemas de gestão de qualidade em laboratórios (SGQ)

Para garantir o fornecimento de produtos e serviços com eficiência, sem falhas e com perdas progressivamente menores é essencial à implementação de SGQ nas organizações (RODRIGUES & ALBANO, 2011).

A qualidade, enquanto conceito, evoluiu da adequação ao padrão para a adequação às necessidades dos clientes. Naturalmente, que a GQ acompanhou esta evolução e deixou de ser direcionada ao “chão da fábrica”, passando a envolver todos os processos da organização. Assim, a gestão pela qualidade total tornou-se uma importante opção para as organizações conquistarem vantagens competitivas (MARTINS & NETO, 1998). A GQ abrange as ações utilizadas para dirigir e controlar a qualidade de uma organização, no que diz respeito à qualidade (ABNT, 2005 b), incluindo a determinação de uma política e de objetivos da qualidade, com o uso de indicadores e metas (CHAVES, 2010).

Desta forma, os oito princípios que servem como base para as normas de SGQ são: foco no cliente, liderança, envolvimento das pessoas, abordagem de processo, abordagem sistêmica para a gestão, melhoria contínua, abordagem factual para tomada de decisão e benefícios mútuos nas relações com os fornecedores (ABNT, 2005 b).

Informações analíticas são pré-requisitos para conclusões e tomadas de decisão em todas as áreas de investigação científica. Em particular, nas pesquisas e ciências regulamentares, incluindo aquelas que lidam a longo prazo com estudos nutricionais, toxicológicos e ambientais, requerendo a intercomparabilidade dos dados entre laboratórios (IHNAT, 2000).

O valor das medições químicas depende do nível de confiança que pode ser estabelecido nos resultados. De maneira crescente, a comunidade de analistas químicos está adotando princípios de SGQ, que elevam a possibilidade de obtenção de resultados bem fundamentados e adequados ao fim pretendido. Um SGQ apropriado pode permitir que um laboratório demonstre competência técnica para um determinado escopo analítico. Contudo, é importante que tanto os laboratórios

quanto seus clientes entendam que um SGQ não pode garantir que 100 % dos resultados individuais sejam confiáveis. Existem duas razões para isto: i) lapsos/erros grosseiros que podem ocorrer, quando, por exemplo, os resultados de duas amostras forem confundidos; ii) erros aleatórios e sistemáticos, que levam à incerteza no resultado medido. A probabilidade de um resultado se situar dentro da faixa de incerteza declarada depende do nível de confiança empregado. Desta forma, mesmo em um laboratório bem organizado, desvios nos resultados irão ocasionalmente ocorrer. Assim, tarefa do SGQ é administrar a frequência das falhas de qualidade. É necessário equilibrar o custo da GQ com o benefício na redução das falhas de qualidade a um nível aceitável (diferente de zero) (CITAC/EURACHEM, 2002).

Princípios de SGQ são formalizados em normas específicas para laboratórios, como: a ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005 b) aplicável a laboratórios de prestação de serviços; a NM ISO 15189 (ABNT, 2008) específica para laboratórios de prestação de serviços na área clínica; e a norma de Boas Práticas de Laboratórios (BPL) que abrange processos organizacionais e as condições nas quais estudos não clínicos de saúde e de segurança ao meio ambiente são planejados, desenvolvidos, monitorados, registrados, arquivados e relatados (INMETRO, 2009). Estas normas representam a síntese da experiência acumulada em todo o mundo em avaliações e na demonstração da competência de laboratórios e contêm requisitos de direção e técnicos que devem ser atendidos pelos laboratórios para implementação e manutenção de um SGQ laboratorial adequado.

A ISO/IEC 17025, por exemplo, tem como requisitos de direção: organização; sistema de gestão; controle de documentos; análise de pedidos, propostas e contratos; subcontratação; aquisições; atendimento ao cliente; reclamações; controle de trabalhos não-conformes; melhoria; ações corretivas; ações preventivas; controle de registros; auditorias internas; e análise crítica pela direção. Os requisitos técnicos abordados nesta norma são: pessoal; acomodações e condições ambientais; métodos e validação de métodos; equipamentos; rastreabilidade da medição; amostragem; manuseio de itens (amostras); garantia da qualidade de resultados; e apresentação dos resultados (ABNT, 2005 b). Todos os requisitos exigidos pela norma são tidos como essenciais e estão integrados no âmbito de SGQ dos laboratórios e de processos de acreditação. Desta forma, embora os objetivos

específicos de ferramentas como validação de métodos, controle de qualidade interno e participação em programas de comparação interlaboratorial ou ensaios de proficiência sejam diferentes, estas ferramentas possuem características complementares no processo de garantia da confiabilidade e comparabilidade dos resultados.

3.2.2 Definições e aplicações

A constante busca em garantir a qualidade e confiabilidade de uma medição obtida por meio de ensaios analíticos é o alvo prioritário dos laboratórios nos dias de hoje (CARDOSO *et al.*, 2010). Neste contexto, o desenvolvimento de sistemas de controle de qualidade pelos laboratórios pode ajudar a garantir a validade da medição analítica e a qualidade dos dados, aumentando a confiabilidade (PUWASTIEN *et al.*, 2009). Uma ferramenta indicada para este objetivo é o uso de MR ou MRC, que apresentam como características essenciais homogeneidade e estabilidade conhecida (CARDOSO *et al.*, 2010).

MR é um material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método, na atribuição de valores a materiais (ABNT, 2011), e para fins controle de qualidade interno e garantia da qualidade externa (ensaios de proficiência) (INMETRO, 2010).

Os MR podem ser caracterizados para “identidade” (ex: estrutura química, tipo de fibra, espécies microbiológicas, etc.) ou para “valores de propriedades” (ex: quantidade de substância química específica, dureza, etc.). Alguns tipos de materiais de referência comumente encontrados são: i) substâncias puras caracterizadas para pureza química e/ou traços de impureza; ii) soluções padrão e misturas gasosas, freqüentemente preparadas gravimetricamente a partir de substâncias puras e usadas para fins de calibração; iii) materiais de referência em matrizes, caracterizados para a composição de componentes químicos principais, secundários ou elementos-traço. Tais materiais podem ser preparados a partir de matrizes contendo os componentes de interesse ou através da preparação de misturas sintéticas; iv) materiais de referência físico-químicos caracterizados para propriedades tais como ponto de fusão, viscosidade e densidade óptica; v) objetos

ou artefatos de referência caracterizados para propriedades funcionais tais como sabor, odor, octanagem, ponto de fulgor e dureza. Este tipo também inclui espécimes microscópicos caracterizados para propriedades que vão de tipo de fibra a espécimes microbiológicos (INMETRO, 2010).

MRC, como o próprio nome já diz, é um MR acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedade, certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido (ABNT, 2011).

Na avaliação da veracidade utilizando um MRC, os valores obtidos pelo laboratório, média e o desvio padrão de uma série de ensaios em replicata, devem ser comparados com o valor da incerteza estimada no certificado do material. Quando o valor obtido não estiver dentro do intervalo da incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las, dependendo do critério definido para os resultados. É, portanto, necessário que haja uma incerteza associada ao valor estabelecido para o MRC para caracterizar a qualidade de um resultado de uma medição (SANTOS *et al.*, 2005). Os valores de propriedade ou valores certificados dos MRC devem ser rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI), sempre que viável. A rastreabilidade é, no entanto, um conceito relativamente novo no campo de medições químicas e como consequência poucos MR químicos são explicitamente rastreáveis ao SI. Uma hierarquia de métodos é, no entanto, usada para atribuir valores de propriedade a materiais (método primário, método de tendência conhecida, métodos independentes ou comparação interlaboratorial) e, mesmo que não esteja declarada, a rastreabilidade pode ser obtida (INMETRO, 2010).

Os MR podem produzir os resultados esperados se estiverem aliados ao conhecimento correto de sua utilização, aplicações e limitações. Muitas vezes, o uso de MR não é adequado, em virtude principalmente de falta de conhecimento dos usuários, podendo-se citar: i) a utilização do MRC em uma faixa de concentração do analito diferente da faixa de aplicação do método; ii) utilização do MRC de matriz analítica diferente do escopo analítico; e iii) utilização do MRC em técnicas analíticas não recomendadas. Somente com o conhecimento adequado dos conceitos metrológicos e estatísticos, aliados à complexidade da química analítica é que os

analistas químicos poderão ter o completo domínio das medições químicas e das suas fontes de incertezas, para realizarem operações que realmente agreguem valor às análises em termos de resultados mais precisos e exatos (ALVES & MORAES, 2002).

3.2.3 Disponibilidade - matrizes alimentares e leite em pó

Existe um número cada vez maior de produtores de MR e a demonstração de sua competência científica e técnica constitui requisito básico para garantir a qualidade dos materiais. A demanda por materiais de melhor qualidade está aumentando como consequência da maior precisão dos equipamentos de medição e da necessidade de dados mais exatos e confiáveis nas disciplinas científicas e tecnológicas. Alguns MR anteriormente aceitos podem não atender a requisitos mais rigorosos. Portanto, é necessário não apenas que os produtores forneçam informações sobre seus materiais na forma de relatórios, certificados e declarações, mas também que demonstrem sua competência na produção de materiais de qualidade apropriada (ABNT, 2004 b).

Infelizmente, não existem MRC ou MR para todas as análises químicas realizadas atualmente em laboratórios. Somente estão disponíveis materiais para as técnicas analíticas mais rotineiramente empregadas e para um número muito pequeno de matrizes (SANTOS *et al.*, 2005). Neste contexto, a demanda por materiais ainda excede a oferta em termos da variedade de materiais e disponibilidade. sendo importante, portanto, que os usuários e os organismos de acreditação estejam atentos a quaisquer limitações dos materiais de referência empregados (INMETRO, 2010).

A incorporação de materiais de composição similar dentro do esquema de análise é um componente essencial de custo-benefício para programas de controle de qualidade, permitindo a transferência de exatidão por métodos de referência bem definidos para o laboratório. Desta forma, em todo mundo, tem aumentado a ênfase na qualidade e intercomparabilidade de dados e na harmonização de métodos, com necessidade de materiais confiáveis como parte integrante do controle da qualidade (IHNAT, 2000).

Do ponto de vista analítico, os alimentos constituem matrizes muitas vezes complexas e difíceis, com espécies químicas importantes que variam significativamente em suas concentrações (de traços a componentes principais). O principal fator limitante para o uso de MRC em laboratórios de análises de alimentos é a sua disponibilidade restrita, considerando as diversas possibilidades de combinações de analitos / níveis de concentração / matrizes a serem analisados (EMONS *et al.*, 2006).

Especificamente, o leite representa um material heterogêneo, cuja composição é altamente afetada por fatores genéticos e ambientais. Além disso, o leite e seus derivados constituem sistemas biológicos muito instáveis, que durante o processamento e armazenamento passam por uma variedade de modificações químicas, biológicas e físicas, as quais muitas vezes não são facilmente previsíveis. Essas reações envolvem mudanças em um ou mais componentes que devem ser cuidadosamente considerados no estabelecimento da autenticidade de produtos lácteos. Falta de experiência na análise de produtos lácteos é outro ponto crítico que pode afetar muito a confiabilidade do controle analítico, mesmo quando métodos consolidados são adotados. Assim, a necessidade de MR ou MRC surge principalmente da necessidade de garantir a confiança suficiente em cada etapa do procedimento analítico, desde ao preparo das amostras até a interpretação dos resultados (NONI, 2004).

Poucos MR são produzidos no mundo relacionados à matriz leite, o que sinaliza para a urgente demanda de esforços econômicos e analíticos no sentido de preparar novos materiais que representem as principais ferramentas analíticas de avaliação de qualidade e autenticidade de leite e produtos lácteos (NONI, 2004).

Não há MR ou MRC disponível de provedor nacional para leite em pó para qualquer escopo analítico. Na **Tabela 11** estão relacionados os MR ou MRC da matriz leite em pó disponíveis nos principais produtores internacionais. O *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS) possui MR para ácido cianúrico e melamina, nitrito e centesimal (umidade, cinzas, gordura total, nitrogênio, acidez titulável e lactose) em leite em pó. O *National Institute of Standards and Technology* (NIST) dispõe de MRC de leite em pó para minerais e lactose, enquanto o *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) possui MRC para minerais, bifenil policlorados (PCB), dioxinas, agrotóxicos, aflatoxina M1 e

parâmetros da composição nutricional. Desta forma, atualmente, somente o IRMM possui MRC e o FAPAS possui MR para parâmetros de PIQ e/ou de composição nutricional de leite em pó.

Dentre os treze materiais para leite em pó disponíveis em provedores internacionais, 23,1 % são de minerais, 15,4 % de agrotóxicos, 7,7 % de dioxinas, 7,7 % de PCB, 7,7 % de aflatoxina, 7,7 % de proteína e gordura, 7,7 % de proteína, gordura, lactose e cinzas, 7,7 % de ácido cianúrico e melamina, 7,7 % de nitrito, e 7,7 % de umidade, cinzas, gordura total, nitrogênio, acidez titulável e lactose, sendo os três últimos MR, ou seja, sem incertezas declaradas. Portanto, existem poucos materiais disponíveis para a matriz leite em pó, sendo apenas dois MRC disponíveis que possuem certificação para parâmetros do PIQ e composição centesimal - proteína, gordura, lactose e cinzas.

Apenas o IRMM declara a embalagem utilizada no acondicionamento dos materiais, ou seja, dos nove MRC produzidos pelo IRMM, 22,2 % são acondicionados em frascos de vidro, 55,6 % em frascos de vidro âmbar (11,1 % com atmosfera de nitrogênio) e 22,2 % em ampolas de vidro com atmosfera de argônio. Com relação à temperatura de armazenamento, apenas o FAPAS disponibiliza essa informação. Portanto, dos três MR produzidos por este provedor, 66,7 % devem ser armazenados à temperatura de -20°C e 33,3 % à temperatura ambiente (composição centesimal).

Tabela 13. Materiais de referência para a matriz leite em pó de provedores internacionais

<i>Material</i>	<i>Provedor</i>	<i>Matriz</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Valores Certificados e Incerteza</i>	<i>Apresenta ção</i>	<i>Disponibili dade</i>	<i>Preço</i>
SRM 1549	NIST	Leite em pó desnatado	Cálcio (%)	1,30 ± 0,05	100 g	Disponível	US\$ 392,00
			Cloro (%)	1,09 ± 0,02			
			Magnésio (%)	0,120 ± 0,003			
			Fósforo (%)	1,06 ± 0,02			
			Potássio (%)	1,69 ± 0,03			
			Sódio (%)	0,497 ± 0,010			
			Enxofre (%)	0,351 ± 0,005			
			Cádmio (mg/kg)	0,0005 ± 0,0002			
			Cloro (mg/kg)	0,0026 ± 0,0007			
			Cobre (mg/kg)	0,7 ± 0,1			
			Iodo (mg/kg)	3,38 ± 0,02			
			Ferro (mg/kg)	1,78 ± 0,10			
			Chumbo (mg/kg)	0,019 ± 0,003			
			Manganês (mg/kg)	0,26 ± 0,06			
			Mercurio (mg/kg)	0,0003 ± 0,0002			
			Selênio (mg/kg)	0,11 ± 0,01			
			Zinco (mg/kg)	46,1 ± 2,2			
			Alumínio (mg/kg)	2			
			Molibdênio (mg/kg)	0,34			
			Antimônio (mg/kg)	0,00027			
			Rubídio (mg/kg)	11			
			Arsênio (mg/kg)	0,0019			
			Silício (mg/kg)	<50			
Bromo (mg/kg)	12						
Prata (mg/kg)	<0,0003						
Cobalto (mg/kg)	0,0041						
Estanho (mg/kg)	<0,02						
Flúor (mg/kg)	0,20						
Lactose (%)	49 ou 45*						
T3034	FAPAS	Leite em pó	Melamina (mg/kg)	2,42 (1,74-3,10)**	50 g	Disponível até 28/04/13	27,00 GBP
			Ácido cianúrico (mg/kg)	3,05 (2,23-3,88)**			
T1583	FAPAS	Leite em pó	Nitrito como Nitrito de Sódio (mg/kg)	10,9 (8,5-13,4)**	40 g	Disponível até 28/09/2013	90,00 GBP
T25103	FAPAS	Leite em pó	Umidade (g/100g)	3,19 (2,84-3,55)	50 g	Disponível até 01/02/2014	45,00 GBP
			Cinzas (g/100g)	5,94 (5,78-6,09)			
			Gordura total (g/100g)	22,50 (21,15-23,86)			
			Nitrogênio (g/100g)	4,36 (4,21-4,52)			
			Acidez Titulável (g/100g)	1,07 (0,88-1,27)			
			Lactose (g/100g)	39,49 (36,97-42,0)			
BCR-063R	IRMM	Leite em pó desnatado	Cálcio (g/kg)	13,49 ± 0,10	Fracos de vidro com 50 g de material em pó	Catálogo de 2013	-
			Coro (g/kg)	9,94 ± 0,30			
			Cobre (mg/kg)	0,602 ± 0,019			
			Ferro (mg/kg)	2,32 ± 0,23			
			Iodo (mg/kg)	0,81 ± 0,05			
			Potássio (g/kg)	17,68 ± 0,19			
			Magnésio (g/kg)	1,263 ± 0,024			
			Nitrogênio (total) (g/kg)	62,3 ± 0,8			
			Sódio (g/kg)	4,37 ± 0,031			
			Fósforo (g/kg)	11,10 ± 0,13			
			Chumbo (µg/kg)	18,5 ± 2,7			
Zinco (mg/kg)	49,0 ± 0,6						
BCR-450	IRMM	Leite em pó	Bifenil policlorados (PCB) (µg/kg)		Fracos de vidro âmbar com 20 g de material	Catálogo de 2013	-
			52	1,16 ± 0,17			
			118	3,3 ± 0,4			
			153	19,0 ± 0,7			
			156	1,62 ± 0,20			
			170	4,8 ± 0,6			
180	11,0 ± 0,7						

Continua

Tabela 11. Materiais de referência para a matriz leite em pó de provedores internacionais (continuação)

<i>Material</i>	<i>Provedor</i>	<i>Matriz</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Valores Certificados e Incerteza</i>	<i>Apresentação</i>	<i>Disponibilidade</i>	<i>Preço</i>
BCR-607	IRMM	Leite em pó	Dioxinas (ng/kg)		Frascos de vidro âmbar com 100 g de material	Catálogo de 2013	-
			2,3,7,8 - T ₄ CDD (D48)	0,25 ± 0,03			
			1,2,3,7,8 - P ₅ CDD (D54)	0,79 ± 0,04			
			1,2,3,4,7,8 - H ₆ CDD (D66)	0,42 ± 0,07			
			1,2,3,6,7,8 - H ₆ CDD (D67)	0,98 ± 0,11			
			1,2,3,7,8,9 - H ₆ CDD (D70)	0,34 ± 0,05			
			2,3,7,8 - T ₄ CDF (F83)	0,05 ± 0,03			
			1,2,3,7,8 - P ₅ CDF (F94)	0,054 ± 0,013			
			2,3,4,7,8 - P ₅ CDF (F114)	1,81 ± 0,13			
			1,2,3,4,7,8 - H ₆ CDF (F118)	0,94 ± 0,04			
			1,2,3,6,7,8 - H ₆ CDF (F121)	1,01 ± 0,09			
			2,3,4,6,7,8 - H ₆ CDF (F130)	1,07 ± 0,05			
			ERM-BD282/283/284	IRMM			
Nível zero	< 0,02						
Nível baixo	0,111 ± 0,018						
Nível alto	0,44 ± 0,06						
BCR-150	IRMM	Leite em pó integral	Cádmio (ng/g)	21,8 ± 1,4	Frascos de vidro com 23 g de material	Catálogo de 2013	-
			Cobre (µg/g)	2,23 ± 0,08			
			Ferro (µg/g)	11,8 ± 0,6			
			Mercúrio (ng/g)	9,4 ± 1,7			
			Iodo (µg/g)	1,29 ± 0,09			
Chumbo (µg/g)	1000 ± 40						
BCR-380R	IRMM	Leite em pó integral	Proteína (Kjeldahl-N x 6,38) (g/100g)	28,66 ± 0,28	Frascos de vidro âmbar com 100 g de material	Catálogo de 2013	-
			Gordura (g/100g)	26,95 ± 0,16			
			Lactose (g/100g)	37,1 ± 1,0			
			Cinzas (g/100g)	6,00 ± 0,13			
BCR-685	IRMM	Leite em pó desnatado	Proteína (Kjeldahl-N x 6,38) (g/100g)	38,2 ± 0,4	Frascos de vidro âmbar com 50 g de material	Catálogo de 2013	-
			Gordura (g/100g)	0,96 ± 0,12			
BCR-187	IRMM	Leite em pó	Agrotóxicos (µg/kg)		Ampolas de vidro com 20 g de material (atmosfera de argônio)	Catálogo de 2013	-
			HCB	1,45 ± 0,21			
			α-HCH	1,80 ± 0,14			
			γ-HCH	5,7 ± 0,8			
BCR-188	IRMM	Leite em pó	Agrotóxicos (µg/kg)		Ampolas de vidro com 20 g de material (atmosfera de argônio)	Catálogo de 2013	-
			HCB	37,4 ± 2,7			
			β-HCH	12,0 ± 1,2			
			γ-HCH	45,4 ± 2,9			
			β-HEPO	32,0 ± 1,9			
			p,p'-DDE	51 ± 4			
			Dieldrin	36,1 ± 2,5			
			Endrin	6,2 ± 0,9			
			p,p'-DDT	69 ± 5			

*= Dependendo do método utilizado; ** = Faixa satisfatória; NIST = *National Institute of Standards and Technology* ; FAPAS = *Food Analysis Performance Assessment Scheme*; IRMM = *Institute for Reference Materials and Measurements*.

