



***Comparação de Métodos Analíticos de Referência:
Determinação da Humidade do Leite em Pó***

Marlene Santos Silva

2013



***Comparação de Métodos Analíticos de Referência:
Determinação da Humidade do Leite em Pó***

Marlene Santos Silva

Trabalho de Projecto para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e
Segurança Alimentar

Trabalho de Projecto realizado sob a orientação da Doutora Susana Bernardino

2013

Título: Comparação de Métodos Analíticos de Referência: Determinação da Humidade do
Leite em Pó

Copyright © Marlene Santos Silva

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2013

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, e acima de tudo gostaria de agradecer aos meus pais aos quais dedico este trabalho, por todo o apoio financeiro, pela motivação e compreensão que me deram ao longo de toda a minha vida académica.

À Prolacto, na pessoa da Sr^a. Eng^a. Maria Melo, gostaria de agradecer a oportunidade dada para a realização de um estágio na empresa, bem como a todos os seus colaboradores que sempre estiveram disponíveis a ajudar-me e ao meu acolhimento no seio da fábrica.

Ainda em nome da Prolacto, agradeço ao chefe de fabricação, Sr. Eduardo Soares por me ter auxiliado no processo de fabrico do leite em pó.

A todos os professores que foram determinantes para mim e que serviram de modelo, especialmente à professora Doutora Susana Bernardino pelo fato de ter aceitado o desafio de orientar-me durante a realização do meu Estágio, quer seja pela compreensão, conselhos e ensinamentos transmitidos.

Agradeço ao professor José Pestana pelas sugestões que me deu ao longo do trabalho.

Agradeço ainda à professora Susana Mendes, por toda a sua ajuda na parte do tratamento estatístico dos resultados, a sua ajuda foi muito importante.

A todos os meus amigos que estiveram sempre presentes nos bons e nos maus momentos, em especial à minha querida amiga Ana Cristina Serpa por nunca me ter deixado desistir.

Finalmente, mas não por último, um muito obrigado a todos os meus colegas e amigos de curso que me acompanharam ao longo de toda a vida académica.

Resumo

O leite em pó é um derivado do leite natural, obtido pela desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados. Este produto deve estar protegido da humidade, uma vez que o aumento da humidade relativa do ambiente em contacto com o produto pode acarretar o aumento da humidade do leite, ocasionando a aglomeração do pó, permitindo o desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias, potencialmente capazes de produzir micotoxinas prejudiciais à saúde, perda da qualidade visual, problemas na textura e alteração das características sensoriais, tornando-se assim, importante o controlo deste parâmetro (humidade). Este trabalho teve como objetivo comparar o método Karl Fischer com o método de Estufa, para o parâmetro da humidade do leite em pó, validando-se desta forma o método Karl Fischer. Para tal, foi utilizada uma amostra de referência, com valor de humidade conhecido para ambos os métodos (2.13 % para o método da Estufa e 2.71% para o método Karl Fischer). Na validação do Karl Fischer, foram testadas várias temperaturas (130°C, 125°C e 120° C) até ser encontrada a temperatura ótima de funcionamento do mesmo. Foi testada a repetibilidade, a reprodutibilidade e a exatidão de ambos os métodos.

Na análise dos resultados utilizou-se a ferramenta estatística SPSS e aplicou-se o teste t-student para comparar as médias dos resultados obtidos. Verificou-se através dos resultados obtidos que, quando comparado o método da Estufa com o Karl Fischer para as 40 análises, verificou-se que em termos médios ambos os métodos apresentaram diferenças significativas quer para os resultados obtidos (2.76% e 2.16%, para o método de Karl Fischer e para o método de Estufa, respetivamente), quer para os desvio do valor obtido face ao valor de referência (0.07 para a Estufa e 0.11 para o Karl Fischer). Após ter-se encontrado a temperatura ótima de funcionamento do método de Karl Fischer, comparou-se novamente ambos os métodos para as 20 análises realizadas à temperatura ótima de funcionamento do Karl Fischer e verificou-se que em relação aos valores obtido para ambos os métodos, em termos médios existiram diferenças significativas (2.65% para a Estufa e 2.16% para o Karl Fischer). Em relação ao valor obtido face ao valor de referência para as 20 análises, não houve diferenças significativas (0.07 para o método de Estufa e 0.06 para o método de Karl Fischer).

Na avaliação da validação, apesar de ambos os métodos mostrarem-se validados em relação à sua repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão, verificou-se que o método de Karl Fischer foi o que apresentou melhores resultados pelo que será mais viável, realizar

a determinação da humidade do leite em pó através do método de Karl Fischer, pois este método é mais sensível.

Palavras-Chave: Leite em pó; Humidade; Método de Karl Fisher; Método de Estufa;

Abstract

Milk powder is derived from natural milk, obtained by the dehydration of whole cow's milk, skimmed or semi-skimmed and fit for human consumption, through appropriate technological processes. This product must be protected from moisture, since increasing the relative humidity of the atmosphere in contact with the product can result in increased milk moisture, causing agglomeration of the powder, allowing the development of fungi, yeasts and bacteria can potentially produce mycotoxins detrimental to health, loss of visual quality problems change in texture and sensory characteristics, making it important to control this parameter (moisture). This work aimed to compare the Karl Fischer method with Oven method, for moisture parameter of milk powder, validating in this way the Karl Fischer method.

To this end, was used a reference sample with known humidity value for both methods (2.13 % for the oven method and 2.71 % for the Karl Fischer method). The Karl Fischer method validation, were tested various temperatures (130°C, 125°C e 120°C) until to be found the optimum temperature of operation. Was tested the repeatability, reproducibility and the accuracy of both methods.

In the analyzing of the results was used the SPSS statistical tool and applied the Student t-test to compare the average results. It was found from the results obtained that compared with the method of Karl Fischer oven for 40 analyzes showed that on average both methods showed significant differences for either the results obtained (2.76 % and 2.16 % for the Karl Fischer method and the method of Oven method, respectively) and for the deviation from the value obtained over the reference value (0.07 for oven method and 0.11 for the Karl Fischer method). After having found the optimum temperature for operation of the Karl Fischer method, was compared again both methods for the 20 tests carried out at optimum temperature of operation of the Karl Fischer and it was found that compared to the values obtained for both methods on average there were significant differences (2.65 % to 2.16 % for Oven and Karl Fischer). Regarding the value obtained over the reference value for the 20 analyzes, no significant differences (0.07 to 0.06 and Greenhouse method for the Karl Fischer method).

In the evaluation of the validation, although both methods show themselves in relation to their validities repeatability, reproducibility and accuracy, it was found that the the Karl Fischer method showed the best results to be the more viable, perform the determination

of moisture milk powder using the Karl Fischer method, because this method is more sensitive.

Key-Words: Milk powder; moisture; Karl Fischer method, Oven method;

Índice Geral

Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	VI
Abstract.....	IX
Índice de Figuras.....	XVI
Índice de Tabelas.....	XIX
Lista de Abreviaturas.....	XXI
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1. Considerações gerais.....	1
1.1 Enquadramentos e Objetivos.....	1
Capítulo 2 – Revisão bibliográfica.....	2
2.1 Apresentação do local de estágio.....	2
2.1.1 Prolacto – Lacticínios de São Miguel, SA.....	2
2.2 Dados de produção de leite em pó.....	4
2.3 Consumo <i>Per Capita</i> de Leite em Portugal.....	4
2.4 Consumo <i>Per Capita</i> de Leite em pó em Portugal face a outros produtos lácteos.....	6
2.5 Leite em Pó.....	6
2.5.1 Composição do leite em pó.....	7
2.5.2 Classificação.....	7
2.5.3 Características Sensoriais.....	8
2.5.4 Aspetos Microbiológicos.....	8
2.5.5 Vantagens da utilização do leite em pó.....	10
2.5.6 Fatores que influenciam a qualidade do leite em pó.....	10
2.5.6.1 Viscosidade.....	10
2.5.6.2 Capacidade espumante.....	11
2.6 Fatores envolvidos na deterioração da qualidade do leite em pó.....	11
2.6.1 Acidez.....	11
2.6.2 Sedimentos.....	11
2.6.3 Humidade.....	11
2.6.4 Solubilidade.....	11
2.6.5 Rancidez hidrolítica.....	12
2.6.6 Oxidação.....	12
2.7 Produção de leite em pó.....	13
2.7.1 Fluxograma.....	13

2.7.2	Descrição das etapas.....	14
2.7.2.1	Receção de leite fresco.....	14
2.7.2.2	Armazenamento.....	14
2.7.2.3	Desnate.....	15
2.7.2.4	Estandarização.....	15
2.7.2.5	Pasteurização.....	15
2.7.2.6	Evaporação/Concentração.....	16
2.7.2.7	Secagem.....	16
2.7.2.8	Enchimento.....	17
2.8	Umidade.....	17
2.8.1	Conceito de umidade.....	17
2.8.2	Importância da determinação da umidade.....	17
2.8.3	Fatores que influenciam o teor de umidade do leite em pó.....	19
2.8.4	Métodos para a determinação da umidade.....	20
2.8.4.1	Métodos Diretos.....	21
2.8.4.1.1	Método de Estufa.....	21
2.8.4.1.2	Infravermelho.....	24
2.8.4.1.3	Métodos de Destilação.....	25
2.8.4.1.3.1	Tolueno.....	25
2.8.4.1.3.2	Brown Duvel.....	26
2.8.4.1.4	Método de Karl Fischer.....	26
2.8.4.2	Métodos Indiretos.....	29
2.8.4.3	Cálculo do teor de umidade.....	29
Capítulo 3	– Metodologia.....	30
3.1	Determinação da umidade do leite em pó pelo método de Estufa.....	30
3.1.1	Amostragem.....	30
3.1.2	Preparação da amostra.....	30
3.1.3	Preparação das cápsulas.....	30
3.1.4	Procedimento para a determinação da umidade através do método de estufa.....	31
3.2	Determinação da umidade do leite em pó pelo método de Karl Fischer.....	31
3.2.1	Amostragem.....	31
3.2.2	Preparação da amostra.....	32
3.3.3	Preparação dos frascos.....	32
3.3.4	Preparação do Drift.....	32

3.3.5	Preparação do branco.....	32
3.3.6	Procedimento para a determinação da humidade através do método de Karl Fischer.....	33
Capítulo 4	– Discussão de resultados.....	36
4.1	Comparação do Método de Estufa com o Método de Karl Fischer para a determinação da humidade do leite em pó.....	36
4.1.1	Comparação do Método de Estufa com o Método de Karl Fischer para as 40 análises.....	36
4.1.2	Comparação do Método de Estufa com o Método de Karl Fischer após encontrar Temperatura (°C) óptima de funcionamento do método Karl Fischer.....	39
4.2	Validação do método de Karl Fischer e do método de Estufa.....	41
4.2.1	Validação do método de Karl Fischer.....	42
4.2.1.1	Análise da repetibilidade do método de Karl Fischer.....	42
4.2.1.2	Análise da reprodutibilidade do método de Karl Fischer.....	43
4.2.1.3	Análise da exatidão do método de Karl Fischer.....	44
4.2.2	Validação do método de Estufa.....	44
4.2.2.1	Análise da repetibilidade do método de Estufa.....	44
4.2.2.2	Análise da reprodutibilidade do método de Estufa.....	45
4.2.2.3	Análise da exatidão do método de Estufa.....	46
Capítulo 5	– Conclusões.....	48
Capítulo 6	– Bibliografia.....	51
Capítulo 7	– Anexos.....	55
7.1	Anexo 1– Metodologia.....	55
7.1.1	Preparação das Cápsulas.....	55
7.1.2	Procedimento para determinação da humidade (método de Estufa)....	56
7.1.3	Preparação dos frascos (método Karl Fischer).....	57
7.1.4	Preparação d <i>Drift</i>	57
7.1.5	Preparação do branco.....	58
7.1.6	Procedimento para a determinação da humidade (método de Karl Fischer).....	58
7.2	Anexo 2 – Tratamento Estatístico dos Resultados.....	62