3.2.4 Produção, avaliação e uso de MR

Produzir MR e MRC de alta qualidade é uma atividade complexa e que apresenta um custo elevado, e muitas vezes, em termos de custo-benefício os laboratórios optam por adquirir materiais disponíveis de outras fontes. Assim, existem documentos orientativos ou guias referentes à preparação, uso, avaliação e certificação de MR a fim de esclarecer e auxiliar produtores e também laboratórios não especialistas a prepararem os seus próprios materiais (BROOKMAN, 1998; INMETRO, 2010).

Os principais documentos orientativos referentes à preparação, uso, avaliação e certificação de MR estão publicados em uma série de guias da ISO que inclui: i) ISO Guia 30 (ABNT, 2011), que apresenta termos e definições fundamentais relacionados aos MR; ii) ISO Guia 31 (ABNT, 2004 a), que tem por objetivo auxiliar os produtores na elaboração de certificados claros e concisos para acompanhar os MR; iii) ISO Guia 32 (ABNT, 2000), que esclarece sobre o uso de MRC na calibração em química analítica; iv) ISO Guia 33 (ABNT, 2002), que refere-se à utilização de MRC, incluindo recomendações para desenvolver critérios de avaliação da precisão e exatidão de um processo de medição no qual se utiliza um MRC; v) ISO Guia 34 (ABNT, 2004 b), que contém todos os requisitos de direção e técnicos para a implantação de um SGQ de produtores de MR e para seu reconhecimento de competência; e vi) ISO Guia 35 (ABNT, 2012), que trata os princípios gerais e estatísticos para certificação de MR, incluindo aspectos de homogeneidade (entre frascos), estabilidade e repetibilidade (dentro dos frascos ou analítica) para a composição da incerteza global atribuída ao parâmetro certificado do material.

As etapas características da produção de um MRC encontram-se ilustradas na **Figura 1**.

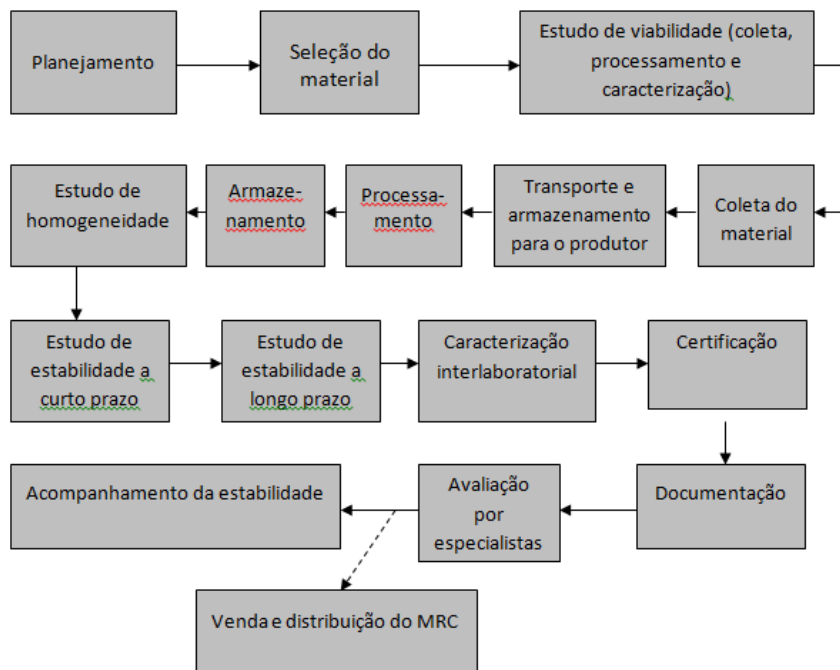


Figura 1. Etapas características da produção de um MRC

Fonte: EMONS *et al.* (2004).

3.2.4.1 Homogeneidade

Estudos de homogeneidade são de fundamental importância em projetos de certificação de lotes para demonstrar que esses são suficientemente homogêneos (ABNT, 2012). Em tais estudos, dois tipos importantes de homogeneidade devem ser considerados. Primeiramente, há a homogeneidade dentro de cada unidade ou frasco que pode ser minimizada com instruções apropriadas para utilização do material como remistura da amostra ou o consumo mínimo de amostra, para o qual a incerteza estabelecida ainda é válida. Um segundo tipo de homogeneidade, entre unidades ou frascos, a qual se refere à variação de unidade para unidade e depende muito da natureza do material (LINSINGER *et al.*, 2001, ABNT, 2012). O elemento comum em ambos os tipos de experimentos é que a separação entre o efeito (homogeneidade) e a variabilidade de medição (analítica) devem ser estabelecidas (LINSINGER *et al.*, 2001).

Teoricamente, um lote é tido como homogêneo se não houver diferença entre os valores de uma dada característica de uma parte para outra. No entanto, na prática, admite-se um limite experimental para a heterogeneidade, havendo a ressalva de que este não seja subestimado por limitações, por exemplo, advindas dos métodos, principalmente se estiverem disponíveis apenas métodos com pouca repetibilidade (ABNT, 2012).

O produtor de MR deve executar uma avaliação da homogeneidade de qualquer candidato a material e, na maioria dos casos, isso envolve a análise de um número representativo de unidades escolhidas do lote produzido empregando um programa de amostragem, que pode ser aleatório simples, aleatório estratificado ou sistemático. De acordo com o ISO Guia 35, o número mínimo de unidades selecionadas aleatoriamente deve ser entre 10 e 30, mas geralmente não deve ser menor que 10. As unidades devem ser aleatoriamente selecionadas do estoque e um delineamento experimental deve ser usado no qual k unidades do material são selecionadas e n replicatas das determinações são efetuadas para cada unidade. Os números k e n devem ser suficientemente grandes para permitir a detecção de falta de homogeneidade a um nível predeterminado. Recomenda-se que as determinações sejam realizadas em ordem, também, aleatória para evitar possíveis variações de tempo sistemáticas (ABNT, 2012).

Neste documento (ABNT, 2012), a incerteza-padrão entre frascos (u_{bb}^2), correspondente à variância entre frascos (s_{bb}^2), é calculada pela diferença entre as variâncias entre (MQ_{Entre}) e dentro (MQ_{Dentro}) dos frascos, obtidas por análise de variância fator único, quando o número de determinações for $n > 1$, dividida pelo número de amostras (n_o) (**Equação 1**). Desta forma, um delineamento ideal seria aquele no qual pudessem ser feitas n subamostragens dos k frascos, seguidas das devidas transformações e determinações em casa subamostra. Neste caso, a MQ_{Entre} incluiria somente a heterogeneidade entre frascos e a MQ_{Dentro} incluiria a incerteza devido à medição, transformação e subamostragem.

$$s_{bb}^2 = u_{bb}^2 = \frac{MQ_{Entre} - MQ_{Dentro}}{n_o} \quad (\text{Eq. 1})$$

No entanto, o Guia 35 (ABNT, 2012) não explicita um critério para avaliação da homogeneidade. Somente considera a contribuição da variação entre frascos

como um componente do erro na estimativa da incerteza do material produzido. Provavelmente, este seja o motivo pelo qual muitos trabalhos que tratam da produção de MR adotam os critérios de avaliação da homogeneidade preconizados para MR destinados a ensaios de proficiência na norma ISO 13528 (ISO, 2005 b) e no protocolo harmonizado pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006).

No documento da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) é estabelecida a necessidade de tratamento de *outliers* (valores dispersos) pelo teste de Cochran (**Equações 2 e 3**), o que não é abordado na norma ISO 13528 (ISO, 2005 b). Porém, a IUPAC não descreve um limite máximo de remoção destes valores.

Assim, a estatística de Cochran (C) é estimada pela razão entre o maior valor dos quadrados das diferenças entre as duplicatas (D_{max}^2) e a soma dos quadrados das diferenças (S_{DD}) (**Equações 2 e 3**).

$$C = \frac{D_{max}^2}{S_{DD}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$S_{DD} = \sum D_i^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

sendo D_i a diferença entre os valores das duplicatas e m o número de pares de duplicatas.

O valor da estatística de Cochran é, então, comparado com os valores críticos tabelados a 95 e 99 % de confiança, e os pares de *outliers* somente são rejeitados para valores de C maiores que os valores críticos a um nível de significância de 99 %.

Neste documento (THOMPSON *et al.*, 2006), é descrito, ainda, um critério para avaliação da repetitividade do método (**Equação 4**), que também não está previsto na norma ISO 13528 (ISO, 2005 b).

$$\frac{\sigma_{an}}{\sigma_p} < 0,5 \quad (\text{Eq. 4})$$

sendo σ_{an} o desvio padrão de repetibilidade e σ_p o desvio padrão do ensaio de proficiência.

Então, para avaliação da homogeneidade suficiente, a variância analítica (s_{an}^2) e a variância amostral (s_{sam}^2) são estimadas pelas **Equações 5 a 7**.

Alternativamente, estas variâncias podem obtidas por análise de variância fator único, como as variâncias dentro dos grupos e entre grupos, respectivamente.

$$s^2_{an} = \frac{\sum D_i^2}{2m} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$s^2_{sam} = \frac{\left(\frac{V_s}{2} - s^2_{an}\right)}{2} \quad (\text{Eq. 6})$$

sendo V_s a variância das somas (**Equação 7**), S_i a soma entre os valores das duplicatas e \bar{S} a média das somas.

$$V_s = \frac{\sum (S_i - \bar{S})^2}{m - 1} \quad (\text{Eq. 7})$$

Finalmente, calcula-se a variância amostral permitida (σ^2_{all}) (**Equação 8**), que é utilizada para estimar o valor crítico (c) (**Equação 9**), sendo F_1 e F_2 valores tabelados. O lote é considerado homogêneo se s^2_{sam} for menor que o valor crítico c .

$$\sigma^2_{all} = (0,3 \times \sigma_p)^2 \quad (\text{Eq. 8})$$

$$c = (F_1 \times \sigma^2_{all}) + (F_2 \times s^2_{an}) \quad (\text{Eq. 9})$$

Considerando a abordagem da ISO 13528 (ISO, 2005 b), primeiramente, são estimadas as médias das replicatas ou porções teste de cada amostra (x_{tk}) e as diferenças entre as porções teste (w), além da média geral ($\bar{x}_{t,k}$) (**Equações 10 a 12**).

$$x_{t,k} = \frac{(x_{t,1} + x_{t,2})}{2} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}| \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\bar{x}_{t,k} = \frac{\sum x_{t,k}}{g} \quad (\text{Eq. 12})$$

onde t representa a amostra ($t=1,2,\dots,g$), k representa a porção tomada para teste ($k=1,2$) e g o número de amostras.

Em seguida, são calculados o desvio padrão das médias das amostras (s_x) e o desvio padrão dentro das amostras (s_w) (**Equações 13 e 14**).

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_{tk} - \bar{x}_{tk})^2}{g-1}} \quad (\text{Eq. 12})$$

$$s_w = \sqrt{\frac{\sum w_t^2}{2 \times g}} \quad (\text{Eq. 13})$$

Finalmente, o desvio padrão entre amostras (s_s) é estimado pela **Equação 14** e o lote é considerado homogêneo se s_s for menor ou igual a $0,3\hat{\sigma}$, sendo $\hat{\sigma}$ o desvio padrão da proficiência.

$$s_s = \sqrt{s_x^2 - \left(\frac{s_w^2}{2}\right)} \quad (\text{Eq. 14})$$

Desta forma, apesar da equivalência nas estimativas das variâncias, os critérios adotados para a homogeneidade diferem entre si. O critério proposto para avaliação da homogeneidade no protocolo harmonizado pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) é mais permissivo do que aquele estabelecido na norma ISO 13528 (ISO, 2005 b). Este último, corresponde ao critério definido na versão anterior do documento da IUPAC (THOMPSON & WOOD, 1993). Tal alteração no critério da IUPAC é originária de um trabalho de FEARN & THOMPSON (2001), no qual os autores argumentam que, devido à homogeneidade suficiente ser uma premissa razoável e o custo dos testes de homogeneidade ser frequentemente alto, seria mais sensato enfatizar a prevenção de erros tipo I (rejeição de um material satisfatório).

3.2.4.2 Estabilidade

Considerando que os alimentos são misturas complexas, a estabilidade dos analitos e as propriedades dos componentes da matriz devem ser levadas em conta durante a preparação, armazenamento, transporte e análise do MR. Geralmente, os MR são secos para evitar alterações químicas e microbiológicas, o que pode ser feito por aquecimento ou por liofilização, em função da volatilidade dos analitos e

dos componentes da matriz. Alguns materiais podem ser esterilizados por irradiação, mas deve-se considerar que a irradiação destrói substâncias orgânicas, tais como agrotóxicos. O congelamento é simples e fácil, mas não é muito prático devido à dificuldade de transporte (MAIER *et al.*, 1993).

O teste de estabilidade, juntamente com o teste de homogeneidade, é crucial para o processo de avaliação e certificação de um MR. O valor da propriedade a ser medido em um MR deve ser constante durante toda a validade do material. Outro requisito é que durante o transporte, sob condições a serem especificadas, a estabilidade do material deve ser garantida pelo produtor. Por exemplo, efeitos da luz, umidade e temperatura devem ser avaliados em função do tempo para estimar um tempo de vida do MR e, conseqüentemente, estabelecer um período de validade do certificado, no caso de MRC (VAN DER VEEN *et al.*, 2001).

Considerando o ISO Guia 34 (ABNT, 2004 b), quando apropriado, uma avaliação da estabilidade do material de referência deve ser executada em intervalos periódicos depois da caracterização, para confirmar que todos os valores são mantidos desde a produção até a data de vencimento. Os testes de estabilidade, contudo, só devem ser realizados após ter sido demonstrada a homogeneidade suficiente. Por isto, não há restrição em relação à quantidade de número de amostras, nem necessidade de escolhê-las aleatoriamente.

De acordo com o ISO Guia 35 (ABNT, 2012), há dois tipos de estabilidade/instabilidade a serem consideradas na certificação de materiais: a estabilidade a longo prazo (por exemplo o tempo de prateleira) e a estabilidade a curto prazo (por exemplo, estabilidade do material sob condições de transporte). Desta forma, quando não for possível manter as condições apropriadas relativas à estabilidade durante o transporte, é recomendado que seja considerada uma incerteza extra nos valores de propriedade certificados. Além disto, durante a vida útil do material certificado, convém que seja demonstrada a validade da incerteza no certificado.

Desta forma, existem dois leiautes básicos para os estudos de estabilidade: o estudo clássico e o estudo isócrono. No primeiro, amostras individuais preparadas ao mesmo tempo, sob condições idênticas, são avaliadas no decorrer do tempo, ou seja, sob condições de reprodutibilidade. Já no estudo isócrono as medições ocorrem em condições de repetibilidade, ou seja, todas as medições ocorrem ao

mesmo tempo, o que reduz a dispersão dos pontos ao longo do tempo levando a uma incerteza menor do que o estudo clássico. Isto porque a instabilidade do sistema de medição também será incluída, dependendo da diferença entre repetibilidade e reprodutibilidade das medições (ABNT, 2012).

No ISO Guia 35 (ABNT, 2012) é estabelecida como a primeira etapa para o estudo da estabilidade a análise de tendência nos dados. A aproximação linear é descrita como o modelo adequado, se existirem pequenos problemas de instabilidade com mecanismos cinéticos desconhecidos (**Equação 15**). Nos casos em que um mecanismo bem definido é a razão para a instabilidade, tal modelo deve ser preferido ao modelo linear (empírico). Independentemente do modelo, teste de F deve ser conduzido para testar a significância da tendência. Neste guia são apresentadas duas proposições para casos de ausência de modelos bem definidos: uma pela estimativa da significância da inclinação (b_1) e outra pela avaliação da significância da regressão obtida por análise de variância da regressão linear (**Tabela 12**).

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i \quad (\text{Eq. 15})$$

sendo β_0 e β_1 os coeficientes de regressão, ε o componente do erro aleatório, que pode ser composto apenas do erro aleatório ou pode conter um ou mais fatores sistemáticos, X o tempo e Y o valor de propriedade do candidato a MRC.

As **Equações 16 a 19** podem ser utilizadas como estimadores para b_1 , interseção (b_0) e desvio padrão da inclinação (s_{b_1}).

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (\text{Eq. 16})$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} \quad (\text{Eq. 17})$$

$$s_{b1} = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (\text{Eq. 18})$$

sendo

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n-2}} \quad (\text{Eq. 19})$$

Desta forma, com base no s_{b1} e em um fator t com $n-2$ graus de liberdade, b_1 pode ser testada quanto à significância. Alternativamente, a avaliação pode ser conduzida pela análise de variância da regressão (**Tabela 12**). Neste caso, a estatística F calculada pode ser testada quanto à significância.

Tabela 12. Análise da variância para regressão linear

<i>Fonte de variação</i>	<i>Graus de liberdade (GL)</i>	<i>Soma quadrática (SQ)</i>	<i>Média quadrática (MQ)</i>	<i>F</i>
Devido à regressão	1	$\sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	$\frac{SQ_{reg}}{GL_{reg}}$	$\frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}}$
Sobre a regressão (residual)	n-2	$\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2$	$\frac{SQ_{res}}{GL_{res}}$	
Total	n-1	$\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$		

No ISO Guia 35 (ABNT, 2012) são relacionados os componentes de incerteza para uma medição individual em um experimento de estabilidade, na ausência de tendência: repetibilidade da medição; instabilidade do material; instabilidade do sistema de medição (no planejamento clássico); aspectos de reprodutibilidade (operador, equipamento), inclusive calibração (no planejamento clássico) e homogeneidade entre frascos (em certificação de lotes). Tal abordagem se faz necessária para a avaliação da incerteza no monitoramento da estabilidade após a certificação.

Para estimativa da incerteza devida à estabilidade a longo prazo (u_{lts}) a **Equação 20** é considerada:

$$u_{lts} = s_{b1} \times T \quad (\text{Eq. 20})$$

sendo T o tempo do estudo de estabilidade.

O critério de avaliação para verificação da estabilidade da ISO 13528 (ISO, 2005 b) define a comparação da média geral dos valores obtidos no teste de homogeneidade ($x_{t,k}$) com a média geral obtida no teste de estabilidade ($y_{t,k}$), sendo consideradas estáveis as amostras que se enquadrarem no critério definido pela **Equação 21**:

$$|\bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \hat{\sigma} \quad (\text{Eq. 21})$$

Considerando a IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), a comparação das médias dos grupos controle (\bar{X}_c) e experimental (\bar{X}_e) pode ser conduzida de duas formas: pelo emprego do teste de t com variância combinada ou pelo critério definido na **Equação 22**:

$$|\bar{x}_c - \bar{y}_e| \leq 0,1 \times \sigma_p \quad (\text{Eq. 22})$$

Portanto, o critério de estabilidade do protocolo da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) é mais rigoroso que o definido na norma ISO 13528 (ISO, 2005 b).

3.2.4.3 Caracterização de um MRC

O estabelecimento de um modelo apropriado para um valor de propriedade de um candidato a MRC constitui tarefa complexa. Um dos requisitos básicos do modelo consiste em incluir todos os fatores que poderiam contribuir de forma significativa para a incerteza associada aos valores de propriedade do MRC. Portanto, para ser completa, a incerteza-padrão combinada deve considerar a homogeneidade, ambas as estabilidades, a curto e longo prazo, além da incerteza do valor certificado obtida na caracterização. É importante considerar que a avaliação da incerteza não visa levar em conta acidentes, erros, uso impróprio, transporte inadequado do MRC.

Espera-se que os valores certificados não estejam desviados do valor verdadeiro mais do que a incerteza de medição declarada. Segundo o ISO Guia 34 (ABNT, 2004 b) quatro abordagens básicas podem ser implementadas para a caracterização de um material: medição por meio de um método primário único em um único laboratório, medição por meio de dois ou mais métodos de referência independentes em um laboratório, medição por meio de uma rede de laboratórios empregando um ou mais métodos com veracidade demonstrável, e uma abordagem com método específico em uma rede de laboratórios.