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Fábrica Prolacto- Lactínicos de São Miguel, S.A	3
Figura 2.2 - Instalações da Prolacto- Lactínicos de São Miguel, S.A.....	3
Figura 2.3 - Percentagem do consumo de leite, leites acidificados, queijo, bebidas à base de leite, leite em pó, manteiga e outros produtos frescos (incluindo a nata), no contexto do consumo humano <i>per capita</i> (kg/habitante) de leite e produtos lácteos no período de 2008 a 2012.	5
Figura 2.4 - Fluxograma do processo de fabrico do leite em pó de acordo com a Prolacto.....	13
Figura 2.5 - Cápsulas de alumínio para determinação da humidade.....	22
Figura 2.6 - Medidor de humidade por Infravermelho	25
Figura 2.7 - Aparelho Karl Fischer	28
Figura 3.1 - Amostra de referência de leite em pó (DDP-1)	30
Figura 4.1 - Comparação dos valores médios de humidade, quando comparadas as 40 análises para ambos os métodos (KF e Estufa). Os valores são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (DP)	37
Figura 4.2 - Comparação dos valores médios dos desvios do valor de referência face ao valor obtido (em absoluto) de humidade, quando comparadas as 40 análises para ambos os métodos (KF e Estufa). Os valores são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (DP)	38
Figura 4.3 - Comparação dos valores médios de humidade, quando comparadas as 20 análises para ambos os métodos (KF e Estufa). Os valores são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (DP).....	40
Figura 4.4 - Comparação dos valores médios dos desvios do valor de referência face ao valor obtido (em absoluto) de humidade, quando comparadas as 20 análises para ambos os métodos (KF e Estufa). Os valores são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (DP)	40
Figura 7.1.1 - Cápsulas na estufa (Hereaus).....	55
Figura 7.1.2 - Exsiccador com cápsulas a arrefecer.	55
Figura 7.1.3 - Balança (Mettler) com cápsula vazia.....	55
Figura 7.1.4 - Pesagem da amostra (2g).....	56
Figura 7.1.5 - Distribuição da amostra pela superfície da cápsula	56
Figura 7.1.6 - Amostra distribuída pela superfície da cápsula	56
Figura 7.1.7 - Estufa (Hereaus) com as placas contendo aproximadamente 2g de amostra.	56

Figura 7.1.8 - Exsicador com os frascos a arrefecer.....	57
Figura 7.1.9 - Colocação do tubo metálico no frasco.....	57
Figura 7.1.10 - Colocação da tampa de borracha	57
Figura 7.1.11 - Selagem do branco com fita de alumínio.....	58
Figura 7.1.12 - Colocação da tampa de borracha	58
Figura 7.1.13 - Tara do frasco vazio	58
Figura 7.1.14 - Pesagem da amostra (~0.5g)	58
Figura 7.1.15 - Selagem dos frascos com fita metálica.....	58
Figura 7.1.16 - Aparelho Karl Fischer com as amostras.....	59
Figura 7.1.17 - Seleção do botão “drain”	59
Figura 7.1.18 - Drenagem do solvente	59
Figura 7.1.19 - Seleção do botão “Fill”	59
Figura 7.1.20 - Enchimento do copo de titulação com metanol.....	59
Figura 7.1.21 - Seleção do botão “Stirrer”.....	60
Figura 7.1.22 - Seleção do botão “H ₂ O 120°”.....	60
Figura 7.1.23 - Seleção do botão “Samples”	60
Figura 7.1.24 - Seleção do Loop 2	60
Figura 7.1.25 - Seleção da tecla “ID 1”	61
Figura 7.1.26 - Identificação das amostras.....	61
Figura 7.1.27 - Seleção da tecla “Sample size”	61
Figura 7.1.28 - Impressora (Mettler-Toledo).....	61

Índice de tabelas

Tabela 2.1- Quantidade (em mil ton) de produtos lácteos produzidos em Portugal nos anos 2010 e 20114

Tabela 2.2 - Consumo humano de leite e produtos lácteos *per capita* (kg/habitante), por leite e tipo de produtos lácteos..... 5

Tabela 2.3 - Composição físico-química de leite em pó integral7

Tabela 2.4 - Critérios microbiológicos e tolerância para leite em pó9

Tabela 2.5 - Tabela de humidades relativas residuais calculadas no final da secagem numa estufa a 102 °C23

Tabela 3.1 - Toma da amostra consoante o nível de humidade esperado33

Tabela 4.1- Interpretação dos resultados para o z-score..... 42

Tabela 4.2 - Resultados médios obtidos para as várias temperaturas do forno do método Karl Fischer (130°C, 125°C e 120°C).....43

Tabela 7.2.1 - Resultados do teor de humidade determinados pelos dois métodos (KF e Estufa) para a amostra de referência62

Tabela 7.2.2 - Teste t-student para comparar a média dos valores obtidos bem como a média dos desvios para o método de Estufa e para o método de Karl Fischer nas 40 análises63

Tabela 7.2.3 - Teste t-student para comparar a média dos valores obtidos bem como a média dos desvios para o método de Estufa e para o método de Karl Fischer nas 20 análises após encontrar temperatura ótima de funcionamento do Karl Fischer64

Tabela 7.2.4 - Resultados obtidos na determinação do teor de humidade por diferentes analistas63

Lista de Abreviaturas

CE – Comunidade Europeia

p-value - estatística utilizada para sintetizar o resultado de um teste de hipóteses; é definido como a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual, assumindo verdadeira a hipótese nula (as amostras são iguais)

Reg – Regulamentos do Parlamento Europeu

RKF- Reagente Karl Fischer

Sig, nível de significância - limite que se toma como base para afirmar que um certo desvio é decorrente do acaso ou não

ufc – unidades formadoras de colónias

Capítulo 1 - Introdução

1. Considerações gerais

1.1 Enquadramento e objetivos

O presente trabalho surge no âmbito do estágio profissional para a conclusão do Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar ministrado na Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche. Este estágio foi realizado no laboratório do departamento de Controlo de Qualidade da fábrica Prolacto- Lacticínios de São Miguel, S.A sediada no concelho da Lagoa na Ilha de São Miguel, tendo uma duração de 6 meses (1040 horas), iniciado a 1 de Outubro de 2012 e finalizado a 29 de Março de 2013, com uma carga horária de 40 horas semanais.

A Prolacto foi fundada em 1968, iniciando a sua laboração em 1971. Tendo como atividades principais a produção de leite em pó e manteiga sem sal.

Uma vez que a alimentação é parte integrante e essencial da vida, os parâmetros de qualidade têm de ser forçosamente exigentes. Quantitativamente, a qualidade de um produto alimentar é determinada por vários parâmetros de controlo, isto é, temos de ter em atenção se as quantidades de cada componente do alimento estão conforme os limites estabelecidos. Assim sendo, este trabalho incidiu no produto alimentar que constitui 95% da produção da fábrica Prolacto, o leite em pó e na avaliação do parâmetro físico-químico humidade.

Este trabalho teve como principal objetivo a determinação da humidade do leite em pó, através do método Karl Fisher e do método de Estufa, comparando os diferentes métodos quanto à sua melhor quantificação, no que diz respeito nomeadamente à precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e exatidão de ambos os métodos. Fazem parte deste documento a pesquisa bibliográfica relativa ao tema proposto, a realização experimental dos métodos e a determinação da humidade do leite em pó e o respetivo tratamento dos resultados.

Capítulo 2 – Revisão bibliográfica

2.1 Apresentação do local de estágio

2.1.1 Prolacto – Lacticínios de São Miguel, SA

Reconhecendo as potencialidades da ilha de São Miguel na produção de leite, a Nestlé inicia em 1967 diligências com vista à celebração de um acordo com a Unileite, acordo esse que se celebra em 1968. É fundada, em Agosto desse mesmo ano, a Sociedade Prolacto Lacticínios de São Miguel, S.A.R.L., com cerca de 75% de capital da Nestlé e o restante da Unileite. Só em 1992 é que a Nestlé Portugal adquire os restantes 25% da Sociedade à Unileite, passando a partir desse momento a ser a detentora dos 100% do capital da Prolacto.

A Prolacto, sediada no concelho da Lagoa, é uma empresa multinacional especializada na produção de leite em pó.

Em 1971 iniciou a laboração da fábrica, com uma capacidade de secagem de 30 milhões de litros de leite fresco por ano, mas com toda a estrutura de base para que a produção pudesse ser duplicada. Nos anos 80 foram realizadas modificações nas instalações com o objetivo de aumentar a capacidade, podendo assim laborar maiores volumes de leite fresco. Atualmente, tem uma capacidade de produção de secagem de 85 milhões de litros de leite fresco.

A fábrica está organizada por vários setores, tais como: direção da fábrica, serviços administrativos, laboratório, serviços técnicos e produção. As instalações da fábrica ocupam uma área total de 31.3000 m², sendo cerca de 26.000 m² de área exterior e 5.300 m² de área coberta. Nesta são compreendidas para além das instalações de produção, dois armazéns, um edifício de serviços gerais auxiliares e oficina, um edifício administrativo, um edifício social, pequenos anexos de armazenagem, depósitos de água potável, depósitos de fuel-óleo, uma ETARI (Estação de Tratamento de Águas Residuais Industriais) e uma loja do pessoal, como ilustra a figura 2.2.