Assim, o valor de propriedade de um MRC (X_{MRC}) será expresso pela **Equação 23**:

$$X_{MRC} = x_{Car} + \delta x_{bb} + \delta x_{lts} + \delta x_{sts} \quad (\text{Eq. 23})$$

O X_{MRC} corresponderá ao valor de propriedade obtido na caracterização do material (x_{Car}), visto que os componentes de erros devidos à variação entre frascos (δx_{bb}) instabilidade a longo prazo (δx_{lts}) e instabilidade a curto prazo (δx_{sts}) normalmente são iguais a zero. No entanto, a incerteza destes componentes não é nula e, assumindo a independência das variáveis, a incerteza-padrão associada ao valor de propriedade (u_{MRC}) será expressa conforme definido na **Equação 24**:

$$u_{MRC} = k \sqrt{u_{Car}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2} \quad (\text{Eq. 24})$$

sendo u_{Car} , u_{bb} , u_{lts} e u_{sts} as incertezas-padrão devidas à caracterização, homogeneidade, estabilidade a longo prazo e estabilidade a curto prazo, respectivamente, e k o fator de abrangência, o qual dependente da função de distribuição pressuposta para o valor de propriedade (frequentemente normal) e do nível de confiança (frequentemente 95 %). Vale ressaltar que as condições de transporte do material podem ser escolhidas de forma que a incerteza relacionada a estabilidade a curto prazo não precise ser levada em consideração (ABNT, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- a) Agitador de tubos (Phoenix AP56).
- b) Balança analítica, com resolução 0,0001 g e capacidade máxima de 220,0000 g, calibrada por laboratório acreditado pela Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0045 (Shimadzu AUX 220).
- c) Banho-maria, com temperatura monitorada por termômetro externo calibrado (Nova Ética 314-8DN).
- d) Centrífuga universal de Gerber para Mojonnier, com aquecimento (Gerber Instruments Universal).
- e) Estufa comum, com circulação de ar, com temperatura monitorada por termômetro externo calibrado (Quimis Q-314M242).
- f) Mufla (Coel UL 1400).
- g) Placa aquecedora, com temperatura monitorada por termômetro externo calibrado (Fisatom 752^a).
- h) Refrigerador, com temperatura monitorada por termômetro externo calibrado.
- i) Congelador, com temperatura monitorada por termômetro externo calibrado.
- j) Seladora (EZ Home 201).
- k) Sistema de purificação de água (Millipore Direct Q 3UV).
- l) Termômetros digitais tipo cabo sensor, com memória de máxima e mínima, calibrados por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0338 (Incotherm 7665.02.0.00).
- m) Termômetros digitais tipo espeto, com memória de máxima e mínima, calibrados por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 0338 (Incotherm).

4.2 MATERIAIS

- a) Balão volumétrico (100, 200 e 500 mL) calibrado por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025
- b) Bastão de vidro.
- c) Béquer (50, 100 e 250 mL).
- d) Béquer de plástico (100 e 250 mL).
- e) Bico de Bunsen.

- f) Bureta graduada de 10 mL com resolução de 0,1 mL com acurácia de 0,05 mL, calibrada por laboratório acreditado pela CGCRE de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob número 3761.12.
- g) Cadinho de porcelana.
- h) Cápsula de porcelana.
- i) Cápsulas de alumínio ou aço inox, com cerca de 23 mm de profundidade e 60 mm de diâmetro, com tampa.
- j) Dessecador.
- k) Erlenmeyer (125 ou 250 mL)
- l) Espátula.
- m) Etiqueta para identificação de solução.
- n) Frasco de extração tipo Mojonnier com rolha.
- o) Frasco de plástico para solução.
- p) Frasco de vidro âmbar para solução.
- q) Frascos de vidro âmbar (100 mL) para acondicionar amostras.
- r) Funil de plástico comum.
- s) Funil de vidro comum.
- t) Lápis.
- u) Luvas de algodão.
- v) Pinça metálica.
- w) Pipeta graduada (1 mL e 2 mL).
- x) Pipeta de Pasteur ou conta-gotas.
- y) Pipeta Kipp (bico de papagaio) (2, 5, 10 e 25 mL).
- z) Pisseta.
- aa) Placa de azulejo.
- bb) Proveta (25 e 50 mL).
- cc) Recipiente para banho de gelo.
- dd) Sachês tipo *stand-up pouch* de PET metalizado/PEBD.
- ee) Suporte para frascos Mojonnier.
- ff) Tripé com suporte (para carbonização da amostra no cadinho).

4.3 REAGENTES

Todos dos reagentes utilizados eram de grau de pureza apropriado.

- a) Água ultra-pura.
- b) Álcool etílico para análise (p.a.) - C_2H_6O .
- c) Biftalato de potássio p.a. - $C_8H_5KO_4$.
- d) Éter de petróleo p.a.

- e) Éter etílico, livre de peróxidos, sem antioxidantes (ou não mais do que 2 mg/kg), compatível com as especificações para o teste em branco. Para testar se o éter encontra-se livre de peróxidos, foi adicionado 1 mL de uma solução de iodeto de potássio a 100 g/L (preparada no momento do uso - 0,1g de iodeto de potássio para 1 mL de água), a 10 mL do éter em um pequeno frasco com tampa de vidro, previamente enxaguado com o mesmo éter. O frasco foi fechado, agitado e deixado em repouso por 1 min. Não houve a formação de coloração amarela em quaisquer das camadas, indicando que o produto estava livre de peróxidos.
- f) Fenolftaleína p.a. - $C_{20}H_{14}O_4$.
- g) Hidróxido de amônio p.a. (solução de amônia contendo aproximadamente 25 % (m/m) de NH_3 , densidade 910 g/L).
- h) Hidróxido de bário p.a. - $Ba(OH)_2$.
- i) Hidróxido de sódio p.a. - $NaOH$.
- j) Iodeto de potássio p.a. - KI .
- k) Sílica (para o dessecador).
- l) Sulfato de cobalto heptahidratado - $CoSO_4 \cdot 7 H_2O$
- m) Vermelho congo p.a.

4.4 AMOSTRAS

Amostras de leite em pó e integral foram fornecidas pela Cooperativa Central de Produtores Rurais de Leite Ltda. (CCPR) Itambé, unidade de Sete Lagoas. Imediatamente após o processamento, 50 kg de leite em pó de um mesmo lote foram homogeneizados na indústria e, em seguida, foram acondicionados em dois sacos de polietileno envolvidos por embalagem de papel *kraft* de 25 kg para transporte da indústria até o Laboratório de Bromatologia – Unidade de Pesquisa Análise de Alimentos (BRO-UPAA). As embalagens foram mantidas sob temperatura ambiente 19 °C a 25 °C até a preparação do material (**Figura 1**).

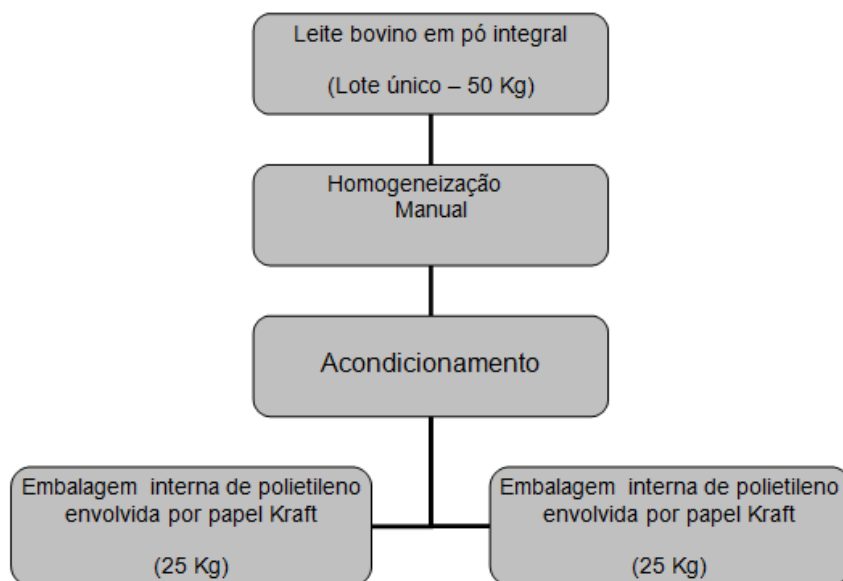


Figura 2. Fluxograma das etapas e condições de preparo da amostra de leite em pó integral na indústria.

4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO LABORATÓRIO

O único MRC disponível no mercado de escopo similar ao do presente trabalho foi adquirido para avaliação do desempenho do BRO-UPAA na execução dos ensaios.

O material foi o BCR 380-R do *Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) - Joint Research Centre/European Commission (JRC/EC)*, fornecido pela Sigma-Aldrich, cujos parâmetros certificados comuns ao escopo deste estudo eram cinzas e gordura, além da umidade, visto que os resultados certificados foram expressos em base seca. O material foi mantido sob refrigeração entre 2 e 8 °C e analisado em triplicata antes do início da caracterização do material (teste de homogeneidade) e a cada bateria analítica para teste da estabilidade. A estatística adotada na avaliação da veracidade foi o índice z-escore, conforme descrito no ISO Guia 33 (ABNT, 2002).

4.6 PRODUÇÃO DOS MATERIAIS

4.6.1 Preparo dos materiais

As amostras de leite em pó acondicionadas nos sacos de 25 kg foram abertas sete dias após a data de fabricação para preparo dos materiais. Os sacos foram destinados ao preparo de dois lotes, sendo o primeiro acondicionado, aleatoriamente, em 210 sachês tipo *stand-up pouch* de 100 g de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade (PET metalizado/PEBD) com zíper. O segundo lote foi acondicionado, aleatoriamente, em 210 frascos de vidro âmbar de 100 g com tampa de rosca. Os sachês foram selados acima do zíper empregando seladora a vácuo EZ HOME 201 e os frascos fechados por rosqueamento das tampas. Os saches e frascos de cada lote foram subdivididos em três sublotes, os quais foram estocados sob diferentes condições de temperatura, incluindo temperatura ambiente (19 a 25 °C), refrigeração (2 a 8 °C) e congelamento (-18 a -24°C), as quais foram monitoradas diariamente com termômetros calibrados (**Figura 3**). A identificação dos sachês e frascos foi feita com etiquetas autoadesivas plastificadas.

Todo o material utilizado no preparo dos MR (como béqueres de plástico, frascos, funis e espátulas) foi previamente lavado e seco, visando evitar contaminações. Para proteção dos materiais em relação à presença de oxigênio, tomou-se o cuidado de remover, manualmente, o ar presente nos espaços livres (*head space*) dos sachês antes de proceder à selagem. No caso dos frascos de vidro, os mesmos foram preenchidos em sua totalidade, visando evitar o espaço livre. Em relação à incidência de luz, ambas as embalagens, promoveram proteção, devido à metalização dos sachês e pigmentação dos frascos, respectivamente. Cuidados com a selagem dos sachês e fechamento adequado das tampas de rosca dos fracos foram tomados também no sentido de proteger em relação à umidade, além das características intrínsecas de barreira à umidade dos dois materiais selecionados.

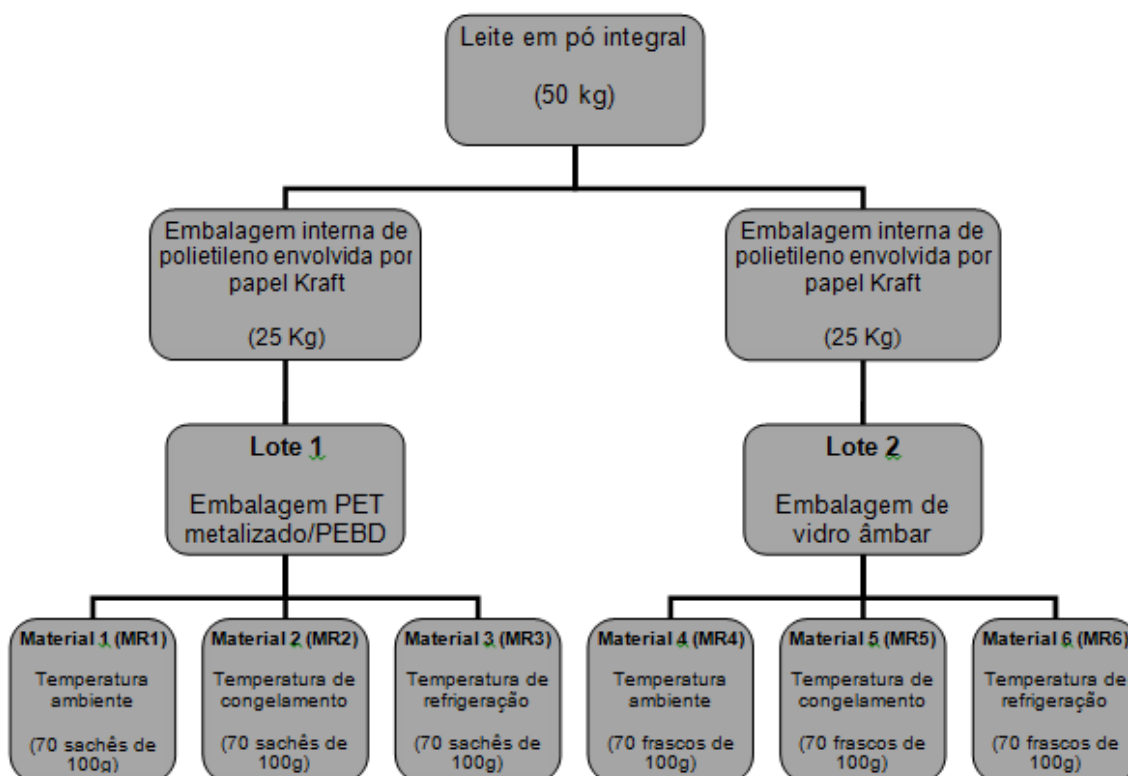


Figura 3. Fluxograma das etapas e condições de preparo dos materiais de referência.

PET metalizado/PEBD: politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade; temperatura ambiente: 19 °C a 25 °C; temperatura de refrigeração: 2 °C a 8 °C; temperatura de congelamento: -18 °C a -24°C.

4.6.2 Testes de homogeneidade

Dez unidades embaladas foram escolhidas, aleatoriamente, de cada lote e analisadas em duplicata para determinação de umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, totalizando 160 determinações (**Figura 4**). Na falta de um critério para avaliação da homogeneidade no ISO Guia 35 (ABNT, 2012), os dados foram analisados conforme estabelecido na norma ISO 13528 (ISO, 2005 b) e no protocolo da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), relacionadas a ensaios de proficiência. Os critérios estatísticos adotados para avaliação da homogeneidade foram comparados.

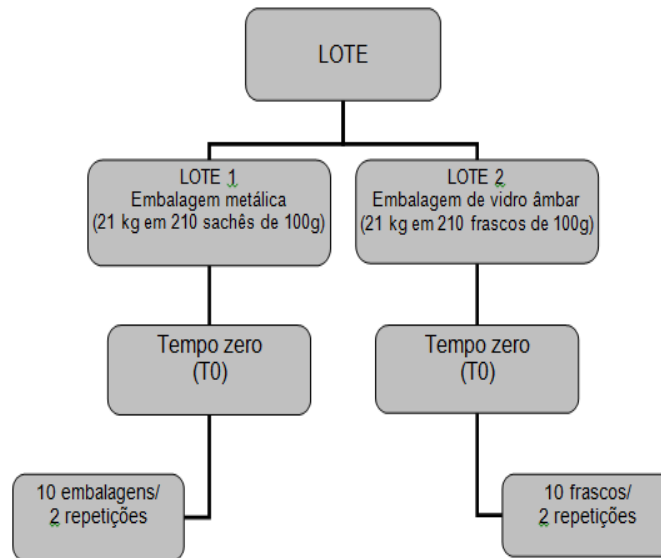


Figura 4. Delineamento experimental para testes de homogeneidade dos lotes produzidos.

4.6.3 Testes de estabilidade

A estabilidade do MR foi verificada ao longo do período de armazenamento. Três unidades de cada MR preparado foram aleatoriamente selecionadas em intervalos de dois, quatro e seis meses e analisadas em duplicata para determinação de umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, totalizando 432 determinações (Figura 5).

A estabilidade do MR preparado foi avaliada pela análise de regressão dos resultados obtidos para cada parâmetro avaliado em função do tempo (em meses), conforme estabelecido no ISO Guia 35 (ABNT, 2012). Primeiramente, foram avaliados os *outliers* pelo teste do resíduo padronizado Jackknife. A estimativa dos parâmetros das curvas analíticas foi conduzida pela aplicação da regressão linear simples, com verificação das seguintes premissas: normalidade (teste de Ryan & Joiner), homocedasticidade (teste de Brown & Forsythe), independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin & Watson), significância da regressão e adequação do ajuste ao modelo linear (testes de F de Snedecor) (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Nos casos em que a regressão/inclinação foi significativa, houve interpretação de que o parâmetro foi alterado com o tempo, ou

seja, o material foi instável. Nos casos em que regressão/inclinação não foi significativa, houve indicação de estabilidade do material até o tempo estudado.

Os dados também foram analisados segundo os critérios estabelecidos na norma ISO 13528 (ISO, 2005 b) e no documento da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), relativos a ensaios de proficiência. Nestes casos, a análise de dados foi conduzida em cada tempo, sendo que a partir do tempo quatro meses foram utilizados os resultados cumulativos.

Os critérios estatísticos aplicados para avaliação da estabilidade foram comparados.

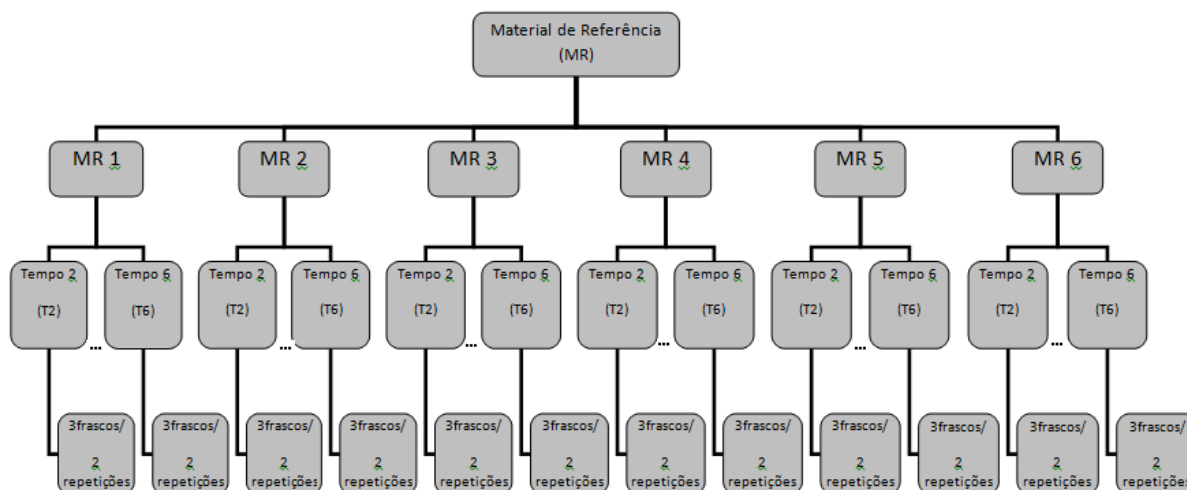


Figura 5. Delineamento experimental para testes de estabilidade dos materiais de referência produzidos.

MR1: material acondicionado em embalagem politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade (PET metalizado/PEBD) e estocado a temperatura ambiente; MR2: material acondicionado em embalagem PET metalizado/PEBD e estocado sob congelamento; MR3: material acondicionado em embalagem PET metalizado/PEBD e estocado sob refrigeração; MR4: material acondicionado em frasco de vidro âmbar e estocado a temperatura ambiente; MR5: material acondicionado em frasco de vidro âmbar e estocado sob congelamento; MR6: material acondicionado em frasco de vidro âmbar e estocado sob refrigeração.

4.7 MÉTODOS DE ENSAIO

Os métodos analíticos adotados para a determinação de umidade, cinzas, gorduras totais e acidez titulável seguiram os procedimentos normalizados pela ISO/IDF e/ou os métodos oficiais publicados pelo MAPA. Para gordura e cinzas foram adotados métodos de referência, contudo, para umidade e acidez titulável foram empregados métodos de rotina, devido à estrutura laboratorial disponível. No entanto, os métodos foram continuamente monitorados em relação à tendência, pelo uso de MRC, conforme descrito em 4.5.

Para análise, os MRC foram retirados das suas respectivas condições de armazenamento, sendo aguardado o tempo necessário para atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, as embalagens foram homogeneizadas manualmente, por inversão de cinco a seis vezes, e abertas para tomada das alíquotas.

4.7.1 Umidade

O método de determinação de umidade por secagem fundamentou-se na remoção de água por aquecimento da amostra entre 100 e 104 °C, em estufa comum (MAPA, 2006).

4.7.1.1. Preparo das cápsulas

As cápsulas de alumínio e respectivas tampas foram identificadas e secas em estufa a 102 ± 2 °C, por 1 h. As tampas foram colocadas nas cápsulas com auxílio de luvas apropriadas. Os conjuntos foram retirados da estufa, cuidadosamente, com auxílio de luvas, e imediatamente transferidos para o dessecador para resfriamento até atingir a temperatura ambiente. Finalmente, os conjuntos foram pesados, sendo registrado o valor até 0,0001 g.

4.7.1.2. Ensaio

A cápsula foi destampada com auxílio de luvas e cerca de 1 g da amostra foram pesados na cápsula previamente preparada, utilizando uma espátula. A

cápsula foi tampada e aquecida em estufa a $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 2 h. A tampa ficou apoiada na borda da respectiva cápsula. Após o tempo de secagem, a cápsula contendo a amostra seca foi tampada e retirada da estufa, cuidadosamente, com auxílio de luvas, transferindo imediatamente para o dessecador. A cápsula contendo a amostra seca foi resfriada até temperatura ambiente no dessecador. Em seguida, a cápsula contendo a amostra seca foi retirada do dessecador, com auxílio de luvas, e pesada, sendo registrado o valor até 0,0001 g. Etapas de aquecimento por 1 h e resfriamento em dessecador por 30 min foram repetidas até massa constante, ou seja, até que a variação entre duas pesagens consecutivas não fosse superior a 0,0010 g.

4.7.1.3 Cálculos

A massa da amostra seca ($M_{AmostraSeca}$), em gramas, foi estimada descontando a massa do conjunto cápsula/tampa vazio ($M_{Capsula/Tampa}$) da massa final (M_{Final}) da cápsula/tampa contendo a amostra seca (**Equação 25**):

$$M_{AmostraSeca} = M_{Final} - M_{Capsula} \quad (25)$$

A massa da água (M_{Agua}), em gramas, foi obtida pela diferença entre a massa da amostra ($M_{Amostra}$), em gramas, e a massa da amostra seca ($M_{AmostraSeca}$) (**Equação 26**):

$$M_{Agua} = M_{Amostra} - M_{AmostraSeca} \quad (26)$$

A porcentagem de umidade (U) foi, finalmente, estimada pela razão entre a massa da água (M_{Agua}) e a massa da amostra ($M_{Amostra}$), multiplicada por 100 (**Equação 27**):

$$U(\%) = \frac{M_{Agua}}{M_{Amostra}} \times 100 \quad (27)$$

4.7.2 Cinzas

O método de determinação das cinzas (resíduo mineral fixo) por incineração fundamentou-se na carbonização da amostra em chama de gás e posterior

incineração da mesma a 550 °C, em mufla, até completa mineralização da matéria orgânica (MAPA, 1996).

4.7.2.1 Preparo dos cadinhos

Os cadinhos foram identificados a lápis e aquecidos em mufla a 550 °C, durante 30 min. Após resfriamento da mufla a 200 °C, os cadinhos foram removidos, cuidadosamente, com auxílio de pinça e utilizando um suporte refratário para apoio. Os cadinhos vazios foram transferidos, imediatamente, para o dessecador e resfriados a temperatura ambiente. Finalmente, os cadinhos foram pesados, sendo registrados os valores até 0,0001 g.

4.7.2.2 Ensaio

Cerca de 5 g da amostra foram pesados no cadinho previamente preparado, utilizando uma espátula. A amostra foi carbonizada no cadinho, em chama de gás, cuidadosamente, para evitar projeções. Em seguida, o cadinho com a amostra carbonizada foi transferido para a mufla a 550 °C, até obtenção de cinzas brancas ou acinzentadas. Após resfriamento da mufla a 200 °C, os cadinhos foram removidos, cuidadosamente, com auxílio de pinça e utilizando um suporte refratário para apoio. Os cadinhos com as cinzas foram transferidos, imediatamente, para o dessecador e resfriados a temperatura ambiente. Finalmente, os cadinhos foram pesados, sendo registrados os valores até 0,0001 g.

4.7.2.3 Cálculos

A massa das cinzas (M_{Cinzas}), em gramas, foi calculada descontado a massa do cadinho vazio ($M_{Cadinho}$) da massa final (M_{Final}) do cadinho contendo as cinzas (**Equação 28**):

$$M_{Cinzas} = M_{Final} - M_{Cadinho} \quad (28)$$

A porcentagem de cinzas (C) foi obtida pela razão entre a massa das cinzas (M_{Cinzas}) e a massa da amostra ($M_{Amostra}$), multiplicada por 100 (**Equação 29**):

$$CI(\%) = \frac{M_{\text{Cinzas}}}{M_{\text{Amostra}}} \times 100 \quad (29)$$

4.7.3 Gordura total

A determinação de gordura baseou-se no uso de hidróxido de amônio para solubilizar a caseína, neutralizar a acidez e reduzir a viscosidade; no álcool etílico para quebrar a emulsão gordura-caseína e na mistura éter etílico-éter de petróleo para extrair a gordura. O éter de petróleo foi usado para diminuir a solubilidade das substâncias não lipídicas, solúveis no éter etílico. A gordura assim extraída foi determinada gravimetricamente (ISO, 2008).

4.7.3.1 Preparo da amostra

Cerca de 1 g de leite em pó integral foi pesado diretamente no frasco de Mojonnier. 10 mL de água ultra pura a $65 \pm 5^\circ\text{C}$ foram adicionados (utilizando bico de papagaio) para levar todo o pó para o bulbo menor do frasco. Em seguida, os frascos foram homogeneizados, utilizando agitador de tubos, até completa dissolução do leite em pó na água.

4.7.3.2 Preparo dos béquers

Os béquers de 250 mL foram levados à estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$, por 1 h. Em seguida, foram retirados da estufa, cuidadosamente, com auxílio de luvas, e imediatamente transferidos para o dessecador para resfriamento até atingir a temperatura ambiente. Finalmente, os béquers foram pesados, sendo registrados os valores até 0,0001 g, e reservados para recepção da gordura extraída das amostras.

4.7.3.3 Ensaio

À amostra previamente dissolvida no frasco de Mojonnier foram adicionados 2 mL da solução de amônia, utilizando bico de papagaio, e homogeneizados manualmente. A partir desse ponto, a análise foi conduzida sem demora. O frasco foi aquecido a $65 \pm 5^\circ\text{C}$ em banho-maria, por 15 a 20 min, com agitação manual

ocasional. Em seguida, o frasco foi resfriado a temperatura ambiente, sob água corrente. 10 mL de álcool etílico foram acrescentados ao frasco, utilizando bico de papagaio, e misturados, cuidadosamente, deixando o líquido fluir entre os dois bulbos, inclinando o frasco sem que o líquido atingisse a abertura do frasco. Adicionou-se, então, 2 gotas de solução de vermelho congo a 1 % e 25 mL de éter etílico ao frasco, utilizando bico de papagaio. O frasco foi fechado com rolha e submetido à agitação manual vigorosa, por 1 min, com o frasco na posição horizontal e o bulbo menor voltado para cima. Em seguida, 25 mL de éter de petróleo foram acrescentados, utilizando bico de papagaio, e o frasco agitado por 30 s, conforme especificado acima. O frasco foi levado à centrífuga por 5 min, com rotação de 80 a 90 x g. O sobrenadante foi transferido para o béquer, previamente preparado, segurando o frasco de extração pelo bulbo menor. 5 mL de álcool etílico foram adicionados ao frasco para prevenir a formação de uma camada aquosa viscosa ou gelificada, além de melhorar a precisão do método. Uma segunda extração foi conduzida utilizando 15 mL dos éteres etílico e de petróleo. E, após centrifugação e transferência do sobrenadante para o béquer, uma terceira extração foi realizada, omitindo o uso do álcool. O frasco foi centrifugado e o sobrenadante transferido para o béquer. Os solventes foram removidos, incluindo o álcool, por evaporação em banho-maria a 40 – 45 °C. O béquer foi levado para a estufa a 102 + 2 °C por 1 h. Após esse tempo o béquer foi retirado da estufa, com auxílio de luvas, transferido para um dessecador para esfriar e, em seguida, pesado sendo registrados os valores até 0,0001 g.

4.7.3.4 Cálculos

A massa de gordura ($M_{Gordura}$) foi calculada, em gramas, descontando a massa do béquer vazio ($M_{Béquer}$) da massa final (M_{Final}) do béquer com a gordura extraída (**Equação 30**).

$$M_{Gordura} = M_{Final} - M_{Bequer} \quad (30)$$

A porcentagem de gordura total (G) foi calculada pela razão entre a massa de gordura ($M_{Gordura}$) e a massa da amostra ($M_{Amostra}$), em gramas, multiplicada por 100 (**Equação 31**):

$$G(\%) = \frac{M_{\text{Gordura}}}{M_{\text{Amostra}}} \times 100 \quad (31)$$

4.7.4 Acidez titulável

O método de determinação da acidez do leite fundamentou-se na titulação de uma porção de leite em pó (correspondente a 5 g de sólidos não gordurosos) por uma solução alcalina de concentração conhecida, utilizando como indicador a fenolftaleína e padrão colorimétrico sulfato de cobalto (II). O resultado foi expresso em mililitros de solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L requeridos para titular 10 g de sólidos não gordurosos (IDF, 1981).

4.7.4.1 Padronização da solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L

Foi pesado cerca de 1 g de biftalato de potássio, padrão primário, em uma cápsula de porcelana. Secou-se em estufa a 100 - 105 °C, por 1 h. A cápsula foi retirada da estufa, cuidadosamente, com auxílio de pinça, e transferida imediatamente para o dessecador. A cápsula foi resfriada no dessecador, por 30 min. 0,1 g de biftalato de potássio foi pesado em um erlenmeyer de 150 mL e dissolvido em 75 mL de água ultra pura isenta de gás carbônico, medidos em proveta de 100 mL. 2 gotas da solução de fenolftaleína a 1% foram adicionadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Titulou-se com solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol/L, utilizando bureta de 10 mL, até o aparecimento de uma coloração rósea persistente. O volume de hidróxido de sódio gasto foi anotado e o procedimento foi repetido mais duas vezes.

4.7.4.2 Preparo da amostra

Pesou-se $500/\alpha \pm 0,01$ g de amostra em erlenmeyer de 250 mL, sendo α a porcentagem de sólidos não gordurosos, que foi calculado subtraindo a gordura e a umidade da amostra (geralmente 7 g para leite em pó).

4.7.4.3 Ensaio

O leite em pó foi reconstituído adicionando 50 mL de água ultra pura, medidos em proveta de 50 mL, em temperatura de aproximadamente 20°C, e agitado rapidamente durante 20 min. 2 mL da solução colorimétrica padrão (sulfato de cobalto a 3 %) foram adicionados em um erlenmeyer, agitando-se manualmente até obtenção da cor padrão. 2 mL da solução de fenoftaleína a 1 % foram adicionados num segundo erlenmeyer contendo a amostra reconstituída, seguido de agitação manual. O conteúdo do segundo erlenmeyer foi titulado, sob agitação manual, com solução de hidróxido de sódio a 0,1 mol/L, até que a coloração rosa claro semelhante à coloração padrão persistisse por aproximadamente 5 s. A titulação foi finalizada em 45 s.

4.7.4.4 Cálculos

O fator de correção para a solução de hidróxido de sódio (FC_{NaOH}) foi calculado dividindo a média das massas do biftalato em gramas ($M_{Biftalato}$) pelo produto entre o volume médio da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação em mililitros (V_{Gasto}), a molaridade esperada da solução 0,1 e o fator 0,2042 (**Equação 32**).

$$FC_{NaOH} = \frac{M_{Biftalato}}{V_{Gasto} \times 0,1 \times 0,2042} \quad (32)$$

A acidez titulável da amostra foi calculada, em mL de NaOH 0,1 mol/L/10 g SNG, conforme **Equação 33**.

$$AT = V \times FC_{NaOH} \times 2 \quad (33)$$

sendo V volume de solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra em mililitros, FC_{NaOH} o fator de correção da solução de hidróxido de sódio, e 2 o fator de conversão de 5 g de SNG para 10 g de SNG.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO LABORATÓRIO

Na avaliação da veracidade das determinações de cinzas e gordura total, nos tempos zero, dois, quatro e seis meses, empregando MRC do IRMM, a premissa de normalidade foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner ($p > 0,10$). Em seguida, *outliers* foram investigados pelo teste de Grubbs, sendo que não houve indicação de *outliers* em nenhum caso ($p > 0,05$). Valores de escore-z satisfatórios, $-2 \leq z \leq +2$, foram obtidos na avaliação do desempenho do laboratório para análises de cinzas e gordura total durante todo o processo de produção do material. Para cinzas os valores de z variaram entre -0,2591 e 0,4924, enquanto para gordura total entre -1,5579 e 1,1786, considerando os valores de desvio padrão sob condições de reprodutibilidade declarados no certificado do material para a estimativa desta estatística (**Tabela 13**). A estimativa de z também foi feita adotando-se o desvio padrão relativo obtido pela função de HORWITZ (1982) e, também nesta condição, os valores foram aceitáveis, de -0,1569 a 0,1938 para cinzas e de -0,0480 a 0,0032 para gordura total.

Vale considerar que os resultados de porcentagem de cinzas e gordura total foram expressos em base seca para que a estimativa de z fosse feita. Isto, porque o valor certificado declarado pelo fabricante do MRC estava expresso desta forma. Considerou-se, assim, que o parâmetro umidade foi avaliado de forma indireta. Para o parâmetro acidez titulável não foi realizada avaliação de desempenho, devido à falta de MRC disponível.

Tabela 13. Avaliação do desempenho do laboratório para determinação de cinzas e gordura total, empregando material de referência certificado do *Institute for Reference Materials and Measurements*

Tempo (meses)	Cinzas			Gordura total		
	R*	N ^o outliers**	Escore-z	R*	N ^o outliers**	Escore-z
0	0,9985	0	0,240	0,9968	0	0,070
2	0,9584	0	0,696	0,9932	0	1,667
4	0,9090	0	-0,177	0,9414	0	0,147
6	0,9312	0	-0,564	0,9947	0	0,113

R: coeficiente de Ryan Joiner; * p > 0,10 pelo teste de Ryan Joiner; **p > 0,05 pelo teste de Grubbs; critério de aceitabilidade para escore-z: $-2 \leq z \leq +2$.

Dentre trabalhos publicados na literatura relativos à produção de MR de escopos similares, observou-se que dois deles foram realizados por laboratórios acreditados, sendo um do IRMM (JOSEPHS *et al.*, 2004) e o outro do NIST (SHARPLESS, *et al.*, 2010). Os outros estudos não apresentavam informações sobre o desempenho do laboratório para as análises realizadas, como subcontratação de laboratórios acreditados, o próprio laboratório ser acreditado ou emprego de método normalizado e de MRC de outros provedores (RAO, *et al.*, 1995; ANTONIO, 2007; JEDZINIAK *et al.*, 2009; TING *et al.*, 2010).

5.2 PRODUÇÃO DOS MATERIAIS

5.2.1 Homogeneidade

Na **Figura 6** encontram-se ilustrados os materiais produzidos nos dois lotes, com diferentes tipos de embalagens.



Figura 6. Materiais de referência de leite em pó integral acondicionados em sachês tipo *stand-up pouch* de 100 g de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade com zíper e selados termicamente e em frascos de vidro âmbar de 100 g com tampa de rosca.

Os resultados obtidos para o teste de homogeneidade dos dois lotes (sachês e frascos) preparados encontram-se apresentados nas **Tabelas 14 a 17**. Os lotes foram considerados homogêneos para todos os parâmetros analisados (umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável) segundo critérios da norma ISO 13528 (ISO, 2005 b) e do protocolo harmonizado pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), ambos relativos a ensaios de proficiência.

Considerando o critério da ISO 13528 (ISO, 2005 b), mais rigoroso que o definido pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), em todos os casos o desvio padrão entre amostras foi menor que o valor estabelecido como critério para homogeneidade de $0,3 \times \hat{\sigma}$ (**Tabelas 14 e 16**). Pela abordagem da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), primeiramente, não foram detectados *outliers* empregando o teste de Cochran ($p > 0,05$), em nenhum caso. Houve indicação de adequada repetibilidade, visto que o desvio $\sigma_{an}/\sigma_p < 0,5$, indicando precisão dos métodos utilizados para análise de todos os parâmetros, dos dois lotes. Homogeneidade suficiente também foi obtida em todos os casos (**Tabelas 15 e 17**).

Cumpram ressaltar que as médias dos resultados obtidos para os parâmetros umidade, gordura total e acidez titulável, de 3,4 %, 26,0 % e 17,1 mL NaOH 0,1M/10g SNG, respectivamente, estavam conformes em relação aos parâmetros estabelecidos para o PIQ do leite em pó integral. A média obtida para cinzas de

5,9 % encontrava-se em conformidade com os valores descritos em tabelas de composição de alimentos, como TACO (2006) e IBGE (1999), de 5,8 % e 5,9 %, respectivamente.

Tabela 14. Avaliação da homogeneidade do lote 1 do material, embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade, segundo critérios da norma ISO 13528

Parâmetro	Estatística					Conclusão*
	\bar{X}	s_x	s_w	s_s	$\hat{\sigma}$	
Umidade (%)	3,40	0,039	0,046	0,022	0,113	Homogêneo
Cinzas (%)	5,94	0,021	0,035	0,000	0,182	Homogêneo
Gordura total (%)	25,98	0,117	0,131	0,072	0,510	Homogêneo
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,08	0,118	0,081	0,104	0,413	Homogêneo

\bar{X} : média geral das amostras; s_x : desvio padrão das amostras; s_w : desvio padrão intra-amostras; s_s : desvio padrão entre amostras; $\hat{\sigma}$: desvio padrão do ensaio de proficiência; *critério para homogeneidade: $s_s \leq 0,3x \hat{\sigma}$.

Tabela 15. Avaliação da homogeneidade do lote 1 do material, embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade, segundo critérios do protocolo harmonizado pela IUPAC

Parâmetro	Estatística						Conclusão**
	s_{an}^*	s_{an}^2	s_{sam}^2	s_{all}^2	C	σ_p	
Umidade (%)	0,046	0,002	0,000	0,001	0,004	0,113	Homogêneo
Cinzas (%)	0,035	0,001	0,000	0,003	0,007	0,182	Homogêneo
Gordura total (%)	0,131	0,017	0,005	0,023	0,061	0,510	Homogêneo
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	0,081	0,007	0,011	0,015	0,036	0,413	Homogêneo

s_{an} : desvio padrão de repetibilidade; s_{an}^2 : variância analítica ou dentro dos grupos; s_{sam}^2 : variância amostral ou entre grupos; s_{all}^2 : variância amostral permitida; C: valor crítico para o teste de homogeneidade suficiente; σ_p : desvio padrão alvo; *critério para repetibilidade: $s_{an} < 0,5x\sigma_p$; **critério para homogeneidade: $s_{sam}^2 \leq c$. Não foram detectados *outliers* para nenhum dos parâmetros ($p > 0,05$).

Tabela 16. Avaliação da homogeneidade do lote 2 do material, embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca, segundo critérios da norma ISO 13528

Parâmetro	Estatística					Conclusão
	\bar{X}	S_x	S_w	S_s	$\hat{\sigma}$	
Umidade (%)	3,39	0,047	0,049	0,032	0,113	Homogêneo
Cinzas (%)	5,92	0,023	0,020	0,018	0,181	Homogêneo
Gordura total (%)	25,96	0,170	0,124	0,146	0,509	Homogêneo
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,05	0,093	0,074	0,077	0,413	Homogêneo

\bar{X} : média geral das amostras; s_x : desvio padrão das amostras; s_w : desvio padrão intra-amostras; s_s : desvio padrão entre amostras; $\hat{\sigma}$: desvio padrão do ensaio de proficiência; *critério para homogeneidade: $s_s \leq 0,3x \hat{\sigma}$.

Tabela 17. Avaliação da homogeneidade do lote 2 do material, embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca, segundo critérios do protocolo harmonizado pela IUPAC

Parâmetro	Estatística						Conclusão**
	S_{an}^*	S_{an}^2	S_{sam}^2	S_{all}^2	c	σ_p	
Umidade (%)	0,049	0,002	0,001	0,001	0,005	0,113	Homogêneo
Cinzas (%)	0,020	$4,19 \times 10^{-4}$	$3,39 \times 10^{-4}$	0,003	0,006	0,181	Homogêneo
Gordura total (%)	0,124	0,015	0,021	0,023	0,059	0,509	Homogêneo
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	0,074	0,006	0,006	0,015	0,034	0,413	Homogêneo

s_{an} : desvio padrão de repetibilidade; s_{an}^2 : variância analítica ou dentro dos grupos; s_{sam}^2 : variância amostral ou entre grupos; s_{all}^2 : variância amostral permitida ; c : valor crítico para o teste de homogeneidade suficiente; σ_p : desvio padrão alvo; *critério para repetibilidade: $s_{an} < 0,5x\sigma_p$; **critério para homogeneidade: $s_{sam}^2 \leq c$. Não foram detectados *outliers* para nenhum dos parâmetros ($p > 0,05$).

ANTÓNIO (2007) produziu um MRC de escopo similar ao do presente trabalho, que incluiu os parâmetros umidade, cinzas, proteína, gordura total e acidez titulável em leite em pó para lactentes. Para os estudos de homogeneidade foram

tomados cinco materiais, analisados em duplicata, para o estudo da variabilidade entre amostras e um material, analisado em seis replicatas, para o estudo da variabilidade dentro da amostra. Foi realizada ANOVA, mas os critérios adotados não seguiram as diretrizes da norma ISO 13528 (ISO, 2005 b) ou do protocolo harmonizado da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006). Heterogeneidade foi observada para os parâmetros umidade e acidez titulável, sendo o material considerado homogêneo somente para cinzas, proteína e gordura total. Com relação à repetibilidade, o referido autor relata apenas que valores satisfatórios foram alcançados.

RAO *et al.* (1995) avaliaram a homogeneidade do leite em pó em dois candidatos a MR para carbono-14. Para o teste de homogeneidade entre amostras, foram utilizadas seis amostras de diferentes latas e, seis subamostras foram tomadas para a análise da homogeneidade intra-amostras. Empregando teste de F , o material foi caracterizado como homogêneo. No entanto, tais autores também não adotaram critérios definidos pelo protocolo harmonizado da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) e ISO 13528 (ISO, 2005 b).

JOSEPHS *et al.* (2004) produziram dois MRC para micotoxinas em leite em pó, relatando apenas que a incerteza da homogeneidade foi calculada por ANOVA e utilizada para certificação dos materiais, não citando referência ou mesmo o critério adotado.

JEDZINIAK *et al.* (2009) produziram MR para resíduos de medicamentos (5-hidroxi-flunixinolona e meloxicam) em leite de vaca e utilizaram como referência para o estudo de homogeneidade o protocolo harmonizado pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006). Além disso, fizeram uma comparação do teste de Cochran e de Horwitz com o critério de homogeneidade suficiente descrito pela IUPAC, encontrando concordância entre os mesmos, ou seja, o material foi considerado homogêneo em todos os testes utilizados.