Figura 2.1- Fábrica ProLacto- Lactinios de São Miguel, S.A

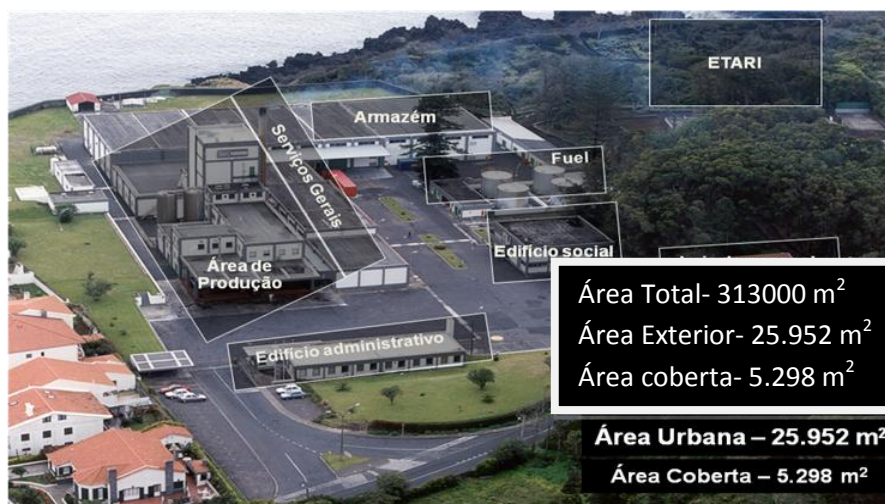


Figura 2.2- Instalações da ProLacto- Lactinios de São Miguel, S.A

Esta fábrica está preparada para a transformação de leite fresco em vários tipos de leite em pó, sendo eles:

- ✓ Leite em pó magro (com ou sem adição de cálcio) – 1% de gordura;
- ✓ Leite em pó magro com adição de Soro – 1.2% de gordura;
- ✓ Leite em pó meio-gordo – 14.5-15.5% de gordura;
- ✓ Leite em pó meio-gordo com adição de soro – 8-9.5% de gordura;
- ✓ Leite em pó gordo (com ou sem adição de vitaminas) - 26% de gordura;
- ✓ Leite em pó gordo especial para a produção de chocolates – 26-28% de gordura;
- ✓ Leite em pó rico em matéria gorda – 51-53% de gordura;

A nata retirada na produção do leite magro e meio gordo é aproveitada para a produção de manteiga sem sal.

Toda a produção (leite em pó e manteiga sem sal) da Prolacto destina-se a outras unidades fabris nacionais e estrangeiras do grupo Nestlé, funcionando como fornecedora de matéria-prima para a produção de diversos produtos, onde podemos destacar o chocolate, o leite em pó instantâneo e as farinhas lácteas.

2.2 Dados de produção de leite em pó

Recolhidos os dados estatísticos disponibilizados pelo INE, foi elaborada a Tabela 2.1 que reúne, para o período de 2010 a 2011, a informação respeitante à quantidade total (mil ton) de leite em pó produzido em Portugal. Assim, analisando os dados estatísticos do INE relativos ao ano de 2011 verificou-se que, a quantidade total de leite em pó produzido em Portugal neste período de tempo foi de 21 344 mil de toneladas.

Comparando a produção total de leite em pó em 2011 com a produção em 2010, constatou-se um decréscimo da produção total de leite em pó na ordem de 2 173 mil toneladas.

Tabela 2.1- Quantidade (em mil ton) de produtos lácteos produzidos em Portugal nos anos 2010 e 2011

	2010	2011
Produtos lácteos produzidos (mil ton)		
Leite	822 468	815 868
Leite em pó	23 517	21 344
Manteiga	27 211	27 704
Nata	22 875	24 283
Queijo de vaca	54 385	53 264
logurte	118 308	116 429

Fonte: INE, Estatísticas Agrícolas 2012 (disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=153380933&PUBLICACOESmodo=2)

2.3 Consumo *Per Capita* de Leite em Portugal

Segundo os últimos dados disponíveis pelo INE (tabela 2.2), o consumo de leite *per capita* tem registado em Portugal uma ligeira quebra, com uma descida de

88.9kg/hab para 83.7 kg/hab entre 2008 e 2012, o que traduzindo estes valores para percentagem o consumo de leite ronda os 64% como se pode verificar na figura 2.1.

A Tabela 2.2 mostra o consumo humano de leite e produtos lácteos *per capita* (kg/habitante), por leite e tipo de produtos lácteos (leite acidificado que inclui o iogurte, queijo, bebidas à base de leite, leite em pó, manteiga e outros produtos frescos que incluem a nata) para o período temporal 2008-2012. A Figura 2.1 revela a percentagem do consumo de cada um dos géneros alimentícios referidos e que compõem o grupo do leite e produtos lácteos.

Tabela 2.2- Consumo humano de leite e produtos lácteos *per capita* (kg/habitante), por leite e tipo de produtos lácteos

Anos	Consumo humano per capita (kg/habitante)						
	Leite	Leites acidificados (incluindo iogurtes)	Queijo	Bebidas à base de leite	Leite em pó	Manteiga	Outros produtos frescos, incluindo a nata
2008	88,9	20,9	12,8	7,5	2,1	1,5	1,9
2009	85,2	23,0	12,9	7,4	1,8	1,6	2,2
2010	88,9	21,8	12,9	7,6	1,6	1,7	2,0
2011	83	23,2	12,9	7,6	1,3	1,9	1,4
2012	83,7	22,1	11,9	7,4	1,6	1,9	1,4

Fonte: INE (disponível em http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000214&selTab=tab2) acedido em Agosto de 2013)

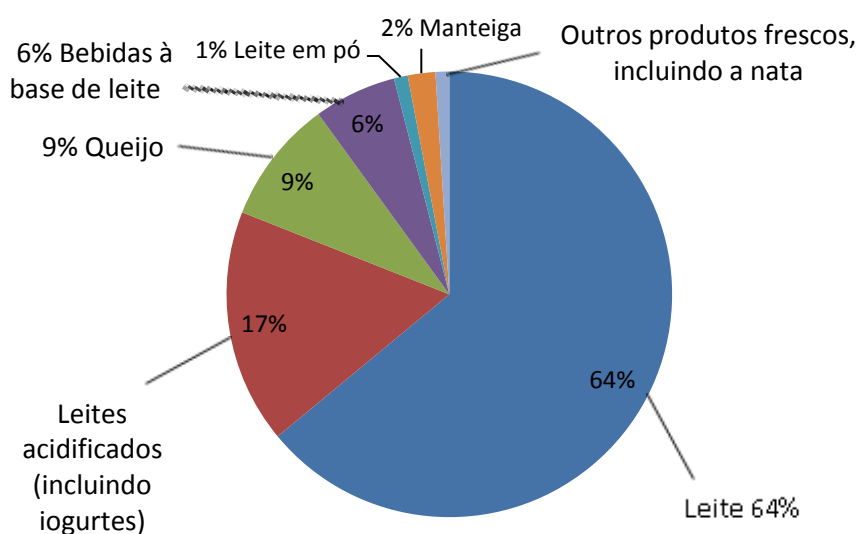


Figura 2.3- Percentagem do consumo de leite, leites acidificados, queijo, bebidas à base de leite, leite em pó, manteiga e outros produtos frescos (incluindo a nata), no contexto do consumo humano *per capita* (kg/habitante) de leite e produtos lácteos no período de 2008 a 2012.

2.4 Consumo *Per Capita* de Leite em pó em Portugal face a outros produtos lácteos

Conforme é patente na tabela 2.2, entre 2008 e 2012 há um decréscimo no consumo humano, *per capita*, de leite e dos diferentes tipos de produtos lácteos à exceção dos leites acidificados (incluindo os iogurtes) e manteiga, onde se verifica um ligeiro aumento do consumo de 1.2 kg/hab e 0.4kg/hab respetivamente. O consumo de leite em pó passou de 2.1 para 1.6kg/hab.

Apesar do decréscimo verificado, o leite continua a ser o género alimentício com maior importância no contexto do consumo humano *per capita*, possuindo cerca de 64% de consumo. Segue-se-lhe os leites acidificados (incluindo os iogurtes), o queijo e as bebidas à base de leite, com consumos de 17%, 9% e 6%, respetivamente, colocando o leite em pó como um dos menos consumidos com apenas 1%, como se pode verificar na figura 2.1.

2.5 Leite em Pó

Com o aumento do consumo e da produção do leite, surgiu a necessidade de aprimoramento de técnicas e de higienização na obtenção, transporte e conservação do leite, com o objetivo de garantir um produto limpo e saudável e com maior tempo de conservação. Por isso existem processos que podem melhorar a qualidade e aumentar a vida de prateleira do produto. Assim, surge o leite em pó, que oferece uma grande economia durante o armazenamento, uma vez que ocupa menos espaço devido à remoção de água, transporte (mais fácil e barato) e também pela sua durabilidade pelo que tem um maior prazo de validade em relação ao leite fluido (MAPA, 2013).

O leite em pó é um derivado do leite natural. Este é obtido pela desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados (MAPA, 2013). A água que é o maior componente do leite “in natura”, com aproximadamente 90%, é eliminada através de um processo um processo de evaporação e secagem, restando o extrato seco do leite e uma pequena quantidade de água, cerca de 2,5% a 4,0%. A presença de gordura influencia a produção do leite em pó, devido ao perigo de oxidação e rancificação, durante o processo de armazenamento. Um problema que ocorre com o leite em pó é a solubilidade em água do produto acabado, podendo ocorrer assim, a adição de lecitina a qual facilitará sua dispersão em água (MILKNET, 2013). Por isso, é necessário que o

leite, no decorrer do processo, não sofra modificações profundas que impeçam sua dissolução total em água, quando da sua reconstituição.

O leite em pó é normalmente usado em produtos de panificação e confeitaria, farinhas lácteas, chocolates, gelados, iogurtes, queijos, entre outros. (MILKNET, 2013).

2.5.1 Composição do leite em pó

O conteúdo em nutrientes do leite em pó depende das perdas durante o processo de concentração e as demais que se originam durante a secagem.

Tabela 2.3- Composição físico-química de leite em pó integral

Nutrientes	Leite em pó integral (100g)
Valor Energético	490 Kcal
Gordura	26,0g
Proteínas	26,4 – 29,0g
Lactose	35,0 – 37,7g
Vitaminas	6,9mg
Sais minerais	8,0mg
Humidade	2,0 – 3,5%

Fonte: FRANCO, G. 1992

2.5.2 Classificação

O leite em pó pode ser classificado conforme o seu teor de gordura. Segundo o Decreto-Lei n.º 213/2003, de 1 de Setembro, o leite em pó pode ser classificado em:

- Leite em pó rico em matéria gorda: contém em massa pelo menos 42% de matéria gorda
- Leite em pó gordo: Contém em massa pelo menos 26% e menos de 42% de matéria gorda;
- Leite em pó parcialmente desnatado: contém em massa mais de 1.5% e menos de 26% de matéria gorda;
- Leite em pó magro: contém em massa um máximo de 1.5% de matéria gorda.

2.5.3 Características Sensoriais

O leite em pó quanto ao seu aspeto, deve apresentar um pó uniforme e sem grumos. Não deve conter substâncias estranhas macro e microscopicamente visíveis. Deve ter uma cor uniforme, branco ou cremoso claro (devido ao tratamento térmico). Não pode haver tonalidades amareladas que acusem um produto reaquecido e o seu sabor e odor devem ser agradáveis e não rançoso, semelhante ao leite fluido, antes e após a sua reconstituição (Inmetro, 2013).

2.5.4 Aspetos Microbiológicos

A microbiologia do leite em pó depende de numerosos fatores, como o número e tipos de bactérias presentes no leite cru, a temperatura de aquecimento, as condições higiénicas do secador e as condições de secagem. Se o leite cru contém um grande número de microrganismos, isto se reflete no leite em pó. É estabelecido uma relação geral entre os teores de leite cru e leite em pó e quando os microrganismos do leite cru ultrapassam 10^5 UFC/ml frequentemente se obtém um produto em pó com teores superiores a 10^4 UFC/g (AMIOT,1991).