Um MRC para o escopo vitamina B3 em fórmula infantil foi produzido por TING *et al.* (2010). Homogeneidade foi avaliada tomando-se 15 frascos para o estudo da variabilidade entre frascos e sete porções de um frasco para o estudo da variabilidade dentro dos frascos. A análise dos resultados da homogeneidade foi feita empregando testes de F e de t . No teste F , foram comparados os desvios padrão entre frascos e dentro dos frascos. O teste t foi utilizado para examinar se a

média entre os frascos foram significativamente diferente das médias dentro dos frascos.

SHARPLESS *et al.* (2010) prepararam e caracterizaram MR de fórmula nutricional adulto/infantil para ácidos graxos, vitaminas, minerais, aminoácidos e nucleotídeos. Estes autores realizaram estudos de “micro-homogeneidade” variando porções teste para determinação da mínima porção para a qual a homogeneidade estaria assegurada. Contudo, heterogeneidade não foi identificada, por análise de variância, para nenhuma porção teste empregada.

5.2.2 Estabilidade

Para avaliação da estabilidade dos materiais foram avaliadas as premissas da regressão linear simples e o ajuste ao modelo linear (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005) e adotados os critérios definidos no ISO Guia 35 (ABNT, 2012) (**Tabelas 18 a 23 e Figuras 7 a 12**). Os resultados dos testes de estabilidade também foram avaliados segundo critérios de documentos relativos a ensaios de proficiência - a norma ISO 13528 (ISO, 2005 b) (**Tabelas 24 a 29**) e o protocolo harmonizado pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006) (**Tabelas 30 a 35**).

Apesar de não ser preconizado pelo Guia ISO 35 (ABNT, 2012), a verificação do atendimento às premissas da regressão é de fundamental importância.

O tratamento de *outliers* é crítico, visto que a regressão é muito sensível à presença de pontos de influência, os quais podem perturbar a estimativa dos parâmetros (BURKE, 2001). Três *outliers* foram detectados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife para MR1 considerando o parâmetro umidade, dois para cinzas, oito para gordura total e um para acidez titulável. Para o MR2 foram sete para cinzas, um para gordura total e dois para acidez titulável, sendo que para umidade o tratamento não foi considerado visto à indicação da remoção de todos os pontos do tempo seis meses e de pontos além do limite máximo de 22 % recomendado. Considerando o MR3 foram sete *outliers* para cinzas, três para gordura total e dois para acidez titulável, sendo que o tratamento também não foi conduzido para o parâmetro umidade devido à indicação de todos os pontos do tempo quatro meses como *outliers*. Para o MR4 foi detectado um *outlier* para cinzas, três para gordura total, um para acidez titulável e também o tratamento não ocorreu

para o parâmetro umidade devido à indicação de remoção de pontos além do limite máximo recomendado. Dois *outliers* para umidade e cinzas e um para gordura total e acidez total titulável foram encontrados no MR5 e, no MR6, três para umidade e cinzas e dois para gordura total e acidez total titulável. Assim, os casos em que o tratamento de *outliers* sinalizou para um número de dados dispersos além do máximo recomendado, foram considerados como indicativos de falta de estabilidade - MR2, MR3 e MR4 para o parâmetro umidade. Contudo, os testes subsequentes das avaliações das premissas e do ajuste ao modelo linear foram conduzidos, sem a remoção, visando uma melhor análise dos resultados.

Para validade dos testes, é fundamental avaliar se as distribuições hipotetizadas são compatíveis com os dados. Não normalidade, por exemplo, é impeditiva para inferências baseadas nos testes de *t* e *F* (DUFOR *et al.*, 1998). A premissa de normalidade foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner e confirmada para todos os parâmetros e materiais, exceto o parâmetro umidade do MR4 ($p < 0,01$).

A regressão linear assume que os resíduos são independentes. A autocorrelação dos resíduos afeta a variância das estimativas dos parâmetros obtidos pelo método mínimos quadrados e pode subestimar a estimativa da variância da regressão e os intervalos de confiança (DRAPER & SMITH, 1998). O teste de Durbin-Watson foi utilizado para avaliar a autocorrelação dos resíduos, sendo indicada autocorrelação positiva dos resíduos no MR2, MR3 e MR4 para o parâmetro umidade.

Regressão linear simples assume que cada nível da faixa tem uma variação absoluta constante, sendo a regressão ponderada comumente recomendada para dados heteroscedásticos (JOHNSTON, 1984). Homoscedasticidade foi avaliada pelo teste de Brown & Forsythe, havendo indicação de heteroscedasticidade ($p < 0,05$) somente para o parâmetro umidade nos materiais MR2 e MR4.

Na avaliação da significância da regressão por análise de variância, indicativa de falta de estabilidade, para o parâmetro umidade, os materiais MR1, MR2 e MR4 apresentaram regressão significativa ($p < 0,01$). Os demais materiais e parâmetros tiveram indicação de regressão não significativa ($p > 0,05$) e, conseqüentemente, de estabilidade.

Para todos os materiais e parâmetros considerados estáveis, foi confirmado ajuste ao modelo linear ($p > 0,05$), exceto para o MR3 parâmetro umidade, para o

qual houve indicação de desvio da linearidade. Neste caso, como o modelo linear não era adequado, o material não poderia ser considerado como estável pela análise da significância da regressão.

Tabela 18. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado a temperatura ambiente (MR1), segundo critérios do ISO Guia 35

<i>Estatística</i>	<i>Parâmetros</i>			
	<i>Umidade</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Gordura total</i>	<i>Acidez titulável</i>
<i>Número de observações</i>				
<i>n</i>	35	36	30	37
<i>Normalidade</i>				
<i>R</i>	0,9891	0,9693	0,9853	0,9760
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,05$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Homoscedasticidade</i>				
<i>F_L</i>	2,703	0,112	0,095	1,353
<i>p</i>	0,06	0,95	0,96	0,27
<i>Independência</i>				
<i>d</i>	1,675	2,374	1,754	2,052
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Regressão</i>				
<i>F</i>	$3,498 \times 10^{+2}$	1,642	1,864	0,325
<i>p</i>	$3,94 \times 10^{-19}$	0,21	0,18	0,57
<i>Desvio da linearidade</i>				
<i>F</i>	8,493	0,461	0,810	0,076
<i>p</i>	$1,15 \times 10^{-3}$	0,64	0,46	0,93

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *F_L* = estatística F de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão entre variâncias.

Tabela 19. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob congelamento (MR2), segundo critérios do ISO Guia 35

Estatística	Parâmetros			
	Umidade*	Cinzas	Gordura total	Acidez titulável
<i>Número de observações</i>				
<i>n</i>	38	31	37	36
<i>Normalidade</i>				
<i>R</i>	0,9926	0,9883	0,9884	0,9710
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,05$
<i>Homoscedasticidade</i>				
<i>F_L</i>	3,879	2,166	1,415	0,087
<i>p</i>	0,02	0,12	0,26	0,97
<i>Independência</i>				
<i>d</i>	0,662	2,319	1,926	1,987
<i>p</i>	$p < 0,1$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Regressão</i>				
<i>F</i>	8,265	2,222	1,062	0,092
<i>p</i>	$6,74 \times 10^{-3}$	0,15	0,31	0,76
<i>Desvio da linearidade</i>				
<i>F</i>	31,720	0,277	0,473	0,938
<i>p</i>	$1,68 \times 10^{-8}$	0,76	0,63	0,40

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *F_L* = estatística F de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão entre variâncias, *resultados apresentados sem tratamento de *outliers* devido à indicação de um número de *outliers* maior que o máximo permitido, além da remoção de todos os dados do tempo 6 meses.

Tabela 20. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob refrigeração (MR3), segundo critérios do ISO Guia 35

<i>Estatística</i>	<i>Parâmetros</i>			
	<i>Umidade*</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Gordura total</i>	<i>Acidez titulável</i>
<i>Número de observações</i>				
<i>n</i>	38	31	35	36
<i>Normalidade</i>				
<i>R</i>	0,9833	0,9738	0,9891	0,9775
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Homoscedasticidade</i>				
<i>F_L</i>	1,278	1,623	1,343	0,629
<i>p</i>	0,30	0,21	0,28	0,60
<i>Independência</i>				
<i>d</i>	0,966	2,237	2,406	2,259
<i>p</i>	$p < 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Regressão</i>				
<i>F</i>	0,281	1,905	0,138	3,721
<i>p</i>	0,60	0,18	0,71	0,06
<i>Desvio da linearidade</i>				
<i>F</i>	34,361	1,221	0,797	0,319
<i>p</i>	$6,87 \times 10^{-9}$	0,31	0,46	0,73

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *F_L* = estatística F de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão entre variâncias, *resultados apresentados sem tratamento de *outliers* devido à indicação de remoção de todos os dados do tempo 4 meses.

Tabela 21. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado a temperatura ambiente (MR4), segundo critérios do ISO Guia 35

<i>Estatística</i>	<i>Parâmetros</i>			
	<i>Umidade*</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Gordura total</i>	<i>Acidez titulável</i>
<i>Número de observações</i>				
<i>n</i>	38	37	35	37
<i>Normalidade</i>				
<i>R</i>	0,9225	0,9698	0,9864	0,9731
<i>p</i>	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p > 0,10$	$p > 0,05$
<i>Homoscedasticidade</i>				
<i>F_L</i>	10,589	0,150	0,574	0,290
<i>p</i>	$4,58 \times 10^{-5}$	0,93	0,64	0,83
<i>Independência</i>				
<i>d</i>	0,534	2,018	1,470	1,737
<i>p</i>	$p < 0,1$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Regressão</i>				
<i>F</i>	94,016	3,158	0,048	1,304
<i>p</i>	$1,41 \times 10^{-11}$	0,08	0,83	0,26
<i>Desvio da linearidade</i>				
<i>F</i>	13,071	0,089	1,000	1,328
<i>p</i>	$6,15 \times 10^{-5}$	0,92	0,38	0,28

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *F_L* = estatística F de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão entre variâncias, *resultados apresentados sem tratamento de *outliers* devido à indicação de um número de *outliers* maior que o máximo permitido.

Tabela 22. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob congelamento (MR5), segundo critérios do ISO Guia 35

<i>Estatística</i>	<i>Parâmetros</i>			
	<i>Umidade</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Gordura total</i>	<i>Acidez titulável</i>
<i>Número de observações</i>				
<i>n</i>	36	36	37	37
<i>Normalidade</i>				
<i>R</i>	0,9921	0,9886	0,9841	0,9823
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Homoscedasticidade</i>				
<i>F_L</i>	0,832	1,514	0,420	0,330
<i>p</i>	0,49	0,23	0,74	0,80
<i>Independência</i>				
<i>d</i>	2,134	1,877	1,476	1,563
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Regressão</i>				
<i>F</i>	3,448	3,273	0,067	0,563
<i>p</i>	0,07	0,08	0,80	0,46
<i>Desvio da linearidade</i>				
<i>F</i>	0,215	0,343	1,489	0,554
<i>p</i>	0,81	0,71	0,24	0,58

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *F_L* = estatística F de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão entre variâncias.

Tabela 23. Avaliação das premissas da regressão linear para estudo da estabilidade do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob refrigeração (MR6), para os parâmetros do escopo, segundo critérios do ISO Guia 35

<i>Estatística</i>	<i>Parâmetros</i>			
	<i>Umidade</i>	<i>Cinzas</i>	<i>Gordura total</i>	<i>Acidez titulável</i>
<i>Número de observações</i>				
<i>n</i>	35	35	36	38
<i>Normalidade</i>				
<i>R</i>	0,9893	0,9754	0,9882	0,9847
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Homoscedasticidade</i>				
<i>F_L</i>	0,911	0,106	0,962	1,706
<i>p</i>	0,45	0,96	0,42	0,18
<i>Independência</i>				
<i>d</i>	2,244	1,735	1,552	1,769
<i>p</i>	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$	$p > 0,10$
<i>Regressão</i>				
<i>F</i>	0,673	1,321	0,740	0,549
<i>p</i>	0,42	0,26	0,40	0,46
<i>Desvio da linearidade</i>				
<i>F</i>	0,097	0,986	3,248	0,322
<i>*p</i>	0,91	0,38	0,05	0,73

n = número de observações, *R* = coeficiente de correlação de Ryan-Joiner, *p* = significância, *F_L* = estatística F de Levene, *d* = estatística de Durbin-Watson, *F* = razão entre variâncias.

Pela análise visual dos gráficos de regressão linear simples (**Figuras 7 a 12**), é possível observar tendência, falta de estabilidade, para os materiais MR1, MR2 e MR4 em relação ao parâmetro umidade, bem como a estabilidade, ao longo de seis meses, para os demais materiais/parâmetros do escopo deste estudo.

Os resultados do teste de estabilidade segundo o ISO Guia 35 (ABNT, 2012), considerando a abordagem de cálculo pela significância de b_1 , também encontram-se representados nas **Figuras 7 a 12**.

Como pode ser observado na **Figura 7**, a inclinação não foi significativa para o MR1, em relação aos parâmetros cinzas, gordura total e acidez titulável, apresentando valores de probabilidade p_{b1} de 0,209, 0,183 e 0,572, respectivamente. No caso do parâmetro umidade, a inclinação foi significativa ($p < 0,001$). Portanto, o MR1 foi considerado instável apenas para o parâmetro umidade durante seis meses de armazenamento.

No MR2, a inclinação também foi significativa apenas para o parâmetro umidade ($p < 0,010$). As probabilidades p_{b1} foram 0,147 para cinzas, 0,310 para gordura total e 0,764 para acidez titulável (**Figura 8**). Portanto, apenas umidade foi instável durante o período de armazenamento deste material.

Considerando o MR3, o valor de p_{b1} foi de 0,599 para umidade, 0,178 para cinzas, 0,713 para gordura total e 0,062 para acidez titulável (**Figura 9**), indicando estabilidade durante o período de armazenamento para todos os parâmetros do escopo.

No MR4, a inclinação foi significativa para o parâmetro umidade, com valor de p_{b1} de $1,41 \times 10^{-11}$ e não significativa para os outros três parâmetros, com probabilidades de 0,084, 0,829 e 0,261 para cinzas, gordura total e acidez titulável, respectivamente (**Figura 10**).

O MR5 e MR6 apresentaram estabilidade para todos os parâmetros analisados. Os valores de p_{b1} do MR5 foram de 0,072 para o parâmetro umidade, 0,079 para cinzas, 0,797 para gordura total e 0,458 para acidez titulável (**Figura 11**). No caso do MR6, esses valores foram de 0,418, 0,259, 0,396 e 0,464 para umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, respectivamente (**Figura 12**).

Portanto, segundo critério da ISO 35 (ABNT, 2012), instabilidade foi evidenciada apenas para o parâmetro umidade nos materiais MR1, MR2 e MR4 durante seis meses de armazenamento do leite em pó. Considerando a análise de

regressão linear segundo SOUZA & JUNQUEIRA (2005), também o MR3 não seria considerado estável para o referido parâmetro, visto que houve indicação de desvio ao modelo linear. Cumpre ressaltar que o resultado observado para o MR3 parâmetro umidade reitera a necessidade de verificação das premissas e do ajuste ao modelo, previamente ao teste da significância da regressão/inclinação. Isto porque, tal material seria erroneamente considerado estável para umidade se somente a análise da significância da regressão/inclinação fosse conduzida.

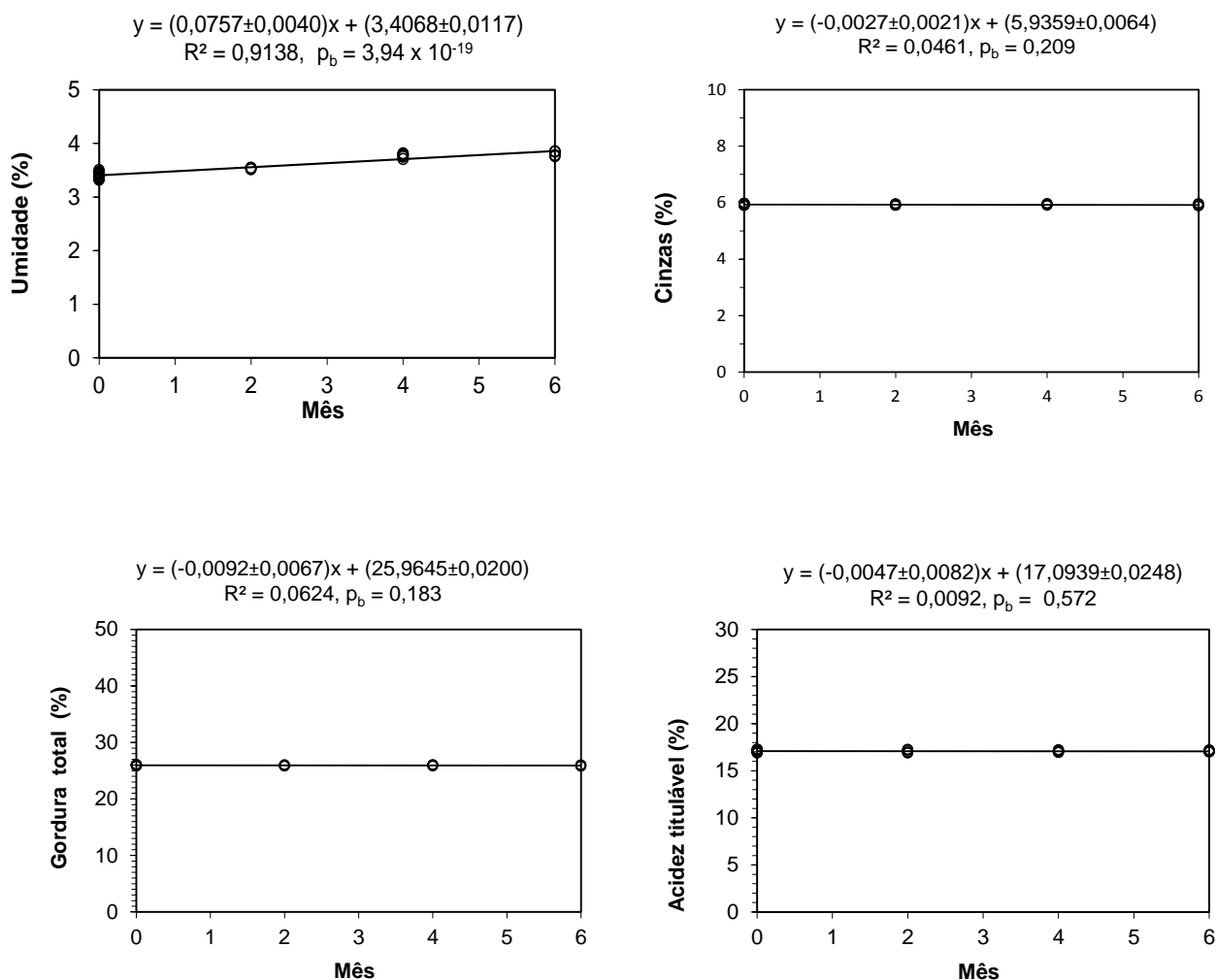


Figura 7. Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado a temperatura ambiente (MR1), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = resposta % para os diferentes parâmetros, x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_{b1} : probabilidade da significância da inclinação.

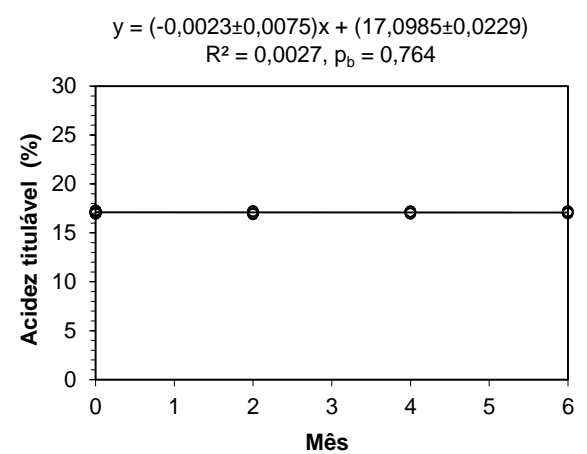
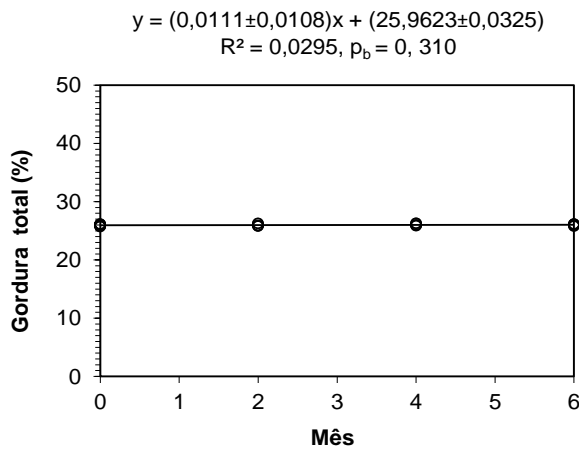
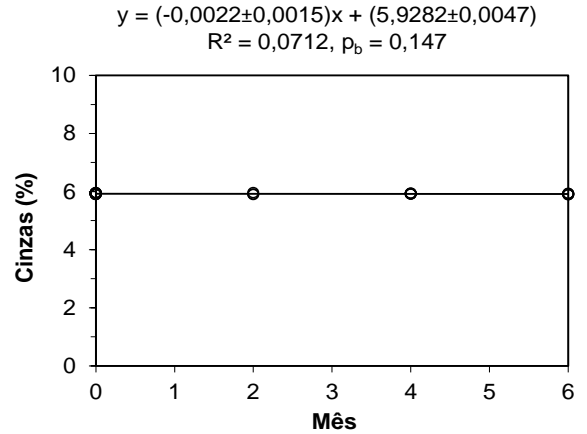
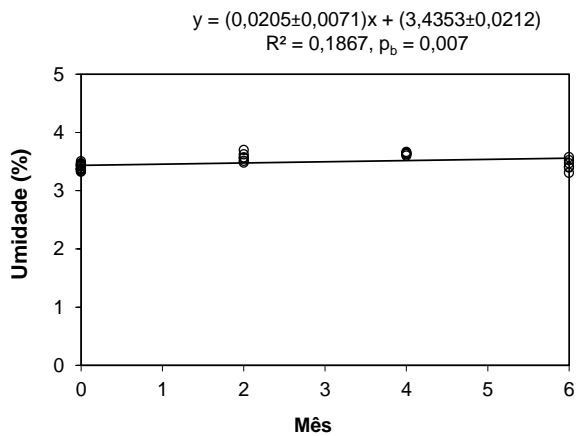


Figura 8. Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob congelamento (MR2), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = resposta % para os diferentes parâmetros, x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_b : probabilidade da significância da inclinação.