Tanto os coliformes totais como a *Escherichia coli* são importantes indicadores no leite em pó, uma vez que não são termorresistentes e sua presença indica um tratamento térmico claramente insuficiente ou uma contaminação posterior ao mesmo. Sem dúvida, a presença de *Escherichia coli* não indica necessariamente uma contaminação fecal, já que a bactéria é causadora de mamite e pode estar presente no leite (AMIOT, 1991).

Um dos maiores riscos do leite em pó seco por atomização é a *Salmonella*, que chega ao leite em pó a partir de focos de contaminação dentro do secador onde o microrganismo é capaz de sobreviver e, em alguns casos, multiplicar-se durante longos períodos de tempo. Podem atuar como focos nas diferentes partes do sistema de manipulação do pó e nas fissuras das paredes do secador. A *Salmonella* é capaz de sobreviver aos processos de secagem por atomização, pois este não garante a segurança do produto devido ao seu ambiente. A presença da *Salmonella* em qualquer fase do processo depois do tratamento térmico indica falha do sistema de controlo (ORDÓÑEZ, 2005).

O leite em pó não deve conter substâncias estranhas de qualquer natureza, deve estar isento de microrganismos patogênicos (*Salmonella sp. Staphylococcus coagulase positivo*) e indicadores de higiene deficiente (grupo coliformes) (MAPA, 1998).

O Regulamento (CE) nº 1441/2007, de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios estabelece limites para o leite em pó em relação ao parâmetro de *Enterobactérias*, *Estafilococos coagulase positiva* e *Salmonella*. Segundo este regulamento, o valor médio de *Enterobactérias* não pode ser superior a 10 ufc/g, num total de 5 amostras obtidas de um mesmo lote. O valor médio de *Estafilococos* não pode ser superior 10 ufc/g no total de 5 amostras obtidas de um mesmo lote, onde duas amostras (das 5) podem ter um valor superior a 100 ufc/. A *Salmonella* deve estar ausente em 25g num total de 5 amostras de um mesmo lote. (CE, 2007). A Portaria n.º 533/93 de 21 de Maio e respetivas alterações, designados por “Germes indicadores – diretrizes destinadas à avaliação do bom funcionamento do sistema de autocontrolo e produção”, define o valor de Coliformes a 30°C. Segundo a mesma, o valor médio de Coliformes a 30°C não deve ser superior a 0 num total de 5 amostras obtidas de um mesmo lote, onde 2 (das 5) podem ter um valor superior a 10 ufc/g (Portaria 533/93).

A tabela 2.4 apresenta os critérios microbiológicos e tolerância para leite em pó.

Tabela 2.4- Critérios microbiológicos e tolerância para leite em pó

Categoria de Alimentos	Microrganismos	Plano de amostragem ^(a)		Limites (UFC/g) ^(b)	
		n	c	m ^(d)	M
Produtos em pó à base de leite	Coliformes a 30°C	5	2	0	10
Leite em pó e soro de leite em pó	Salmonella	5	0	Ausente em 25g	
Leite em pó e soro de leite em pó	Enterobacteriaceae	5	0	10 ufc/g ^(c)	
Leite em pó e soro de leite em pó	Estafilococos coagulase positiva	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g

Fontes: Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro, A Portaria n.º 533/93 de 21 de Maio

(a) n = número de unidades que constituem a amostra; c = Número de unidades da amostra que se pode situar entre m e M, sendo a amostra considerada aceitável se as outras unidades apresentarem um número de bactérias igual ou inferior a m.

(b) m = valor limiar do número de bactérias; o resultado é considerado satisfatório se todas as unidades da amostra apresentarem um número de baterias igual ou inferior a m; M = valor limite do número de bactérias; se uma ou várias unidades da amostra apresentarem um número de bactérias igual ou superior a M, o resultado é considerado não satisfatório; (c) m=M

2.5.5 Vantagens da utilização do leite em pó:

- ✓ Conservação mais fácil, dispensando o uso de frigoríficos;
- ✓ Requer menos espaço para armazenamento, devido à remoção de água;
- ✓ Transporte e distribuições mais fáceis e baratas;
- ✓ Requer menos material de embalagem;
- ✓ Maior versatilidade de utilização, principalmente na mistura com outros ingredientes sólidos (Lemos et al, 2005).

2.5.6 Fatores que influenciam a qualidade do leite em pó

Durante o processo de fabricação de leite em pó, o produto é submetido a vários tratamentos, tanto térmicos como mecânicos. No período de transformação do estado líquido para pó, o leite sofre diversas mudanças em relação à concentração, aparência, consistência, estado físico e qualidade final. Estas mudanças dependem do bom desempenho do equipamento bem como de sua correta operação (VARNAM, 1995).

Fatores como a viscosidade e a capacidade espumante influenciam na qualidade final do produto (MADRID, 1996).

2.5.6.1 Viscosidade

A viscosidade do concentrado tem influencia no tamanho das gotículas que serão atomizadas, quanto menor a gotícula, mais rapidamente esta secará.

O aumento de viscosidade afeta o bom desempenho da atomização, pois o tamanho das partículas cresce à medida que a viscosidade é intensificada (BEHMER, 1984).

A viscosidade do leite concentrado varia de acordo com os seguintes aspetos:

- Composição do leite: Influencia na viscosidade, principalmente a quantidade de proteína presente em relação à lactose. Quanto maior o conteúdo de lactose e gordura, menor a viscosidade (BEHMER, 1984).
- Teor de sólidos e temperatura: Quanto maior o teor de sólidos no concentrado, maior a viscosidade, e vice-versa, quanto maior temperatura, menor é a viscosidade (BEHMER, 1984).
- Tratamento térmico: Quando o leite é submetido a altas temperaturas, antes da evaporação, a viscosidade do leite concentrado é alta (BEHMER, 1984).

- Espessamento por tempo de permanência: É o aumento de viscosidade e multiplicação bacteriana, quando o leite concentrado quente é armazenado por muito tempo. Por isso, recomenda-se o arrefecimento do produto para evitar o crescimento bacteriano (VARNAM, 1995).

2.5.6.2 Capacidade espumante

É a capacidade do leite concentrado incorporar ar atmosférico, depende da concentração e da temperatura do produto (AMIOT, 1991).

A incorporação do ar ocorre no bombeamento, no enchimento do concentrado no tanque de alimentação e, principalmente, durante a atomização do produto (AMIOT, 1991).

2.6 Fatores envolvidos na deterioração da qualidade do leite em pó

2.6.1 Acidez

A acidez do leite em pó reconstituído pode variar entre 0,11 e 0,15%. Percentagens inferiores indicam uma neutralização excessiva e se a percentagem é maior, quer dizer que o leite é de má qualidade (BEHMER, 1984).

2.6.2 Sedimentos

Geralmente deve-se a presença de partículas queimadas (BEHMER, 1991).

2.6.3. Humidade

A legislação determina um máximo de 5% de humidade para o leite em pó. Conteúdos superiores devem-se a condições de secagem inadequadas. Se o leite em pó é muito húmido, perde rapidamente o seu sabor, a sua solubilidade e outras propriedades físicas (ANVISA, 2008).

2.6.4. Solubilidade

Segundo AMIOT (1991), os fatores mais importantes que podem modificar a solubilidade do leite em pó são os seguintes:

- O desenvolvimento de acidez no leite diminui a solubilidade;

- A duração do aquecimento tem mais influência que a temperatura. É melhor aplicar um tratamento mais curto a temperaturas mais altas;
- A partir de leites mais ricos em extrato seco se obtém um pó mais solúvel;
- A solubilidade do leite em pó diminui durante o armazenamento quando o produto é mantido a temperaturas muito altas e quando o conteúdo de humidade é muito alto;
- As variações na pressão do concentrado na entrada da torre de secagem podem modificar o tamanho das gotículas e indiretamente, a solubilidade do pó (AMIOT, 1991).

2.6.5. Rancidez hidrolítica

A rancidez pode desenvolver-se em leites em pó integral e parcialmente desnatado. As principais causas são um pré-aquecimento insuficiente ou a contaminação do leite tratado com leite cru. Se o leite fluido apresentar um defeito de rancidez, o processo de secagem nem sempre faz com que esse desapareça (BOBBIO, 1992).

2.6.6. Oxidação

Como a rancidez, o defeito de oxidação está relacionado com a matéria gorda. A presença de oxigénio e de alguns metais pesados e a ausência de agentes antioxidantes favorecem sua aparição. O desenvolvimento dos sabores da oxidação é o fator mais limitante para a conservação do leite em pó integral (FOSCHIERA, 2004). A respeito da oxidação, deve-se ter em conta os seguintes aspetos:

- O desenvolvimento de acidez favorece a oxidação da matéria gorda;
- Uma adequada clarificação e homogeneização do leite aumentam sua resistência à oxidação;
- O pré-aquecimento do leite a altas temperaturas contribui para a formação de compostos redutores que protegem a matéria gorda frente à oxidação;
- A baixa humidade do leite em pó é essencial para evitar ou retardar este defeito
- O acondicionamento em uma atmosfera de gás inerte é uma boa medida de proteção (SOCIÉTÉ SCIENTIFIQUE D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE, 1993).