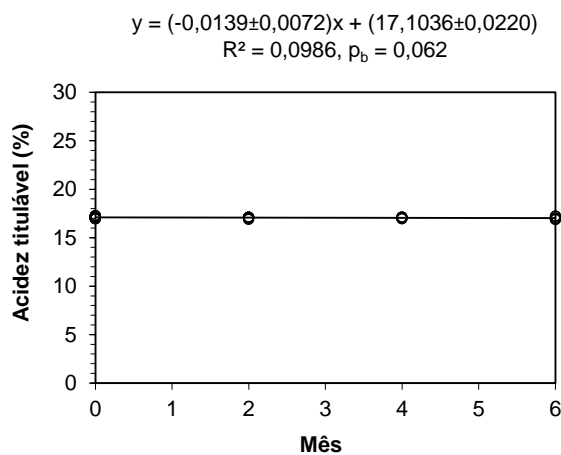
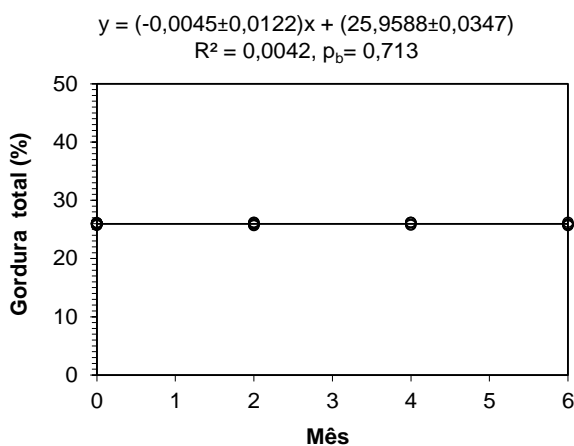
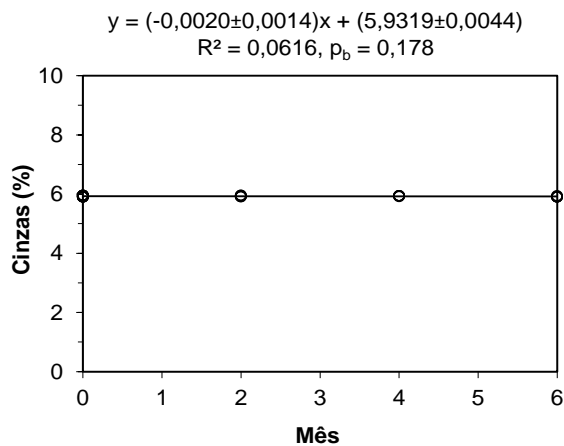
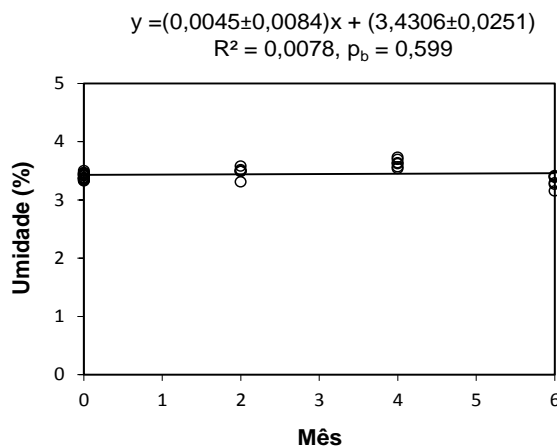


Figura 9. Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob refrigeração (MR3), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = resposta % para os diferentes parâmetros, x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_b : probabilidade da significância da inclinação.

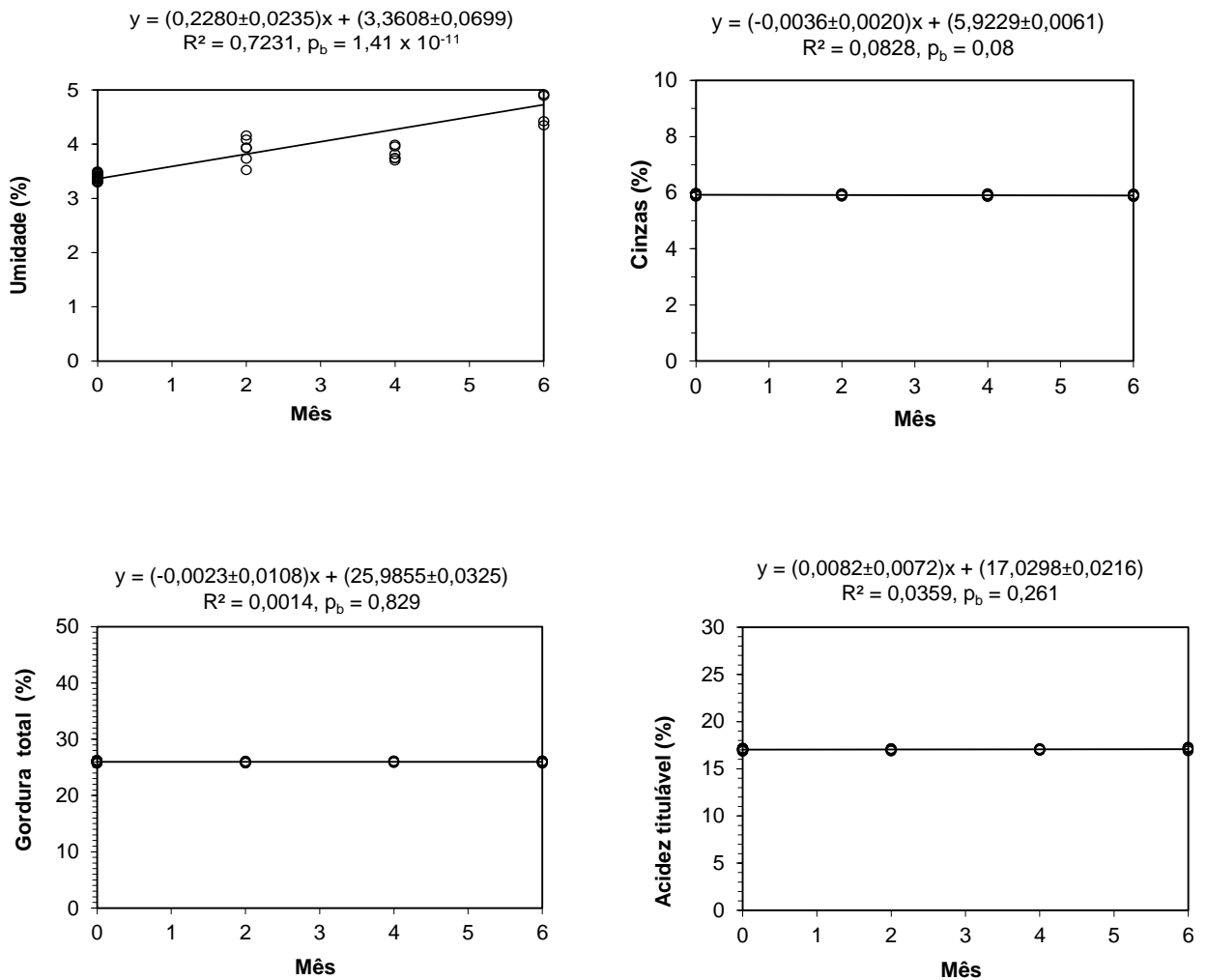


Figura 10. Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado a temperatura ambiente (MR4), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = resposta % para os diferentes parâmetros, x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_b : probabilidade da significância da inclinação.

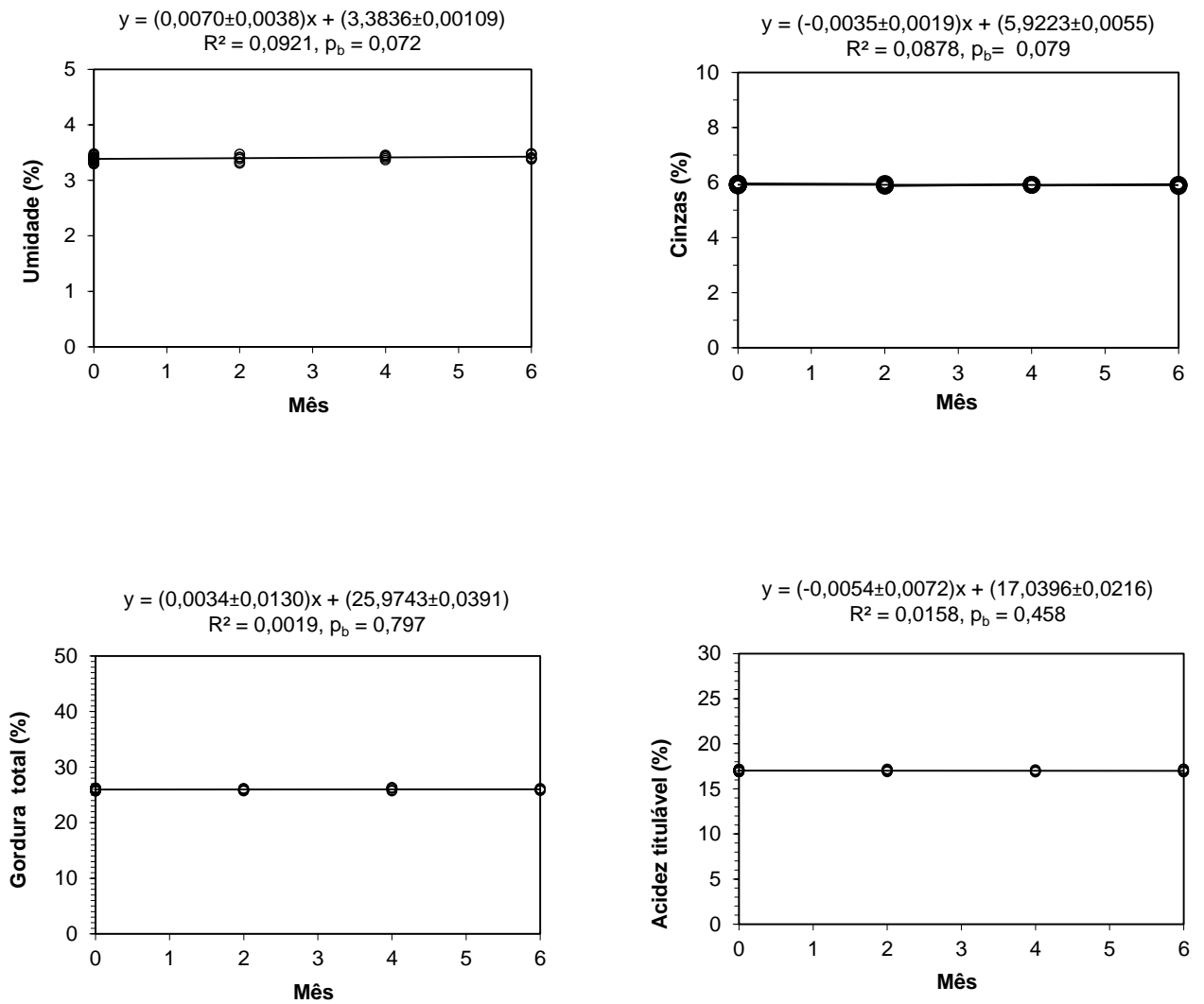


Figura 11. Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob congelamento (MR5), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = resposta % para os diferentes parâmetros, x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_b : probabilidade no teste de significância da inclinação.

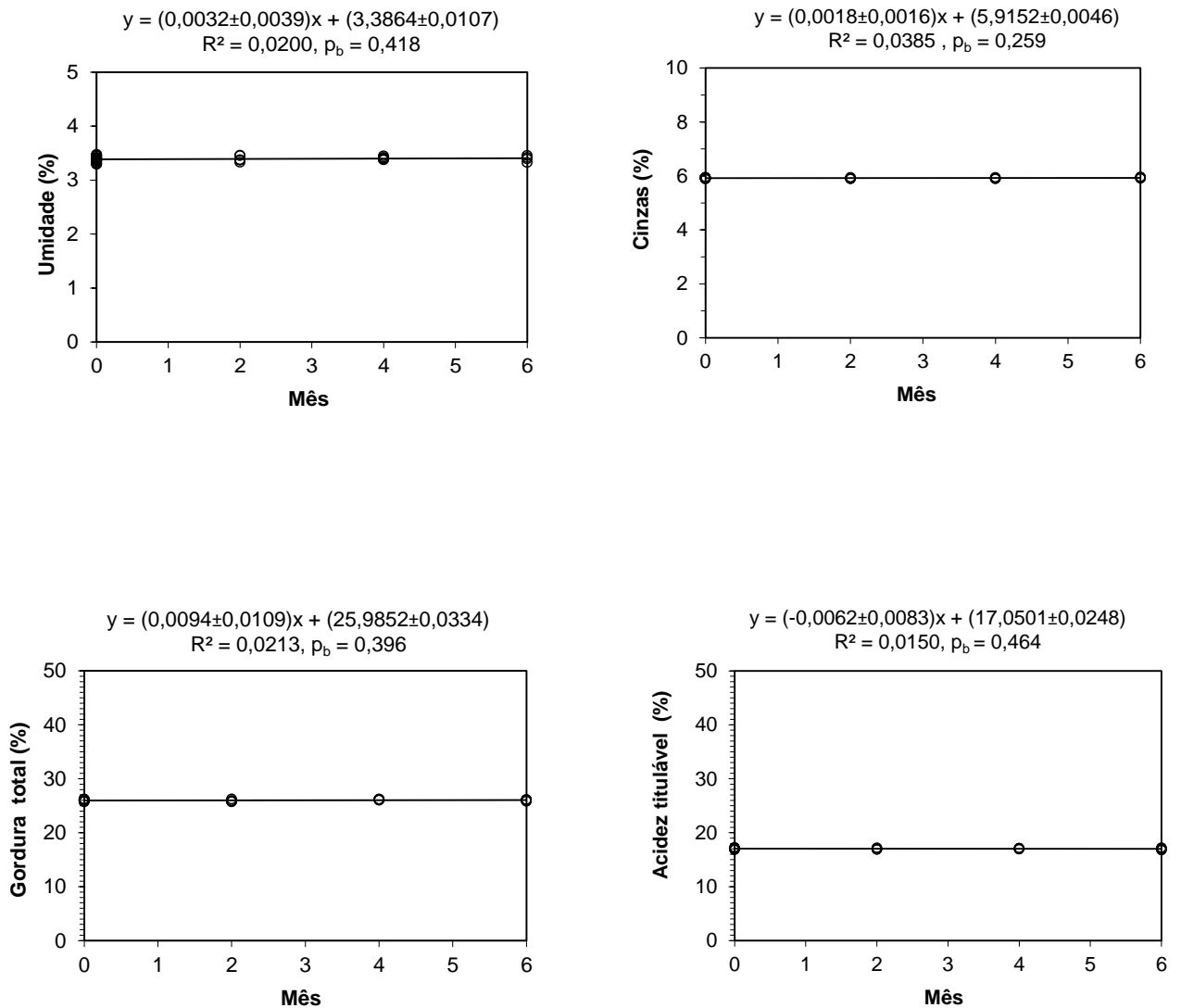


Figura 12. Curvas obtidas por regressão linear para avaliação da estabilidade, durante 6 meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob refrigeração (MR6), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35.

y = resposta % para os diferentes parâmetros, x = tempo em meses, R^2 = coeficiente de determinação, p_b : probabilidade no teste de significância da inclinação.

Nas **Tabelas 24 a 29** estão representados os testes de estabilidade segundo critérios da ISO 13529 (ISO, 2005 b), após seis meses, com resultados cumulativos das análises nos tempos dois, quatro e seis meses. Os valores de $0,3\sigma_p$ encontrados foram de 0,034 para o parâmetro umidade, 0,055 para cinzas, 0,191 para gordura total e 0,134 para acidez titulável, considerando os modelos de Horwitz (1982).

No caso do MR1, MR2, MR3 e MR4, apenas o parâmetro umidade foi instável, apresentando diferenças entre as médias dos testes de homogeneidade e estabilidade de 0,30; 0,15; 0,08 e 0,85, respectivamente, ou seja, maiores que $0,3\sigma_p$. Nos parâmetros cinzas, gordura total e acidez titulável do MR1, os valores encontrados foram de 0,01; 0,00 e 0,01, respectivamente, todos inferiores aos valores de $0,3\sigma_p$ (**Tabela 24**).

Para o MR2, os valores das diferenças entre as médias para cinzas foram de 0,02, gordura total de 0,04 e acidez titulável de 0,00 (**Tabela 25**). Esses valores para o MR3 foram de 0,01; 0,03 e 0,04 (**Tabela 26**) e para o MR4 de 0,02; 0,03 e 0,00, respectivamente (**Tabela 27**), sendo assim considerados estáveis.

O MR5 e MR6 apresentaram estabilidade para todos os parâmetros analisados. Portanto, as diferenças entre as médias dos testes de homogeneidade e estabilidade foram inferiores a $0,3\sigma_p$ em todos os casos. Para o MR5, os valores das diferenças entre as médias foram de 0,01 para umidade, 0,02 para cinzas e gordura total e de 0,03 para acidez titulável (**Tabela 28**), enquanto para o MR6, as diferenças representaram 0,01 para umidade, 0,00 para cinzas, 0,05 para gordura total e 0,03 para acidez titulável (**Tabela 29**).

Assim, de acordo com os critérios da norma ISO 13528 (ISO, 2005 b), houve indicação de instabilidade apenas para o parâmetro umidade dos materiais MR1, MR2, MR3 e MR4, durante seis meses de armazenamento do leite em pó integral. Vale destacar que a mesma indicação foi obtida quando os materiais foram avaliados nos tempos dois e quatro meses (sendo este último cumulativo).

Tabela 24. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado a temperatura ambiente (MR1), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528

Parâmetro	Estatística				Conclusão*
	$\bar{x}_{t,k}$	$\bar{y}_{t,k}$	$ \bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
Umidade (%)	3,40	3,70	0,30	0,034	Lote não estável
Cinzas (%)	5,94	5,93	0,01	0,055	Lote estável
Gordura total (%)	25,98	25,98	0,00	0,191	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,08	17,07	0,01	0,134	Lote estável

$\bar{X}_{t,k}$: média geral obtida no teste de homogeneidade; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral obtida no teste de estabilidade; *critério: $|\bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$

Tabela 25. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob congelamento (MR2), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528

Parâmetro	Estatística				Conclusão*
	$\bar{x}_{t,k}$	$\bar{y}_{t,k}$	$ \bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
Umidade (%)	3,40	3,55	0,15	0,034	Lote não estável
Cinzas (%)	5,94	5,92	0,02	0,055	Lote estável
Gordura total (%)	25,98	26,01	0,04	0,191	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,08	17,08	0,00	0,134	Lote estável

$\bar{X}_{t,k}$: média geral obtida no teste de homogeneidade; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral obtida no teste de estabilidade; *critério: $|\bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$

Tabela 26. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob refrigeração (MR3), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528

Parâmetro	Estatística				Conclusão*
	$\bar{x}_{t,k}$	$\bar{y}_{t,k}$	$ \bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
Umidade (%)	3,40	3,48	0,08	0,034	Lote não estável
Cinzas (%)	5,94	5,93	0,01	0,055	Lote estável
Gordura total (%)	25,98	25,95	0,03	0,191	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,08	17,04	0,04	0,134	Lote estável

$\bar{X}_{t,k}$: média geral obtida no teste de homogeneidade; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral obtida no teste de estabilidade; *critério: $|\bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$

Tabela 27. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado a temperatura ambiente (MR4), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528

Parâmetro	Estatística				Conclusão*
	$\bar{x}_{t,k}$	$\bar{y}_{t,k}$	$ \bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
Umidade	3,39	4,24	0,85	0,034	Lote não estável
Cinzas	5,93	5,91	0,02	0,055	Lote estável
Gordura total	25,96	25,99	0,03	0,191	Lote estável
Acidez titulável	17,05	17,05	0,00	0,134	Lote estável

$\bar{X}_{t,k}$: média geral obtida no teste de homogeneidade; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral obtida no teste de estabilidade; *critério: $|\bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$

Tabela 28. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob congelamento (MR5), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528

Parâmetro	Estatística				Conclusão*
	$\bar{x}_{t,k}$	$\bar{y}_{t,k}$	$ \bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
Umidade	3,39	3,40	0,01	0,034	Lote estável
Cinzas	5,93	5,91	0,02	0,055	Lote estável
Gordura total	25,96	25,98	0,02	0,191	Lote estável
Acidez titulável	17,05	17,02	0,03	0,134	Lote estável

$\bar{X}_{t,k}$: média geral obtida no teste de homogeneidade; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral obtida no teste de estabilidade; *critério: $|\bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$

Tabela 29. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob refrigeração (MR6), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios da norma ISO 13528

Parâmetro	Estatística				Conclusão*
	$\bar{x}_{t,k}$	$\bar{y}_{t,k}$	$ \bar{x}_{t,k} - \bar{y}_{t,k} $	$0,3\sigma_p$	
Umidade (%)	3,39	3,38	0,01	0,034	Lote estável
Cinzas (%)	5,92	5,92	0,00	0,054	Lote estável
Gordura total (%)	25,96	26,01	0,05	0,191	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,05	17,02	0,03	0,134	Lote estável

$\bar{X}_{t,k}$: média geral obtida no teste de homogeneidade; $\bar{Y}_{t,k}$: média geral obtida no teste de estabilidade; *critério: $|\bar{X}_{t,k} - \bar{Y}_{t,k}| \leq 0,3 \times \sigma_p$

Nas **Tabelas 30 a 35** estão apresentados os resultados do teste de estabilidade, após seis meses, conforme preconizado no protocolo harmonizado pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006). Os dois critérios para a avaliação da estabilidade considerados no referido protocolo foram considerados.