2.7 Produção de leite em pó

2.7.1 Fluxograma

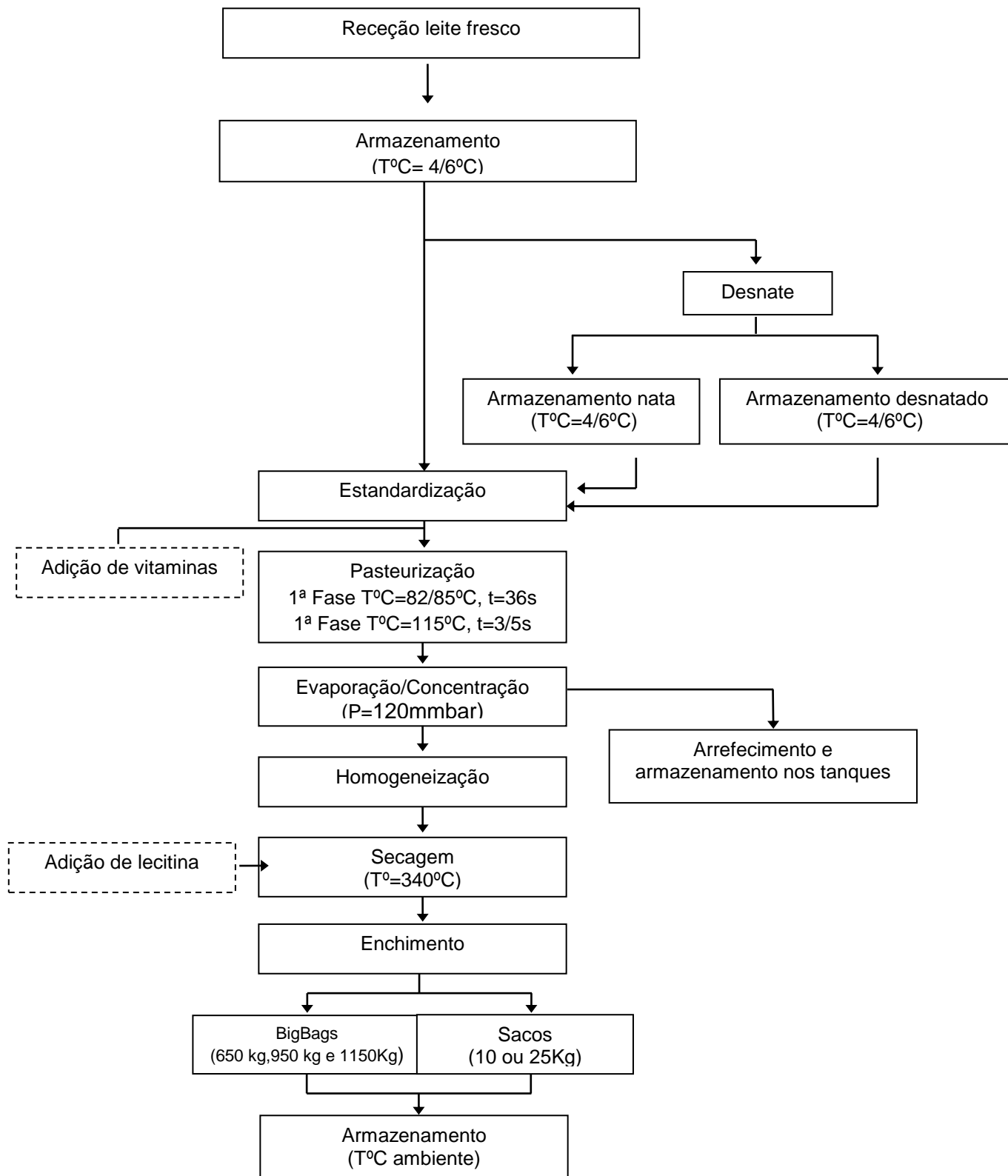


Figura 2.4 – Fluxograma do processo de fabrico do leite em pó de acordo com a Prolacto

2.7.2 Descrição das etapas

2.7.2.1 Receção de leite fresco

Grande parte do leite dá entrada na área de receção através da via rodoviária por meio de camiões cisterna refrigerados pertencentes a um subfornecedor industrial sendo algum proveniente de subfornecedores não industriais (pequenos produtores).

Existem duas linhas de receção de leite automatizadas, estando a primeira preparada para receber leite de tanques cisterna (subfornecedor industrial) e dos subfornecedores não industriais (pequenos produtores) enquanto que a segunda linha só recebe leite de cisternas.

Aquando da chegada do leite à fábrica, são retiradas amostras para a realização dos seguintes ensaios:

- Índice Crioscópico (a medida do ponto de congelamento do leite em relação ao da água)
- Determinação da acidez;
- Prova de álcool;
- Determinação de inibidores (antibióticos).

Só é dada a liberação de entrada do leite depois de conhecidos estes resultados e serem negativos.

Durante a receção do leite é controlada a temperatura de entrada e de arrefecimento.

2.7.2.2 Armazenamento

O leite ao entrar para as instalações fabris passa por condutas de aço inoxidável, sendo encaminhados para tanques de armazenagem ou para silos onde é refrigerado e armazenado a uma temperatura de 4 a 6°C máximo. Esses tanques/silos são construídos com aço inoxidável e têm uma capacidade que varia entre os 20m³ no caso dos tanques e os 100m³ no caso dos silos.

2.7.2.3 Desnate

Nesta etapa pretende-se separar a nata do leite, obtendo-se assim, nata (39.55% matéria-gorda) e leite desnatado (0.05% matéria-gorda). Esta separação é realizada por meio de uma centrífuga que funciona a 4500 rpm (rotações por minuto) sendo alimentada com 15000L/h de leite inteiro a 45°C. Após a separação da nata do leite, a nata sofre um tratamento térmico a 75°C e o leite desnatado é arrefecido a 6°C, sendo posteriormente armazenados em tanques. O leite desnatado é armazenado em tanques com capacidade de 10 m³ e a nata é armazenada em tanques de 9 m³.

2.7.2.4 Estandarização

A estandarização é calculada com base no fator RC do tipo de leite pretendido (à exceção do leite em pó magro). O fator do RC é dado por:

$$RC = \frac{\text{quantidade de matéria gorda}}{\text{quantidade de matéria não gorda (sólidos não gordos)}}$$

A partir deste fator é que se determina a quantidade de nata ou desnatado a adicionar ao lote de leite para se fazer o acerto de matéria gorda. A transferência de nata ou desnatado é feita por uma linha automatizada, designada por “linha de acerto de lotes”.

2.7.2.5 Pasteurização

Esta é uma operação tecnológica efetuada por ação do calor que visa tornar os produtos estáveis por redução da flora microbiana existente e inócuos por destruição da flora patogénica e toxinas não termorresistentes.

Este tratamento térmico é realizado em duas fases. A primeira é realizada num pasteurizador Pa de tubos finos. É realizada a uma temperatura de 82-85°C durante 36 segundos. A segunda fase é uma pasteurização direta onde o leite é aquecido diretamente através da injeção direta de vapor culinário a 115°C, com um tempo de contato de cerca 3-5 segundos.

Antes da entrada no leite no evaporador, são adicionadas algumas vitaminas para aumentar a % de vitaminas no produto final.

2.7.2.6 Evaporação/Concentração

Continuamente à pasteurização, segue-se o processo de evaporação, que tem como objetivo a evaporação de uma percentagem de água do leite (cerca de 47%), passando desta forma, a ser um produto mais denso designado de “pré-condensado”.

A operação de evaporação realiza-se sob vácuo (cerca de 120mmbar), conseguindo-se, deste modo, uma diminuição da temperatura de vaporização da água que constitui o leite, de modo a evitar a degradação proteica do leite. É uma etapa constituída por 3 efeitos (1º efeito, 2º efeito, com duas passagens no 3º efeito) sequenciais.

O evaporador é constituído por conjuntos de tubos (designados por efeitos), na posição vertical.

A evaporação da água do leite no primeiro efeito dá-se à volta dos 70°C, à medida que vai perdendo água nos restantes efeitos, a temperatura vai baixando para os 54°C.

2.7.2.7 Secagem

Esta etapa é efetuada numa torre de secagem com 18 m de altura e um diâmetro de 5 m, com uma capacidade que dependendo do tipo de leite a secar pode ir até cerca de 1600Kg/h.

Na secagem direta, o produto a secar é alimentado diretamente do evaporador. Este tipo de secagem é utilizada para todos os tipos de leite com a exceção do leite em pó gordo especial para a produção de chocolates cuja secagem é indireta, visto o produto ser alimentado a partir da sala de tratamento intermédio.

A alimentação de leite concentrado à torre de secagem é realizada pela bomba de alta pressão (com uma pressão máxima de 350 bar), que também faz a homogeneização. que garante a pressão necessária à buse (sistema de pulverização de bico fino) para uma correta atomização do leite à entrada do tambor de secagem. Ao mesmo tempo, é injetado um fluxo de ar quente a cerca de 340°C (ar primário) para o qual é pulverizado o produto, ou seja, o pré-condensado. O contato entre o ar quente e o pré-condensado faz com que ocorra a vaporização da água no pré, de forma instantânea e uniforme, atingindo uma temperatura média dentro do tambor cerca de 85°C, sendo o bico de

injeção arrefecido por uma corrente de ar (ar secundário) para evitar acumulação do produto na buse de pulverização para evitar partículas queimadas.

Após a saída da torre, o leite em pó passa por dois peneiros (um com ar quente para dar a finalização da humidade desejada e outro com ar frio para arrefecer).

Nesta etapa, dependendo do tipo de leite a produzir (mais para os leites gordos), é adicionada lecitina. A lecitina é uma substância que tem propriedades lipofílicas e hidrofóbicas e que pode ser utilizada para recobrir a superfície das partículas de pó, servindo literalmente de ligação entre a matéria gorda e a água, facilitando assim a dispersão do produto.

2.7.2.8 Enchimento

Terminada a secagem, o produto final (leite em pó) pode ser enchido em *Big-Bags* de vários tamanhos e com diferentes pesos (650, 950e 1150 Kg) ou em sacos de plástico de 10 ou 25 Kg revestidos por sacos de papel de três ou cinco folhas.

Durante o enchimento do *big-bag* o produto passa por um detetor de metais. No caso dos sacos, estes passam pelo detetor de metais após estarem cheios e fechados.

No final do enchimento de cada *Big-Bag*, e a cada intervalo de 15 sacos são retiradas amostras para inspeção e ensaios ao produto final, sendo registado a hora do enchimento e controlado o peso específico.

2.8 Humidade

2.8.1 Conceito de humidade

A humidade é a quantidade total de água contida num alimento. A humidade de um produto pode ser definida como a razão entre o peso da água presente e o peso do produto húmido (Park e Antonio, 2006).

2.8.2 Importância da determinação da humidade

A percentagem de humidade num alimento (%H) diz respeito à quantidade de água que está disponível no alimento. O teor de humidade corresponde à perda de peso sofrida pelo alimento quando aquecido em condições nas quais a água é removida (Fortuna, 2010).

É possível determinar a quantidade de água que foi removida ou adicionada a um produto quando se tem conhecimento da sua humidade inicial e da humidade final, após a modificação do seu estado. Na realidade, não é só a água que é removida, mas também outras substâncias que se volatilizam nessas condições. O resíduo obtido no aquecimento direto é chamado resíduo seco. O aquecimento direto da amostra a 102°C é o processo mais usual. As amostras de alimentos que se decompõem ou iniciam transformações a essa temperatura, devem ser aquecidas em estufas a vácuo a uma temperatura de 70°C (Silva e Queiroz, 2004).

A determinação da humidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos. No processo de secagem essa determinação é fundamental (Bampi, 2011).

A humidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar as seguintes características do produto (Bampi, 2011):

- Armazenamento: alimentos armazenados com elevada humidade, deteriorar-se-ão mais rapidamente em relação aos que possuem baixa humidade. Por exemplo: grãos com humidade excessiva estão sujeitos a uma rápida deterioração devido ao crescimento de fungos que desenvolvem toxinas como aflatoxina.
- Embalagem: alguns tipos de deterioração podem ocorrer em determinadas embalagens se o alimento apresentar uma humidade excessiva. Por exemplo: a velocidade do escurecimento dos vegetais e frutas desidratadas ou a absorção de oxigénio (oxidação) no ovo em pó podem aumentar com o aumento da humidade, em embalagens permeáveis à luz e ao oxigénio. Desta forma, as embalagens devem ser apropriadas para o teor de humidade do alimento.
- Processamento: a quantidade de água é importante no processamento de vários produtos, como, por exemplo: a humidade do trigo na fabricação do pão e produtos de padaria.

O Decreto-Lei n.º 213/2003, de 1 de Setembro fixa padrões máximos para o parâmetro de humidade no leite em pó. Segundo o mesmo, o teor de humidade para o leite em pó deverá ser igual ou inferior a 5% (Diário da República, 2003).

Este controlo torna-se necessário, pois o conteúdo de humidade é um dos fatores mais importantes que afetam os alimentos, principalmente os secos ou obtidos pelo processo de secagem, como é o caso do leite em pó (PARKE E ANTONIO, 2006). Desta forma, o leite em pó deve estar protegido da humidade, uma vez que o aumento da humidade relativa do ambiente em contato com o produto pode acarretar o aumento da humidade do leite, ocasionando a aglomeração do pó, permitindo o desenvolvimento de fungos, leveduras e bactérias, potencialmente capazes de produzir microtoxinas prejudiciais à saúde (JAY, 2005). Por outro lado, leva também à perda da qualidade visual, podendo ocasionar problemas de solubilidade (volume de sedimento existente após a centrifugação), problemas na textura (cristalização da lactose, reações de Maillard, etc.), alteração das características sensoriais (sabor, cor, etc...) e influência no prazo de validade do produto (redução do prazo de validade) (JAY, 2005).

No caso dos produtos perecíveis o frio é normalmente utilizado como inibidor do processo microbiológico, enquanto para os produtos deterioráveis a secagem, para níveis de humidade até 12-13%, é o processo mais simples e eficaz. O conhecimento do teor de humidade das matérias-primas é de fundamental importância na conservação e armazenamento, na manutenção da sua qualidade e no processo de comercialização (Bampi, 2011).

2.8.3 Fatores que influenciam o teor de humidade do leite em pó

A humidade final do produto é influenciada pela combinação de vários fatores, os quais envolvem as propriedades do alimento (concentração, temperatura e viscosidade), as condições de pulverização (a velocidade de rotação do atomizador ou da pressão de atomização) e as condições do ar de secagem (temperatura de entrada e saída e humidade absoluta). A magnitude da influência de alguns fatores nos níveis de humidade à saída da câmara de secagem é conhecida. Por exemplo, um aumento de 10°C na temperatura de entrada, com uma humidade absoluta do ar ambiente de 2.8g/kg ou 1% de sólidos totais do produto e redução da temperatura de saída em 1°C, resultará num aumento da humidade do pó de 0.2% no caso no leite desnatado e de 0.16% no leite integral (Pisechý, 1997).

2.8.4 Métodos para a determinação da humidade

Existem vários métodos para determinar a humidade nos alimentos. A escolha do método depende da forma como a água está presente na amostra, da natureza da amostra, da quantidade relativa de água, da rapidez desejada na determinação e do equipamento disponível (PARKE E ANTONIO, 2006).

A água pode estar presente na amostra sob duas formas:

- Água livre: é a água que está simplesmente adsorvida no material, é a mais abundante. É perdida facilmente às temperaturas em torno da ebulição.
- Água ligada: é a água da constituição, que faz parte da estrutura do material, ligada a proteínas, açúcares e absorvida na superfície de partículas coloidais, e necessita de níveis elevados de temperatura para sua remoção. Dependendo da natureza da amostra, requer temperaturas diferentes para a sua remoção, que frequentemente não é total e em alguns casos não é eliminada nem a temperaturas que carbonizem parcialmente a amostra (Bampi, 2011).

O aquecimento da amostra pode causar a caramelização ou decomposição dos açúcares, perda de voláteis ou ainda a oxidação dos lípidos. Portanto, é importante uma avaliação criteriosa e cuidadosa para a escolha do método mais adequado e conveniente à amostra e disponibilidade do laboratório. Por isso, o resultado da medida da humidade deve vir sempre acompanhado do método utilizado e das condições empregadas, como tempo e temperatura. Em geral, a determinação da humidade, que parece um método simples, torna-se complicado em função da exatidão e precisão dos resultados. As dificuldades encontradas, geralmente, são: a separação incompleta da água do produto; a decomposição do produto com formação de água além do original e a perda de substâncias voláteis do alimento que serão avaliadas como peso em água (Bampi, 2011). As determinações de humidade são classificadas em métodos diretos e indiretos.

Atualmente a fábrica Prolacto, utiliza como método de referência a Estufa. No seguimento do desenvolvimento de novos produtos (produto Milano, destinado para as máquinas de café instantâneo) e com o objetivo de obter resultados mais fiáveis, houve a necessidade de um controlo mais rigoroso do parâmetro da humidade. Pois, uma vez que este não seja bem controlado, pode acarretar problemas como a má dissolução do leite com o café, podendo também levar ao empedramento do produto entre outros (ver ponto 2.8.1). Surge assim, o método de Karl Fischer, que também é um método de referência da Prolacto.

2.8.4.1 Métodos Diretos

Nos métodos diretos a água é retirada do produto, geralmente por processo de aquecimento, sendo o teor de humidade calculado pela diferença de peso das amostras no início e no final do processo.

Devido à sua maior fiabilidade, os métodos diretos são empregues como padrão para a aferição de outros procedimentos. Por exigir um tempo relativamente longo para sua execução, às vezes representa uma desvantagem do método, por exemplo, quando se necessita de uma resposta imediata no controlo de uma determinada operação. Como métodos diretos tem-se: método de estufa, infravermelho, destilação e Karl Fischer (A.O.A.C, 2000).

2.8.4.1.1 Método de Estufa

O método de estufa é o método mais utilizado em alimentos e baseia-se na remoção da água por aquecimento, onde o ar quente é absorvido por uma camada muito fina do alimento e é então conduzido para o interior por condução. Como a condutividade térmica dos alimentos é geralmente baixa, costuma levar muito tempo (6 – 18 horas a 100 – 102° C, ou até peso constante) para o calor atingir as porções mais internas do alimento. A evaporação por um tempo determinado pode resultar numa remoção incompleta da água, se ela estiver fortemente presa por forças de hidratação, ou se o seu movimento for impedido por baixa difusividade ou formação de crosta na superfície. Por outro lado, na evaporação até peso constante, pode ocorrer uma superestimação da humidade por perda de substâncias voláteis ou por reações de decomposição (Bampi, 2011). Além disso, o método de secagem e estufa possui uma série de limitações de uso. É simples porque necessita apenas de uma estufa e cápsulas (sendo as mais indicadas as de alumínio rasas como mostra a figura 2.5), uma vez que a velocidade de evaporação nestes é maior do que nos de vidro e porcelana) para colocar as amostras (Cecchi, 2007). Porém, a exatidão do método é influenciada por vários fatores, tais como: a temperatura de secagem (que deve ser acima dos 100°C para evaporar a água à pressão atmosférica dentro da estufa), a humidade relativa e a movimentação do ar dentro da estufa, vácuo na estufa, tamanho das partículas e espessura da amostra, construção da estufa, número e posição das amostras na estufa, material e tipo de cadinhos e pesagem da amostra quente (Cecchi, 2007). Também, as condições climáticas tem influencia no teor de humidade determinado pelo método de estufa, quanto

maior a temperatura e a humidade relativa da sala, maior vai ser a humidade no final na secagem pela estufa, como se pode observar na tabela 2.5.

O aquecimento direto da amostra a $\pm 102^{\circ}\text{C}$ é o processo mais usual, entretanto, no caso de amostras de alimento, que se decompõem ou sofrem transformações a esta temperatura, deve-se utilizar estufa a vácuo para o seu aquecimento, onde se reduz a pressão atmosférica e se mantém a temperatura de 70°C , preservando assim a amostra e evitando a formação de crostas na superfície, que dificultaria a evaporação da água. As partículas dos alimentos devem ser moídas com espessuras menores possíveis para facilitar a evaporação da água (Ribeiro, 2005).

A pesagem da amostra deve ser feita somente após esta estar completamente fria no exsiccador, pois a pesagem a quente levaria a um resultado pouco fiável (Bampi, 2011).



Figura 2.5 - Cápsulas de alumínio para determinação da humidade na Estufa

Tabela 2.5- Tabela de humidades relativas residuais calculadas no final da secagem numa estufa a 102 °C

Room condition RH [%]	Room temperature [°C]		
	20°C	26°C	30°C
	Relative humidities at the end of a drying at 102°C		
0	0.00	0.00	0.00
5	0.11	0.15	0.20
10	0.21	0.29	0.39
15	0.32	0.44	0.59
20	0.43	0.58	0.78
25	0.54	0.73	0.98
30	0.64	0.87	1.17
35	0.75	1.02	1.37
40	0.85	1.16	1.56
45	0.97	1.31	1.76
50	1.07	1.46	1.95
55	1.18	1.60	2.15
60	1.29	1.75	2.34
65	1.40	1.89	2.54
70	1.50	2.04	2.73
75	1.61	2.18	2.93
80	1.72	2.33	3.12
85	1.83	2.48	3.32
90	1.93	2.62	3.51
95	2.04	2.77	3.71
100	2.15	2.91	3.90

No entanto, este método apresenta algumas limitações. Produtos com alto conteúdo de açúcar e carnes com alto teor de gordura devem ser secos em estufa a vácuo numa temperatura não excedendo a 70°C. Alguns açúcares, como a frutose, decompõem-se a uma temperatura próxima de 70°C, libertando água. Este método não serve para amostras com alto teor de substâncias voláteis, como condimentos, óleos essenciais, uma vez que vai ocorrer a volatilização destas substâncias, com perda de peso na amostra, que será computada como perda de água. Como alguns produtos são muito higroscópicos, devem ser fechados no exsicador ao saírem da estufa e pesados rapidamente após chegarem à temperatura ambiente. A reação de caramelização em açúcares libertando água, durante a secagem, é acelerada a altas temperaturas, portanto produtos nestas condições devem ser secados em estufas a vácuo a 60°C. Também, alimentos contendo açúcares redutores e proteínas podem sofrer escurecimento por reação de Maillard, formando compostos voláteis como CO₂, compostos carboxílicos, e produtos intermediários como formaldeído. Estes compostos voláteis serão medidos erradamente como água evaporada na estufa (Ribeiro, 2005)

O método de estufa tem as suas vantagens e desvantagens. Como vantagens, é um equipamento barato, faz análise simultânea de um grande número de amostras e serve como padrão para calibrar outros equipamentos métodos. Por outro lado, traz-nos

algumas desvantagens como por exemplo, é um método muito lento, pode haver variação de até $102 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ nas diferentes partes da estufa, só determina água livre e há adsorção de humidade após secagem (Ribeiro, 2005).

2.9.4.1.2 Infravermelho

Este outro tipo de secagem é mais efetivo e envolve penetração do calor dentro da amostra, o que encurta o tempo de secagem até 1/3 do total (Ribeiro, 2005). Neste método é utilizado um aparelho portátil que permite a obtenção de resultados rápidos da percentagem de humidade, sendo todo o processo controlado por um gerador de funções e balança digital. A amostra é colocada num prato de alumínio dentro de uma câmara que protege a balança do calor por meio de um colchão de ar, garantindo que haja circulação de ar interna para que os vapores de água saiam da amostra sem que seja perturbada a leitura da balança (Bampi, 2011). Equipamentos por secagem infravermelha possuem urna balança que dá a leitura direta do conteúdo de umidade por diferença de peso.