Os valores de $0,1\chi_p$ calculados para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável foram 0,011, 0,018, 0,064 e 0,045, respectivamente.

Os materiais MR1, MR2, MR3 e MR4 foram instáveis apenas para o parâmetro umidade, com concordância entre os dois critérios propostos. Como pode ser observado nas **Tabelas 30, 31, 32 e 33**, pelo teste de *t*, somente houve diferença significativa entre as médias do parâmetro umidade ($p < 0,05$). Os valores das diferenças entre as médias dos grupos controle e experimental foram 0,30; 0,15; 0,08 e 0,85 para os materiais MR1, MR2, MR3 e MR4, respectivamente, maiores que o limite $0,1\chi_p$.

No caso do MR4, para o parâmetro cinzas, houve indicação de estabilidade pelo teste de *t* ($p > 0,05$). Contudo, instabilidade foi detectada pelo segundo critério, visto que a diferença entre as médias dos grupos controle e experimental (0,018) foi maior que $0,1\chi_p$ (0,015). Gordura total e a acidez titulável foram considerados parâmetros estáveis por ambos os critérios (**Tabela 33**).

Os materiais MR5 e MR6 foram considerados estáveis para todos os parâmetros, pelos dois critérios (**Tabelas 34 e 35**).

Nos tempos dois e quatro meses (este último cumulativo), foram observados os mesmos resultados de estabilidade/instabilidade descritos para o tempo seis meses, em ambos os critérios.

Tabela 30. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado a temperatura ambiente (MR1), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC

Parâmetro	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	$0,1\sigma_p$	Conclusão
Umidade (%)	3,40	3,70	0,30	-9,321	$3,93 \times 10^{-11}$	Lote não estável	0,011	Lote não estável
Cinzas (%)	5,94	5,93	0,01	1,156	$2,55 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,018	Lote estável
Gordura total (%)	25,98	25,98	0,00	-0,022	$9,83 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,064	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,08	17,07	0,01	0,257	$7,98 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,045	Lote estável

\bar{X}_c : média controle; \bar{X}_e : média experimental; *critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1\sigma_p$

Tabela 31. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob congelamento (MR2), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC

Parâmetro	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	$0,1\sigma_p$	Conclusão
Umidade (%)	3,40	3,55	0,15	-5,613	$2,29 \times 10^{-6}$	Lote não estável	0,011	Lote não estável
Cinzas (%)	5,94	5,92	0,02	1,452	$1,55 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,018	Lote estável
Gordura total (%)	25,98	26,01	0,04	-0,703	$4,86 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,064	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,08	17,08	0,00	0,093	$9,26 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,045	Lote estável

\bar{X}_c : média controle; \bar{X}_e : média experimental; *critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1\sigma_p$

Tabela 32. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade armazenado sob refrigeração (MR3), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC

Parâmetro	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	$0,1\sigma_p$	Conclusão
Umidade (%)	3,40	3,48	0,08	-2,031	$4,97 \times 10^{-2}$	Lote não estável	0,011	Lote não estável
Cinzas (%)	5,94	5,93	0,01	1,054	$2,99 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,018	Lote estável
Gordura total (%)	25,98	25,95	0,03	0,438	$6,64 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,064	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,08	17,04	0,04	1,062	$2,95 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,045	Lote estável

\bar{X}_c : média controle; \bar{X}_e : média experimental; *critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1\sigma_p$

Tabela 33. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado a temperatura ambiente (MR4), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC

Parâmetro	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	$0,1\sigma_p$	Conclusão
Umidade (%)	3,39	4,24	0,85	-5,713	$1,68 \times 10^{-6}$	Lote não estável	0,011	Lote não estável
Cinzas (%)	5,93	5,91	0,02	1,945	$5,96 \times 10^{-2}$	Lote estável	0,018	Lote não estável
Gordura total (%)	25,96	25,99	0,03	-0,549	$5,86 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,064	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,05	17,05	0,00	0,000	$9,97 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,045	Lote estável

\bar{X}_c : média controle; \bar{X}_e : média experimental; *critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1\sigma_p$

Tabela 34. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob congelamento (MR5), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC

Parâmetro	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	$0,1\sigma_p$	Conclusão
Umidade (%)	3,39	3,40	0,01	-0,588	$5,60 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,011	Lote estável
Cinzas (%)	5,93	5,91	0,02	1,689	$9,99 \times 10^{-2}$	Lote estável	0,018	Lote estável
Gordura total (%)	25,96	25,98	0,02	-0,384	$7,03 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,064	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,05	17,02	0,03	1,000	$3,24 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,045	Lote estável

\bar{X}_c : média controle; \bar{X}_e : média experimental; *critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1\sigma_p$

Tabela 35. Avaliação da estabilidade, durante seis meses, do material embalado em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca armazenado sob refrigeração (MR6), para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do protocolo da IUPAC

Parâmetro	Estatística							
	\bar{X}_c	\bar{X}_e	$ \bar{X}_c - \bar{X}_e $	Critério teste de t*			Critério σ_p **	
				t	p	Conclusão	$0,1\sigma_p$	Conclusão
Umidade (%)	3,39	3,38	0,01	0,428	$6,71 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,011	Lote estável
Cinzas (%)	5,92	5,92	0,01	0,686	$4,97 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,018	Lote estável
Gordura total (%)	25,96	26,01	0,05	-0,948	$3,50 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,064	Lote estável
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	17,05	17,02	0,03	0,701	$4,88 \times 10^{-1}$	Lote estável	0,045	Lote estável

\bar{X}_c : média controle; \bar{X}_e : média experimental; *critério teste t: $p \geq 0,05$: lote estável; **critério σ_p : $|\bar{X}_c - \bar{X}_e| \leq 0,1\sigma_p$

Considerando os critérios de aceitabilidade recomendados pelo ISO Guia 35 (ABNT, 2012), norma ISO 13528 (ISO, 2005 b) e documento da IUPAC (THOMPSON *et al.* 2006), os materiais MR5 e MR6 apresentaram estabilidade para todos os parâmetros do escopo (umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável), após seis meses. No entanto, não houve estabilidade do parâmetro umidade para os materiais MR1, MR2, e MR4. Assim, estes materiais foram considerados estáveis somente para os parâmetros cinzas, gordura total e acidez titulável, independente da norma e critérios adotados.

Com relação ao parâmetro umidade do MR3, houve divergência entre os resultados de estabilidade, visto que segundo os critérios do ISO Guia 35 (ABNT, 2012) não houve indicação de instabilidade, enquanto pelos critérios das demais referências, instabilidade foi detectada. Isto não aconteceria se as análises de significância da regressão/inclinação fossem conduzidas após verificação das premissas e adequação ao modelo linear, conforme abordagem de SOUZA & JUNQUEIRA (2005). Assim, optou-se por concluir pela instabilidade do referido material em relação ao parâmetro umidade, com o apontamento da importância da avaliação da adequação do modelo linear previamente à avaliação da significância do parâmetro b_1 estimado.

MR1, MR2 e MR3 correspondem àqueles materiais embalados em sachês tipo *stand-up pouch* de PET metalizado/PEBD, estocados sob temperatura ambiente, congelamento e refrigeração, respectivamente, enquanto o MR4 foi o material acondicionado em frascos de vidro âmbar a temperatura ambiente.

Provavelmente, no caso dos MR embalados nos sachês, ocorreu algum problema na selagem térmica das embalagens, o que promoveu alteração no parâmetro umidade, visto que a falta de estabilidade foi independente da temperatura de armazenamento. Segundo ALVES *et al.* (2008), o ganho de umidade do leite em pó é decorrente da transferência de vapor d'água pela embalagem, o que pode ocorrer devido à permeação pelo material da embalagem ou devido às falhas na região da termosselagem. Quanto ao material embalado em vidro, possivelmente, houve penetração de umidade devido a algum problema no rosqueamento das tampas. Contudo, durante a preparação destes materiais, não tenham foram detectados problemas visíveis durante o fechamento das embalagens.

Os parâmetros cinzas, gordura total e acidez titulável foram estáveis no período de seis meses para todos os MR de acordo com os critérios do ISO Guia 35 (ABNT, 2012) (**Figuras 7 a 12**), da norma ISO 13525 (ISO, 2005 b) (**Tabelas 24 a 29**) e do protocolo da IUPAC (THOMPSON *et al.* 2006) (**Tabelas 30 a 35**), sendo que, neste último, houve uma divergência entre os resultados de cinzas do MR4. Como o protocolo da IUPAC disponibiliza dois critérios para avaliação da estabilidade (pela comparação da diferença das médias dos grupos controle e experimental pelo teste de t ou pelo critério de $0,1x\sigma_p$), não justificaria aceitar o lote como não estável, tendo em vista que o lote foi estável também de acordo com os outros documentos.

CAMPOS *et al.* (1998) avaliaram a influência da inertização com nitrogênio na vida de prateleira do leite em pó acondicionado em embalagens metálicas e, durante um ano, verificaram aumento da acidez e umidade (que foi detectada desde o primeiro mês) tanto no leite acondicionado em embalagem com atmosfera normal como em atmosfera modificada. Os autores justificaram as alterações por reações químicas de oxidação no produto e permeabilidade da embalagem ao vapor d'água, respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados por KREY & SOUZA (2009) que avaliaram a qualidade microbiológica e físico-química do leite em pó integral de 20 lotes diferentes e, após três meses de armazenamento, observaram aumento dos níveis de acidez e umidade em algumas amostras de leite em pó. Com relação ao teor gordura, não foram observadas variações significativas em 95 % dos lotes analisados.

No teste de estabilidade realizado por ANTÓNIO (2007), 16 amostras de MR de leite em pó foram utilizadas, quatro foram armazenadas à temperatura de 40 °C, quatro amostras à temperatura de -5 °C, quatro amostras à temperatura de -20 °C e quatro amostras à temperatura ambiente. Os parâmetros umidade, cinzas, acidez titulável, gordura e proteína foram analisados após 15 dias (temperatura de 40°C) e após um, três, seis e oito meses e meio de armazenamento. Nas amostras armazenadas a 40 °C, todos os parâmetros se mantiveram estáveis após 15 dias. A -20°C, até os seis meses e meio de armazenamento todos os parâmetros se mantiveram estáveis e, após oito meses e meio de armazenamento a acidez titulável e proteína foram instáveis. Nas amostras mantidas a -5°C, apenas a proteína se

manteve estável até aos oito meses e meio. Quanto às amostras mantidas a temperatura ambiente, todos os parâmetros exceto a umidade e a cinzas (já não se encontravam estáveis após três meses e meio de armazenamento), apresentaram uma boa estabilidade. Este autor relatou apenas que utilizou saquetas de leite em pó, mas não especificou o tipo de material utilizado para acondicionamento do MR produzido. Os resultados do teste de estabilidade foram calculados pela ANOVA.

Desta forma, considerando os resultados obtidos no presente trabalho para os MR acondicionados em frascos de vidro, resultados semelhantes foram alcançados para a temperatura de congelamento. Entretanto, na temperatura de refrigeração, na qual foi observada estabilidade para todos os parâmetros do escopo e, na temperatura ambiente, na qual houve instabilidade somente para o parâmetro umidade, foram obtidos melhores resultados de estabilidade.

Para os materiais acondicionados nos sachês, os resultados de ANTÔNIO (2007) foram melhores para a condição de congelamento, visto que não houve problemas com a estabilidade do parâmetro umidade. Contudo para as temperaturas de refrigeração e ambiente, o perfil de estabilidade neste trabalho foi melhor.

Apesar do aumento no teor de umidade nos MR1, MR2, MR3 e MR4, provavelmente, não ocorreram reações de oxidação ou lipólise nos diferentes MR, visto que a acidez foi mantida estável. Isso porque, segundo ARAÚJO (2008) e FELLOWS (2006), a oxidação lipídica ocorre em A_a baixa (menor que 0,1) e em A_a elevada (0,55 a 0,85) e o ganho de umidade que os materiais sofreram possivelmente não foram suficientes para atingir níveis de A_a tão altos que favorecessem a oxidação.

Além disso, de acordo com ARAÚJO (2008), a estabilidade do leite em pó integral se deve à proteção dos glóbulos de gordura por uma camada de lactose, o que evita o contato do oxigênio com a gordura. Soma-se a isto, a formação de compostos antioxidantes durante a secagem à temperaturas elevadas.

O leite possui uma lipase endógena que, poderia provocar a hidrólise dos triglicerídeos resultando num aumento de fração de ácidos graxos livres e, conseqüentemente, num aumento da acidez. Porém, essa enzima está ligada em grande parte às micelas de caseína, o que diminui sua concentração livre e, o aquecimento a 75 °C durante 20 segundos (condições próximas à pasteurização) já é suficiente para inativá-la. Além disso, a membrana do glóbulo de gordura protege

os triglicerídeos do ataque enzimático e, a enzima não consegue atravessá-la com facilidade (ARAÚJO, 2008).

A lipólise pode ocorrer também por lipases extracelulares produzidas por micro-organismos (ARAÚJO, 2008), porém, como o leite em pó é um produto que apresenta A_a de 0,1, dificilmente vai sofrer alterações microbianas, enzimáticas e interações químicas, a não ser que a A_a de água atinja valores maiores que 0,6 (FELLOWS, 2006).

Contudo, como no presente trabalho foi analisada apenas a gordura total, não é possível confirmar a ocorrência ou não de oxidação lipídica, o que seria indicado por determinações de aldeídos, ácidos graxos livres e índices, como o de peróxidos,, o que não era objeto deste estudo.

JEDZINIAK *et al.* (2009) avaliaram a estabilidade do MR para resíduos de medicamentos (5-hidroxi-flunixinolona e meloxicam) em leite de vaca, mas não adotaram os critérios definidos no ISO Guia 35 (ABNT, 2012). A avaliação foi feita por meio de carta controle. As médias obtidas nos estudos de estabilidade foram avaliadas frente a limites de controle definidos a partir da média e desvio padrão obtidos no estudo de homogeneidade. A dispersão dos resultados foi avaliada frente a dados de repetibilidade do estudo de validação.

JOSEPHS *et al.* (2004) analisaram a estabilidade a curto e longo prazo através de estudo isócrono para os três candidatos a MR para micotoxinas, porém não relataram o uso do ISO Guia 35 (ABNT, 2012) como critério.

Demais estudos referentes à produção de MR para leite em pó (RAO *et al.*, 1995; SHARPLESS *et al.*, 2010; TING *et al.*, 2010) não descreveram a estatística utilizada no teste de estabilidade.

5.2.3 Incerteza da homogeneidade e estabilidade

Os valores das incertezas-padrão estimadas no teste de homogeneidade e estabilidade para os seis materiais produzidos, segundo critérios do ISO Guia 35 (ABNT, 2012) encontram-se apresentados nas **Tabelas 36 e 37**.

Tabela 36. Fontes de contribuição para certificação: incertezas-padrão do teste de homogeneidade e estabilidade a longo prazo dos materiais de referência embalados em sachês tipo *stand-up pouch* de politereftalato de etileno metalizado/polietileno de baixa densidade, para os parâmetros cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35

Parâmetros	MR1		MR2		MR3	
	U_{bb}	U_{lts}	U_{bb}	U_{lts}	U_{bb}	U_{lts}
Cinzas	$2,10 \times 10^{-2}$	$1,29 \times 10^{-2}$	$2,10 \times 10^{-2}$	$8,77 \times 10^{-3}$	$2,10 \times 10^{-2}$	$8,66 \times 10^{-3}$
Acidez titulável	$1,04 \times 10^{-1}$	$4,94 \times 10^{-2}$	$1,04 \times 10^{-1}$	$4,49 \times 10^{-2}$	$1,04 \times 10^{-1}$	$4,33 \times 10^{-2}$
Gordura total	$7,15 \times 10^{-2}$	$4,04 \times 10^{-2}$	$7,15 \times 10^{-2}$	$6,46 \times 10^{-2}$	$7,15 \times 10^{-2}$	$7,30 \times 10^{-2}$

U_{bb} : incerteza-padrão da homogeneidade; U_{lts} : incerteza-padrão da estabilidade; MR1: material acondicionado à temperatura ambiente; MR2: material acondicionado sob congelamento ; MR3: material acondicionado sob refrigeração.

Tabela 37. Fontes de contribuição para certificação: incertezas-padrão do teste de homogeneidade e estabilidade a longo prazo dos materiais de referência embalados em frascos de vidro âmbar com tampa de rosca, para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, segundo critérios do ISO Guia 35

Parâmetros	MR4		MR5		MR6	
	U_{bb}	U_{lts}	U_{bb}	U_{lts}	U_{bb}	U_{lts}
Umidade	-	-	$3,21 \times 10^{-2}$	$2,27 \times 10^{-2}$	$3,21 \times 10^{-2}$	$2,33 \times 10^{-2}$
Cinzas	$1,84 \times 10^{-2}$	$1,21 \times 10^{-2}$	$1,84 \times 10^{-2}$	$1,15 \times 10^{-2}$	$1,84 \times 10^{-2}$	$9,37 \times 10^{-3}$
Acidez titulável	$7,69 \times 10^{-2}$	$4,30 \times 10^{-2}$	$7,69 \times 10^{-2}$	$4,29 \times 10^{-2}$	$7,69 \times 10^{-2}$	$4,99 \times 10^{-2}$
Gordura total	$1,46 \times 10^{-1}$	$6,45 \times 10^{-2}$	$1,46 \times 10^{-1}$	$7,79 \times 10^{-2}$	$1,46 \times 10^{-1}$	$6,56 \times 10^{-2}$

U_{bb} : incerteza-padrão da homogeneidade; U_{lts} : incerteza-padrão da estabilidade; MR4: material acondicionado à temperatura ambiente; MR5: material acondicionado sob congelamento ; MR6: material acondicionado sob refrigeração.

Observa-se que houve maior contribuição da incerteza devida à homogeneidade para todos os parâmetros e materiais, exceto para o parâmetro gordura total no MR3, para o qual houve maior contribuição da incerteza-padrão

devida à estabilidade a longo prazo. As incertezas-padrão devidas à homogeneidade apresentaram valores máximos de 0,0321% para umidade, 0,0210% para cinzas, 0,104mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos para acidez titulável e 0,146% para gordura total. Assim, estudos subsequentes de caracterização dos materiais (por diferentes métodos ou laboratórios) se fazem necessários, visto que a incerteza da caracterização constitui o terceiro componente a ser combinado para a estimativa da incerteza expandida associada aos valores de propriedade dos MR produzidos (ABNT, 2012).

6. CONCLUSÕES

O laboratório BRO-UPAA apresentou desempenho satisfatório para as determinações de umidade, cinzas e gordura total, pela avaliação da veracidade dos resultados, pela estatística de z-escore, empregando o único MRC disponível para escopo similar.

Os seis materiais produzidos foram considerados homogêneos para os parâmetros umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável, conforme critérios da norma ISO 13528 (ISO, 2005 b) e do protocolo harmonizado da IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), apesar do maior rigor da primeira.

A estabilidade foi observada para todos os parâmetros (umidade, cinzas, gordura total e acidez titulável) para os materiais embalados em frascos de vidro âmbar sob temperaturas de congelamento e refrigeração, durante seis meses. Para os materiais acondicionados em sachês tipo stand-up pouch de PET metalizado/PEBD e armazenados sob temperatura ambiente, congelamento e refrigeração e para o material acondicionado em frascos de vidro âmbar e armazenado sob temperatura ambiente, somente o parâmetro umidade não foi estável durante os seis meses. Os resultados da avaliação da estabilidade foram concordantes pelas abordagens da norma ISO 13528 (ISO, 2005 b) e do protocolo harmonizado pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2006), apesar do maior rigor do segundo.