O método consiste numa lâmpada de radiação infravermelha com 250 a 500 watts, cujo filamento desenvolve uma temperatura entre 2.000 a 2.500°K (700°C). A distância entre a lâmpada e a amostra é crítica e deve ser cerca de 10 cm para não haver decomposição da amostra. A espessura da amostra deve ficar entre 10 e 15 mm. O tempo de secagem varia com a amostra (20 minutos para produtos cárneos, 10 minutos para grãos, etc.), no caso do leite em pó, este tempo varia com. O peso da amostra deve variar entre 2,5 a 10 g dependendo do conteúdo da água (Ribeiro, 2005). No manual do aparelho existem informações sobre as condições recomendadas de análise para cada tipo de produto (tempo, temperatura e massa inicial de produto) (Bampi, 2011).

A figura 2.6 mostra um exemplo de um dos medidores de humidade por Infravermelho.



Figura 2.6- Medidor de humidade por Infravermelho

Entre as vantagens da secagem via infravermelho, encontram-se a redução no consumo de energia, além da garantia de degradação mínima da qualidade do produto. Pode-se também incluir a simplicidade e versatilidade do equipamento requerido, a facilidade no direcionamento da fonte de calor e transferência da energia eletromagnética no regime infravermelho para a superfície do material sem aquecimento do ar, a obtenção de altas taxas de transferência de calor com aquecedores compactos, reduzida necessidade de uma alta velocidade do ar, minimizando o contato do material submetido à secagem com o oxigênio. (RATTI e MUJUMDAR, 1995 apud SANTOS, 2009). Como desvantagem, é um método lento por secar uma amostra de cada vez e como consequência, a repetibilidade pode não ser muito boa, pois pode haver variação de energia elétrica durante as medidas (Ribeiro, 2005)

2.9.4.1.3 Métodos de Destilação

2.9.4.1.3.1 Tolueno

Quando existem outras substâncias que poderão se volatilizar com água no processo de aquecimento, a determinação da humidade deve ser feita por processo de destilação com líquidos imiscíveis. O reagente utilizado é o tolueno. A amostra é moída, pesada (5 a 20g) e colocada em um balão contendo tolueno (cerca de 75ml). Este balão é aquecido diretamente e a água da amostra vai sendo destilada para o frasco coletor. A quantidade de água contida na amostra é dada por leitura direta do volume existente no

tubo coletor, onde: volume água = grama água. Este valor é utilizado no cálculo do teor de humidade do produto (Bampi, 2011).

2.9.4.1.3.2 Brown Duvel

É semelhante ao método de destilação que utiliza o tolueno, sendo que neste método não há necessidade de moer a amostra, e o aquecimento é produzido por um sistema termométrico que desliza automaticamente a fonte de aquecimento. É constituído por um sistema contendo uma manta aquecedora com balão acoplado a um aparelho de destilação, com recetor graduado para coleta da água condensada no processo. Para cada tipo de grão, a quantidade ou tamanho da amostra, a temperatura e o tempo, variam, devendo-se consultar o manual que acompanha o aparelho (Bampi, 2011).

Os métodos por destilação, apesar de serem métodos que já têm mais de 70 anos, não são muito utilizados principalmente como método de rotina, pela sua grande demora (Ribeiro, 2005). Porém, eles têm como vantagens proteger a amostra contra a oxidação pelo ar, uma vez que são feitos em atmosfera inerte. Também, a decomposição térmica é menor, reduzindo as reações químicas e em amostras com alto teor de voláteis, não conduz a grandes erros. Como desvantagens, há solubilidade parcial da água no solvente da destilação, baixa precisão do frasco coletor e da leitura de meniscos (volume de água muito pequeno), aderência de gotas de água nas paredes do frasco coletor, destilação de compostos solúveis em água com ponto de ebulição menor do que água, evaporação incompleta da água, possibilidade de formar emulsão, uso de solventes inflamáveis e o tempo de análise é longo (Salinas, 2002)

2.9.4.1.4 Método de Karl Fisher

A titulação Karl Fisher é provavelmente o método analítico mais usado para aferir o teor de água (humidade, baseado em reações que ocorrem na presença de água), em solventes e outros produtos. Sabe-se, por exemplo, que produtos como queijo, manteiga, leite em pó, mas também papel, plásticos, petróleo são analisados por este método.

A amostra é colocada numa célula de titulação na presença de solvente (metanol) e, em seguida titulada utilizando o reagente de Karl Fisher, piridina livre contendo dióxido de enxofre (SO₂), iodo e imidazol.

A reação de Karl-Fisher baseia-se na oxidação do dióxido de enxofre por iodo, na presença de água (Bampi, 2011):

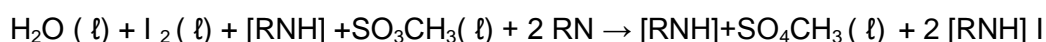


O procedimento do método baseia-se numa titulação volumétrica ou colométrica. Na titulação volumétrica, o iodo é adicionado usando uma bureta de pistão motorizada durante a titulação. Adequado para as amostras em que a água está presente como um componente principal. O I_2 é reduzido para Iodo na presença de água. Quando toda a água da amostra for consumida, a reação cessa e a cor da solução passa de amarelo canário para amarelo escuro com um ponto final em amarelo-acastanhado, característico do excesso de iodo. Na titulação colométrica, o iodo é gerado por oxidação eletroquímica e são utilizados elétrodos de platina. É uma reação de oxirredução onde há transporte de eletrões enquanto houver água. (Bruttel, 2006).

O reagente Karl Fisher (RKF) é constituído por uma mistura de iodo, dióxido de enxofre e piridina ($C_5H_5N = RN$) em metanol, com este reagente podem ser determinadas pequenas quantidades de água. O dióxido de enxofre reage com o álcool e forma alquil sulfito na presença de uma base orgânica (RN-imidazol), colocando a reação em equilíbrio:(Fortuna, 2010):



A oxidação do alquil sulfito para alquil sulfato através do iodo ocorre apenas na presença de água:



O volume de RKF gasto na titulação da amostra é então utilizado nos cálculos do teor de humidade (Fortuna, 2010).

Por ser o reagente de Karl Fischer um dessecante poderoso, a amostra e o reagente devem ser protegidos da humidade atmosférica em todos os procedimentos (Bampi, 2011). A titulação da água com o reagente de KF até ao ponto de equivalência (ponto final) é monitorizada pelo potenciómetro. A análise deve ser realizada à temperatura ambiente (Salinas, 2002).

O método Karl Fischer é aplicado em amostras que não dão bons resultados pelo método de secagem a vácuo. Os produtos que são analisados são geralmente produtos com baixo teor de humidade como frutas e vegetais desidratados, chocolates, café torrado, óleos e gorduras. É também utilizado em produtos ricos em açúcares, como mel, e produtos ricos em ambos, açúcares redutores e proteínas, como cereais. O método pode ser aplicado também em produtos de níveis de humidade intermediários como produtos panificados, misturas prontas para bolos ricas em gorduras e também em produtos com altos níveis de óleos voláteis (Condoeira, 2011).

A figura 2.7 ilustra um exemplo de um aparelho Karl Fischer.



Figura 2.7- Aparelho Karl Fischer

Como todos os outros, o método de Karl Fischer apresenta algumas vantagens e desvantagens. Como vantagens inclui: maior sensibilidade, mais rápido que os métodos de secagem, apresenta boa reprodutibilidade e repetibilidade e ainda fornece o teor de água livre e adsorvida. Outra vantagem deste método é que é adequado para amostras com baixo teor de água e alto teor de açúcar ou lípidos. Em contrapartida, como desvantagens este método não é específico, ou seja, qualquer substância que possa reduzir o iodo interfere (como por ex: vitamina C, compostos carboxílicos). Os aldeídos e cetonas podem reagir com o metanol libertando água e ainda, por ser o reagente Karl Fischer um dessecante muito forte, tem que se ter algum cuidado contra a humidade

atmosférica. Além das várias desvantagens citadas anteriormente, para amostras insolúveis em metanol a extração da água pode ser incompleta (Barcia, 2013).

2.9.4.2 Métodos Indiretos

Nestes métodos o teor de humidade é estimado em função das propriedades elétricas do produto numa determinada condição. Os dois princípios utilizados são o da resistência elétrica e o da medida da constante dielétrica (capacitância). São métodos práticos e rápidos, mas estão sujeitos a erros decorrentes da variação das propriedades físicas dos produtos, da temperatura ou da distribuição da humidade no interior do mesmo (Anklam, 1997).

A aferição de equipamentos para a determinação indireta da humidade é feita em relação ao método padrão de estufa, admitindo-se variação de 0,5% em relação ao método padrão para teores de humidade inferiores a 20-25%. O manual de utilização do aparelho deve sempre ser consultado, pois cada amostra exige técnica específica.

2.9.4.3 Cálculo do teor de humidade

Existem duas maneiras de expressar a humidade contida num produto em base húmida ou base seca, sendo que a humidade em base húmida ($H_{húmida}$) é mais utilizada em designações comerciais, armazenamento, etc. e a humidade em base seca (H_{seca}) é utilizada em trabalhos de pesquisa e equações de secagem.

Humidade em base húmida ($H_{húmida}$) (%)

$$(\%H_{húmida}) = \frac{\text{massa inicial}}{\text{massa total}} \times 100 = \frac{\text{massa inicial}}{\text{massa inicial} + \text{massa seca}} \times 100$$

Humidade em base seca (H_{seca}) (%)

$$\% H_{seca} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa seca}}{\text{massa seca}} \times 100$$

Capítulo 3 – Metodologia

3.1 Determinação da humidade do leite em pó pelo método de estufa

A humidade do leite em pó através do método de estufa foi determinada segundo a LI-00.500.

3.1.1 Amostragem

Para a realização deste estudo, utilizou-se uma amostra de leite em pó, designada como amostra de referência DDP-1 (figura 3.1).



Figura 3.1- Amostra de referência de leite em pó (DDP-1)

3.1.2 Preparação da amostra

Antes de cada análise, abriu-se a embalagem e homogeneizou-se bem o produto com o auxílio de uma colher.

3.1.3 Preparação das cápsulas

Colocou-se as cápsulas, com a sua tampa de lado durante uma hora no mínimo uma hora e por vezes durante uma noite na estufa (Hereaus) à temperatura de secagem do produto ($102 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$) (anexo 7.1.1, figura 7.1.1). Após esse tempo de secagem, colocou-se as tampas sobre as cápsulas quentes colocando-as no exsiccador (anexo 7.1.1, figura 7.1.2). Esperou-se 45 minutos até que as mesmas arrefecessem. Com o auxílio de uma

balança (Mettler) previamente tarada. Pesou-se as cápsulas vazias com tampa (anexo 7.1.1, figura 7.1.3) e registou-se o valor.

3.1.4 Procedimento para a determinação da humidade através do método de estufa

Após registar o valor da cápsula vazia com a tampa, foram introduzidas na mesma cerca de 2 g de amostra (leite em pó) (anexo 7.1.2, figura 7.1.4), repartindo-a sobre toda a superfície da cápsula (anexo 7.1.2, figura 7.1.5 e 7.1.6). Registou-se o peso da cápsula com a amostra e com a tampa. Repetiu-se o mesmo procedimento para as restantes amostras. De seguida, colocou-se as cápsulas na estufa (Hereaus) a $102^{\circ} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ (a temperatura da estufa é controlada com a ajuda de um termopar) com a tampa ao lado (no meio do tabuleiro da estufa, como mostra a figura 7.1.7, anexo 7.1.2). Após estarem todas as cápsulas na estufa contou-se 2 horas. Durante este tempo não se deve abrir a estufa. Após o tempo de secagem (2 horas) e antes de retirar as cápsulas da estufa, tapou-se as mesmas e colocou-se novamente no exsiccador onde arrefeceram durante 45 min. Por fim, pesou-se as cápsulas e registou-se o peso obtido. O teor de humidade é obtido através da seguinte equação:

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Onde:

m_2 = massa da cápsula, da tampa e da toma da amostra antes de secar, em g.

m_3 = massa da cápsula, da tampa e da toma da amostra depois de secar, em g.

m_1 = massa da cápsula e da tampa, em g (tara).