O material armazenado em sachês tipo stand-up pouch de PET metalizado/PEBD sob refrigeração foi considerado estável para o parâmetro umidade, somente quando adotados os critérios do ISO Guia 35 (ABNT, 2012). Porém, houve indicação do desvio da linearidade quando da verificação das premissas da regressão, o que reitera a necessidade desta abordagem previamente à análise de significância da regressão/inclinação.

As condições mais adequadas para acondicionamento e armazenamento dos materiais, considerando os quatro parâmetros do escopo, corresponderam aos frascos de vidro âmbar com tampas de rosca e temperaturas de congelamento e refrigeração.

Houve uma maior contribuição da incerteza devida à homogeneidade que da incerteza relativa à estabilidade.

As incertezas-padrão devidas à homogeneidade e estabilidade indicaram que os materiais produzidos, candidatos a MRC, podem ser submetidos a estudos subsequentes de caracterização, que poderão ser realizados por estudos interlaboratoriais empregando um ou mais métodos com veracidade demonstrável.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil) – ANVISA. Resolução RDC Nº 359 de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 dez. 2003, p. 28-32. (a)
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil) – ANVISA. Resolução RDC Nº 360 de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 dez. 2003, p. 33-34. (b)
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). **Rotulagem nutricional obrigatória**: manual de orientação às indústrias de Alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2005, 44 p.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). **Rotulagem nutricional obrigatória**: manual de orientação aos consumidores Educação para o consumo saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. 62 p.
- AIGSTER, A. *et al.* Comparison of cheeses made from milk having normal and high oleic fatty acid compositions. **J. Food Sci.**, v. 65, p. 920-924, 2000.
- ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.V.C. **Vigilância Sanitária**: Tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 224 p.
- ALVES, N.P.; MORAES, D.N. de. **Metrologia química e a utilização de materiais de referência em medições químicas**. São José dos Campos: QUIMLAB - Universidade do Vale do Paraíba, 2003. 19 p.
- ALVES, R. M. V.; MILANEZ, C. R.; PADULA, M. Cappucino em embalagens flexíveis. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (1.: 2000: Poços de Caldas, MG). Resumos expandidos. Brasília, DF: Embrapa Café; Belo Horizonte: Minasplan, 2000. 2v (1490p.), p.654-657.
- ALVES, R. M. V.; JAIME, S. B. M.; ITO, D.; MOREIRA, C. Q. Influência das propriedades de barreira de embalagens flexíveis na estabilidade de leite em pó integral. **Braz. J. Food Technol.**, v. 11, n. 1, p. 46-53, 2008.
- AMARAL, C.R.S.; SANTOS, E.P. Leite cru comercializado na cidade de Solânea-PB: caracterização físico-química e microbiológica. **Rev. Bras. Prod. Agro.**, v.13, n.1, p. 7-13, 2011.
- AMIOT, J. **Ciência y tecnologia de la leche**. 1ª. ed. Zaragoza: ACRIBIA S.A., 1991. 547 p.
- ANTÔNIO, C. **Produção de materiais de referência para análise de macroconstituintes em géneros alimentícios**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2007.

- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos**. 4.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2008. 596p.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT ISO Guia 31:2004. **Materiais de referência** – Conteúdo de certificados e rótulos. Rio de Janeiro, 2004. 8 p. (a)
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT ISO Guia 30. **Termos e definições relacionados com materiais de referência**. Rio de Janeiro, 2011. 10 p.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT NBR NM ISO 15189. **Laboratórios de análises clínicas** - Requisitos especiais de qualidade e competência. Rio de Janeiro, 2008. 57 p.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT ISO Guia 32:2000. **Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados**. Rio de Janeiro, 2000. 7 p.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT ISO GUIA 33:2002. **Utilização de materiais de referência certificados**. Rio de Janeiro, 2002. 28 p.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT ISO GUIA 34. **Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência**. Rio de Janeiro, 2004. 25 p. (b)
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT NBR ISO 9000:2005. **Sistemas de gestão da qualidade** - Fundamentos e vocabulário. Rio de Janeiro, 2005. 35 p. (b)
- Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratório de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005. 31 p. (a)
- Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT ISO Guia 35. **Materiais de referência** – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2012. 73 p.
- BARBOSA, Julicelly Gomes. **Influência da suplementação sobre características físico-química e sensorial do leite de vacas sindi, mantidas a pasto**. 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2007.
- BATISTA, E.S.; COSTA, A.G.V.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 525-535, 2007.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, n. 23, p. 203-227, 2003.
- BAUMAN, D.E. *et al.* Major advances associated with the biosynthesis of milk. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 1235-1243, 2006.

- BHUPATHIRAJU, S.N.; TUCKER, K.L. Coronary heart disease prevention: nutrients, foods, and dietary patterns. **Clinica Chimica Acta**, n. 412, p. 1493-1514, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 2006, p. 8-30.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do leite tipo A, Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 2002, Seção 1, p. 13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite em Pó. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Brasília, 11 mar. 1996, p. 3977.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 369 de 04 de setembro de 1997. Aprova a Inclusão de Coadjuvante de Tecnologia/Elaboração no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Brasília, 08 set. 1997, p. 19699.
- BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA/Tortuga, 1998. 88 p.
- BRITO, M.A. *et al.* **Composição do leite**. Agência de Informação da EMBRAPA. Agronegócio do Leite. 2011. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720_039243.html> Acesso em: 28 ago. 2011.
- BROOKMAN, B. Guidelines for the in-house production of reference materials. **LGC/VAM**, v.2, 1998. 32 p.
- BUENO, A.L.; CZEPIELEWSKI, M.A. A importância do consumo dietético de cálcio e vitamina D no crescimento. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 84, n. 5, p. 386-394, 2008.
- BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics & non-parametric methods. **LC GC**, p. 19-24, 2001.
- BUZINARO, E.F.; ALMEIDA, R.N.A.de; MAZETO, G.M.F.S. Biodisponibilidade do cálcio dietético. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 50, n. 5, Oct., p. 852-861, 2006.

- CÂMARA, M.C.C. *et al.* A produção acadêmica sobre a rotulagem de alimentos no Brasil. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 23, n. 1, p. 52-58, 2008.
- CAMPOS, L.R.; TREPTOW, R.O.; SOARES, G.J.D. Influência da inertização com nitrogênio na vida-deprateleira de leite em pó integral acondicionado em embalagens metalizadas flexíveis. **Rev. Bras. Agro.**, v. 2, n. 2, p. 130-137, 1998.
- CARDOSO, M.H.W.M. *et al.* Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da homogeneidade. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 429-438, 2010.
- CARVALHO, G.R. **A Indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro.** Juiz de Fora: EMBRAPA, 2010. 12 p. (Circular técnica 102).
- CHAVES, C.D. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, Oct. 2010. (Editorial).
- CITAC/EURACHEM (The Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry / A Focus for Analytical Chemistry in Europe). **Guide to quality in analytical chemistry.** An Aid to Accreditation. 2002, 57 p.
- COLLOMB, M. *et al.* Conjugated linoleic acids in milk fat: variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1347-1361, 2006.
- COLTRO, L.; *et al.* Avaliação do Efeito do Transporte no Desempenho de Embalagem Tipo Stand-up Pouch para Produtos Líquidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n 2, p. 69-75, 2002.
- COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; SANTA MARIA, L. C. Polietileno: Principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.
- CUNHA, R.P.L. *et al.* Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas Holandesas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, p.19-24, 2008.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema.** 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.
- DE NONI, I. Reference material needs for quality assessment of milk and dairy products. **Accred. Qual. Assur.**, v. 9, p. 226-231, 2004.
- DUFOUR, J.M.; FARHAT, A.; GARDIOL, L.; KHALAF, L. Simulation-based finite sample normality tests in linear regressions. **Econom. J.**, v. 1, p. 154-173, 1998.
- DURR, J.W.; CARVALHO, M.P; SANTOS, M.V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: UPF, 2004, 331 p.
- EMONS, H.; HELD, A.; ULBERTH, F. Reference materials as crucial tools for quality assurance and control in food analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 135-143, 2006.

- EMONS, H.; LINSINGER, T.P.J.; GAWLIK, B.M. Reference materials: terminology and use. Can't one see the forest for the trees? **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 443-449, 2004.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. WHO (World Health Organization). **Expert consultation on human vitamin and mineral requirements**. Bangkok. 2001.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. **FAOSTAT database**. 2013. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 23 fev. 2013.
- FEARN, T.; THOMPSON, M. A new test for sufficient homogeneity. **Analyst**, v. 126, p. 1414-1417, 2001.
- FELLOWS, P.J. Tecnologia do processamento de alimentos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 602p.
- FERRAZ, I.S. *et al.* Prevalência da carência de ferro e sua associação com a deficiência de vitamina A em pré-escolares. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 2, p. 169-174, 2005.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.
- FONSECA, Carolina Rodrigues. **Efeito do tempo de armazenamento do leite de cabra *in natura* sobre a qualidade e estabilidade do leite de cabra em pó**. 2010. 91 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
- GAIANI, C. *et al.* Milk proteins differentiation and competitive adsorption during spray-drying. **Food Hydrocolloids**, n. 25, p. 983-990, 2011.
- GALIC, K.; SCETAR, M.; KUREK, M. The benefits of processing and packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 127-137, 2011.
- GOMES, J.C. **Legislação de alimentos e bebidas**. Viçosa: Editora UFV, 2007, 635 p.
- GONZÁLEZ, F.H.D; DURR, J.W.; FONTANELI, R.S **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Copyright, 2001. 77 p.
- GRÜDTNER, V.S.; WEINGRILL, P.; FERNANDES, A.L. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 37, n. 3, p. 143-151, 1997.
- GUÉGUEN, L.; POINTILLART, A. The bioavailability of dietary calcium. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n.2, p. 119-136, 2000.

- GUERRA, R. B.; NEVES, E. C. A.; PENA, R. S. Caracterização e processamento de leite bubalino em pó em secador por nebulização. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n.3, p. 443-447, 2005.
- HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.de; PAULA, H. de. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.
- HAUG, A.; HOSTMARK, A.T.; HARSTAD, O.M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, p. 01-16, 2007.
- HILL, A.R.C.; REYNOLDS, S.L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **Analyst**, v. 124, p. 953-958, 1999.
- HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. **Anal. Chem.**, v. 54, p. 67A-76A, 1982.
- INDYK, H.; LITTLEJOHN, V.; WOOLLARD, D.C. Stability of vitamin D3 during spray-drying of milk. **Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 283-286, 1996.
- IHNAT, M. Biological reference materials for quality control of elemental composition analytical data. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 245, n. 1, p. 65-72, 2000.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Sistema IBGE de Recuperação Automática SIDRA**. 2013. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp>>. Acesso em: 25 fev. 2013.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Tabelas de composição de alimentos**. Rio de Janeiro, 5 ed. 1999. 137p.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. INMETRO NIT-DICLA-35 **Princípios de boas práticas de laboratório – BPL**. Rio de Janeiro, 2009. 19 p.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. INMETRO DOQ-CGCRE-016 **Orientação para a seleção e uso de materiais de referência**. Rio de Janeiro, 2010. 15 p.
- International Dairy Federation - IDF. International IDF Standard 81:1981. **Dried milk. Determination of titratable acidity (Routine method)**. Brussels, 1981. 2 p.
- International Standards Organization - ISO. ISO 13528:2005. **Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons**. Geneva, 2005. (b)
- International Standards Organization - ISO. ISO 1736/IDF 009:2008. **Dried milk and dried milk products. Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method)**. Geneva, 2008. 14 p. (a)

- International Standards Organization - ISO. ISO 488/IDF 105:2008. **Milk. Determination of fat content. Gerber butyrometers.** Geneva, 2008. 14 p. (b)
- International Standards Organization - ISO. ISO 2446/IDF 226:2008. **Milk. Determination of fat content.** Geneva, 2008. 12 p. (c)
- International Standards Organization - ISO. ISO 11870/IDF 152:2009. **Milk and milk products. Determination of fat content. General guidance on the use of butyrometric methods.** Geneva, 2009. 7 p.
- International Standards Organization – ISO. ISO 5537/IDF 26:2004. **Dried milk. Determination of moisture content (Reference method).** Geneva, 2004. 7 p.
- International Standards Organization – ISO. ISO 6091/IDF 86:2010. **Dried milk. Determination of titratable acidity (Reference method).** Geneva, 2010. 4 p.
- International Standards Organization – ISO. ISO 8156/IDF 129:2005. **Dried milk and dried milk products. Determination of insolubility index.** Geneva, 2005. 10 p. (a)
- JEDZINIAK, P. et al. In-house reference materials: 5-hydroxyflunixin and meloxicam in cow milk - preparation and evaluation. **Anal. Chim. Acta**, v. 637, p.346-350, 2009.
- JOHNSTON, J. **Econometric methods.** New York: McGraw-Hill Book Company, 1984. p. 287-342.
- JOSEPHS, R. D. et al. Production of certified reference materials for mycotoxins: IRMM's view on the assessment of uncertainties. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 378, p. 1190-1197, 2004.
- KRAUSE, M.V.; ESCOTT-STUMP, S.; MAHAN, L.K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia.** 11. ed. São Paulo: Roca, 2005, 1242 p.
- KREY, T.; SOUZA, C. F. V. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite em pó integral produzido numa indústria da região do Vale do Taquari – RS. **Interbio**, v.3, n.2, 2009.
- LEITE, J.T.C.; MURR, F.E.X.; PARK, K.J. Transições de fases em alimentos: influência no processamento e na armazenagem. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.7, n.1, p.83-96, 2005.
- LEITE, Mônica de Oliveira. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol.** 2006. 62 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- LINSINGER, T.P.J. *et al.* Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p. 20-25, 2001.

- MACHADO, G.R.; SOUZA, E.M.S.; VALVERDE, M.C.S. A análise pest aplicada à prospecção de cenários para o sistema agroindustrial do leite brasileiro. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**, v.2, n.1, jan/abr. p. 20-40, 2010.
- MAIER, E.A.; QUEVAUVILLER, P.; GRIEPINK, B. Interlaboratory studies as a toll for many purposes: proficiency testing, learning exercises, quality control and certification of matrix materials. **Anal. Chim. Acta**, v. 283, p. 590-599, 1993.
- MANAN, D.M.A.; KARIM, A.A.; KIT, W.K. Lactose content of modified enzyme-treated `dadih'. **Food Chemistry**, v. 65, p. 439-443, 1999.
- MARTINS, R.A.; NETO, P.L.O.C. Indicadores de desempenho para a gestão pela qualidade total: uma proposta de sistematização. **Gestão e Produção**, v. 5, n. 3, p. 298-311, dez. 1998.
- MCINTOSH, G.H. *et al.* Whey proteins as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, v. 8, p. 425-434, 1998.
- MILAGRES, R.C.R.M.; NUNES, L.C.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. A deficiência de vitamina A em crianças no Brasil e no mundo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 5, p. 1253-1266, 2007.
- MILLER, G.D.; ANDERSON, J.J.B. The role of calcium in prevention of chronic diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 371S–372S, 1999.
- MINAS GERAIS. CEPA (Conselho Estadual de Política Agrícola). **Plano Setorial bovinocultura de leite**. 2007, 19 p.
- MOURA, J.G.P. **Nutrientes e terapêutica**. 2. Ed. Pelotas: Visão Artes Gráficas, 2009. 340 p.
- NIELSEN, S.S. (Ed.) **Food analysis**. 4. ed. Gaithersburg (Maryland): Aspen, 2010. 602 p.
- NONI, I. Reference material needs for quality assessment of milk and dairy products. **Accred. Qual. Assur.**, v. 9, p. 226-231, 2004.
- OLIVEIRA, L. M. *et al.* Determinação da força de adesão da metalização com alumínio em filmes plásticos utilizados em embalagens flexíveis. **Polímeros**, v. 21, n 3, p. 233-239, 2011.
- ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos** (Volume 2- Alimentos de origem animal). Porto Alegre: Artmed, 2005. 275p.
- PATEL, H.A. *et al.* Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium- and high-heat skim milk powders. **Lait**, v.87, p. 251–268, 2007.
- PEREIRA, G.A.P. *et al.* Cálcio dietético - estratégias para otimizar o consumo. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 49, n. 2, p.164-80, 2009.

- POMERANZ, Y.; MELOAN, C.E. **Food analysis: theory and practice**. 3. ed. New York: Chapman & Hall, 1994. 778 p.
- PUWASTIEN, P.; JUDPRASONG, K.; PINPRAPAI, N. Development of rice reference material and its use for evaluation of analytical performance of food analysis laboratories. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 453-462, 2009.
- RAO, R.R. et al. Preparation and evaluation of the homogeneity of milk as a candidate reference material for carbon-14. **Fresenius J. Anal Chem.**, v. 352, p.136-142, 1995.
- RIBAS, N.P. *et al.* Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p. 2343-2350, 2004 (Supl. 3).
- RIGUEIRA, Juliana Cristina Sampaio. **Influência da contagem de células somáticas no perfil e teores de aminos bioativas e na qualidade de leite cru e de queijo mussarela**. 2010. 147 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- RODRIGUES, T.; ALBANO, F.; SILVA, M. **Preparação e certificação de materiais de referência através de ensaios de proficiência: estudo de caso da rede metroológica RS**. In: 49º Congresso Brasileiro de Química. Porto Alegre: Associação Brasileira de Química. 2 p, 2009.
- RODRIGUES, T.; ALBANO, F. Processo de certificação de materiais de referência. **Revista da Graduação**, v. 4, n. 1, 2011. 17 p.
- ROMEU-NADAL, M. *et al.* Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. **Food Chemistry**, v. 100, 2007, p. 756–763.
- SANTOS, M.V. Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. (Org.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF Editora, 2004, p. 269-283.
- SANTOS, M.F.P.; OLIVEIRA, E.C.; VAITSMAN, D.S FELICIANO, D.S.P.J.; GUIMARÃES, R.C.L. Estimativa da incerteza de medição da fortificação do material de referência certificado (MRC) - uma estratégia criativa. In: Encontro para a Qualidade de Laboratórios, 2005, São Paulo. **Anais...** São Paulo: REMESP, 2005.
- SERT, D. *et al.* Pekmez-dairy desserts fortified with spray-dried dairy powders: effects of the interaction between skim milk powder, yoghurt powder and buttermilk powder by a mixture design approach. **Journal of Texture Studies**, n. 40, p. 606-622., 2009.
- SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades – degradações – modificações. São Paulo: Varela; 1996. 517 p.
- SHAPIRO, R.; HEANEY, R.P. Co-dependence of calcium and phosphorus for growth and bonedevelopment under conditions of varying deficiency. **Bone**, v. 32, p. 532-540, 2003.
- SHARPLESS, K.E. et al. Preparation and characterization of standard reference material 1849 infant/adult nutritional formula. **J. of AOAC Int.**, v. 93, n.4, 2010.
- SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Anal. Chim. Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.
- STAPELFELDT, H.; NIELSON, B.R.; SKIBSTED, L.H. Effect of Heat Treatment, Water Activity and Storage Temperature on the Oxidative Stability of Whole Milk Powder. **Int. Datry Journal**, v. 7, p. 331-339, 1997.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS - TACO. NEPA/UNICAMP. T113. V.II. 2 ed. Campinas, 2006. 113 p.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 835-855, 2002.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. **Pure Appl. Chem.**, v. 78, p. 145-196, 2006.
- THOMPSON, M.; LOWTHIAN, P.J. Statistical aspects of proficiency testing in analytical laboratories. Part 2. Testing for sufficient homogeneity. **Analyst**, v.121, p. 1593-1596, 1996.
- THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure Appl. Chem.**, v. 67, p. 649-666, 1995.
- THOMPSON, M.; WOOD, R. The international harmonised protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. **Pure Appl. Chem.**, v. 65, p. 2123-2144, 1993.
- TING, H., et al. A new certified reference material (GBW10037) of vitamin B3 in infant formula. **J. Food Compos. Anal.**, v. 23, p. 367–372, 2010.
- TORRES, E.A.F.S. *et al.* Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 20, n. 2, mai/ago, 2000.
- Universidade Federal de Santa Catarina / Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – UFSC/ Q. **Leites concentrados e em pó**. Disponível em:
<http://www.eng.ufsc.br/disci/eqa5216/material_didatico/leites_concentrados_e_em_po.htm>. Acesso em: 06 mar. 2013.

- USDA (United States Department of Agriculture). **National Nutrient Database for Standard Reference**. 2011. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>> Acesso em: 31 ago.2011. (a)
- VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A.; VAN DE WIEL, H.J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. **Anal. Chim. Acta**, v. 391, p. 159-171, 1999.
- VIEIRA, L.C.; KANEYOSHI, C.M; FREITAS, H. **Qualidade do leite**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/GadoLeiteiroZonaBragantina/paginas/qualidade.htm>>. Acesso em: 29 ago. 2011.
- VILELA, D.; LEITE, J.L.B.; RESENDE, J.C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. In: SANTOS, G.T.; JOBIM, C.C.; DAMASCENO, J.C. Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.
- WILLIAMS, S.R. **Fundamentos de nutrição e dietoterapia**. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 727 p.
- ZOCCAL, R.; GOMES, A.T. **Zoneamento da produção de leite**. In: ZOCCAL, R. *et al.* (Ed.). A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. p. 163-180.
- ZOCCAL, R.; GOMES, A.T.; CARVALHO, L.A. **O agronegócio do leite: análise e perspectivas**. In: Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, Cuiabá, 2004.