3.2 Determinação da humidade do leite em pó pelo método de Karl Fischer

A humidade do leite em pó através do método de Karl Fischer foi determinada segundo e LI-08.055

3.2.1 Amostragem

A mesma utilizada no método de estufa.

3.2.2 Preparação da amostra

Antes de cada análise, abriu-se a embalagem e homogeneizou-se bem o produto com o auxílio de uma colher.

3.3.3 Preparação dos frascos

Colocou-se os frascos de vidro durante uma hora no mínimo e por vezes durante uma noite numa estufa (Hereaus) a uma temperatura cerca de $102 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$. Após esse tempo de secagem, colocou-se os frascos no exsiccador cerca de 45 minutos para arrefecer (anexo 7.1.3, figura 7.1.8).

3.3.4 Preparação do *Drift*

Na preparação do *drift*, colocou-se um tubo de metálico dentro de um frasco vazio (anexo 7.1.4, figura 7.1.9), colocando posteriormente uma tampa de borracha (anexo 7.1.4, figura 7.1.10).

O *drift* dá-nos as condições ambientais, ou seja, a humidade à volta que o aparelho deteta, humidade esta que não vem da amostra. Em suma, o *drift* indica a quantidade de água que entra na titulação, durante um período de tempo definido (15/20 min) e é dado em mg de água/minuto

O valor do *drift* é subseqüentemente usado no cálculo dos resultados, a fim de compensar a humidade que entrou na célula de titulação de acordo com a seguinte fórmula:

Resultado da amostra = quantidade total de água determinada - (drift x O tempo de titulação).

3.3.5 Preparação do branco

Na preparação do branco, selou-se um frasco com uma fita de alumínio (anexo 7.1.5, figura 7.1.11 colocando de seguida uma tampa de borracha verde (anexo 7.1.5, figura 7.1.12).

O valor do branco é a quantidade de água contida no frasco (ou seja, a humidade do ar presente dentro do frasco, é a humidade adsorvida nas paredes de vidro do frasco) menos a quantidade de água, determinada pelo *drift*.

3.3.6 Procedimento para a determinação da humidade através do método de Karl Fischer

Colocou-se o frasco na balança (Mettler) e tarou-se (anexo 7.1.6, figura 7.1.14). Pesou-se amostra com uma aproximação de 0.0001g para o frasco de vidro previamente tarado. A toma da amostra varia com o nível de humidade esperado, como mostra a seguinte tabela:

Tabela 3.1- Toma da amostra consoante o nível de humidade esperado

Nível esperado de humidade	Toma da amostra (g)
<1 g/100g	~ 1g
1-3 g/100g	~ 0.5g
3-5 g/100g	~ 0.3g
5-10 g/100g	~ 0.2g
10-20 g/100g	~ 0.1g

Para a amostra em estudo, pesou-se aproximadamente 0.5g da amostra (anexo 7.1.6, figura 7.1.14) e registou-se o peso da amostra. De seguida, selou-se o frasco com uma fita alumínio (anexo 7.1.6, figura 7.1.15) e colocou-se a tampa de borracha de cor azul. Repetiu-se o mesmo procedimento para as restantes amostras. De seguida, colocou-se os frascos contendo as amostras já pesadas, no aparelho (anexo 7.1.6, figura 7.1.16).

Após estarem todas as amostras colocadas no aparelho, ligou-se o aparelho e esperou-se que ele pedisse a confirmação da bureta. Posteriormente pressionou-se o botão “Drain” (anexo 7.1.6, figura 7.1.17 e figura 7.1.18), para remover o solvente que se encontrava dentro do copo de titulação (porque o elétrodo tem de estar imerso). O solvente é removido por aspiração e segue para uma garrafa de resíduos. Após a remoção do solvente, selecionou-se o botão “Fill” para encher o copo de titulação com 70 ml de metanol ou até o elétrodo ficar submerso (anexo 7.1.6, figura 7.1.19 e figura 7.1.20). Através do botão “Stirrer” (anexo 7.1.6, figura 7.1.21), e com a ajuda de um agitador magnético que se encontrava no fundo do copo de titulação, agitou-se a solução cerca de 60 segundos para atrair as gotas de metanol que encontravam agarradas às paredes do copo.

Continuamente, selecionou-se o botão “H₂O 120^o” (anexo 7.1.6, figura 7.1.22), onde aparece a tecla para colocar o número de amostras a serem analisadas. O loop 1 refere-

se ao branco e o loop 2 refere-se às amostras/análises que se vai efetuar. Introduziu-se o número de amostras, que foram 40. Através do botão “Samples” (anexo 7.1.6, figura 7.1.23) e selecionou-se o loop 2 (anexo 7.1.6, figura 7.1.24). De seguida, pressionou-se a tecla “ID 1” (anexo 7.1.6, figura 7.1.25) e identificou-se as amostras com o nome DDP-1 e respetivo número de *análise* (anexo 7.1.6, figura 7.1.26). Na tecla “Sample size” (anexo 7.1.6, figura 7.1.27) introduziu-se a toma as amostras. Após a introdução destes dados, selecionou-se a tecla “print” para impressão dos dados das amostras. Por fim, selecionou-se a tecla “Start” para iniciar a análise. O resultado de cada medição é impresso pela impressora (Mettler – Toledo USB-P25) (anexo 7.1.6, figura 7.1.28) do próprio aparelho. O aparelho calcula a humidade pela seguinte fórmula:

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{\left(VEQ \times CONC - \left(t \times \frac{DRIFT}{1000}\right)\right) \times C}{m}$$

Onde:

VEQ = Quantidade de titulante consumido;

t= O tempo total desde a solicitação de amostra

CONC= Concentração do reagente titulante

m= toma da amostra

C= 1 (constante para mg/g)

A medição de cada análise demora cerca de 15-20 min. O primeiro a ser analisado é o drift, seguido do branco.

Capítulo 4 - Discussão de Resultados

4.1 Comparação do Método de Estufa com o Método de Karl Fisher para determinação da humidade do leite em pó

A comparação de métodos consiste na comparação entre resultados obtidos pelo método em desenvolvimento, ou seja, que está a ser implementado, validado (neste caso o método de Karl Fisher) e os resultados conseguidos através de um método de referência (Estufa), avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. As análises são efetuadas, utilizando os dois métodos em separado (o método de Karl Fisher e o método de Estufa), sobre a mesma amostra, numa faixa de temperaturas em que se pretende validar o método (Ribani et al, 2004).

Com o objetivo de comparar o método da Estufa com o método de Karl Fisher, para a determinação do parâmetro da humidade, determinou-se a humidade usando uma amostra de referência de leite em pó com valor de humidade conhecido para o método de Karl Fisher e de Estufa (2.71 % (m/m) e 2.13% (m/m), respetivamente). Para ambos os métodos, a amostra padrão foi ensaiada 40 vezes. A tabela 7.2.1 (anexo 7.2) apresenta os resultados do teor de humidade obtidos, bem como as suas médias e respetivos desvios-padrões determinados pelos dois métodos (Karl Fisher e Estufa).

Com o objetivo de comparar os resultados obtidos (%m/m) e o desvio do valor de referência versus o valor obtido (absoluto), realizou-se o teste *t-student* (anexo 7.2, tabela 7.2.2 e tabela 7.2.3). De notar que, todos os pressupostos inerentes à realização deste teste (nomeadamente, normalidade e homogeneidade dos dados da amostra) foram devidamente validados. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% (ou seja, sempre que $p\text{-value} < 0,05$). Os cálculos inerentes à análise estatística dos dados foi realizada com recurso ao software IBM SPSS Statistics 21.

4.1.1 Comparação do Método de Estufa com o Método de Karl Fisher para as 40 análises

Nesta primeira fase, compararam-se ambos os métodos (KF e Estufa). Nestas 40 análises, testou-se várias temperaturas (130, 125 e 120°C) para o método Karl Fisher,

até ser encontrada a temperatura ótima para a qual o desvio entre o valor de referência e o valor obtido fosse menor.

Mediante a observação dos resultados obtidos, verificou-se que, quando comparados os 2 métodos para as 40 análises, quer para os “Desvio Ref. vs Valor (abs)”, quer para o “Resultado obtido % (m/m)”, existiram diferenças estatisticamente significativas (“Desvio Ref. vs Valor (abs)”: $t_{(78)}=-3,884$, $p\text{-value}=0,000<0,05$; “Resultado obtido % (m/m)”: $t_{(78)}=27,570$, $p\text{-value}=0,000<0,05$; figuras 4.1 e 4.2, respetivamente).

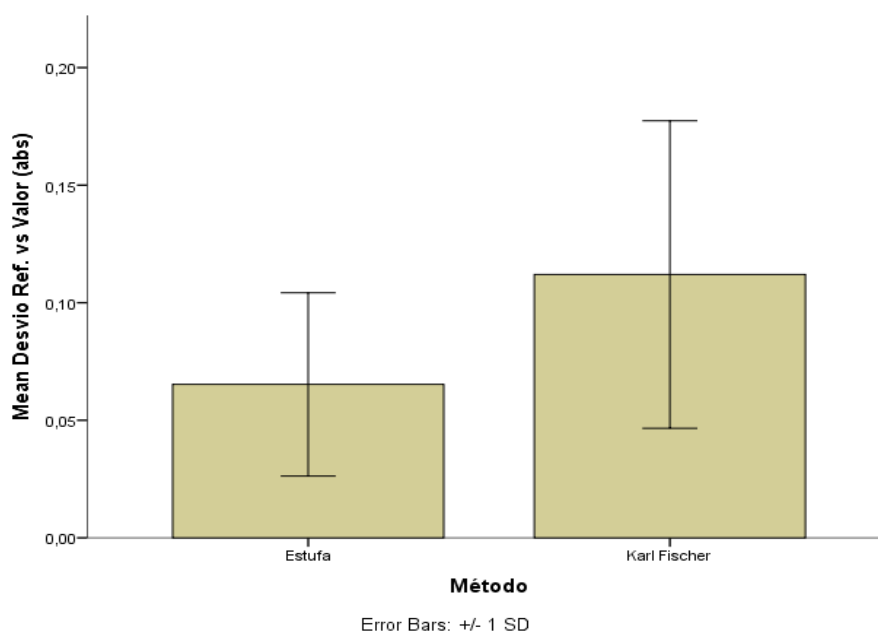


Figura 4.1- Comparação dos valores médios de humidade, quando comparadas as 40 análises para ambos os métodos (KF e Estufa). Os valores são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (DP)

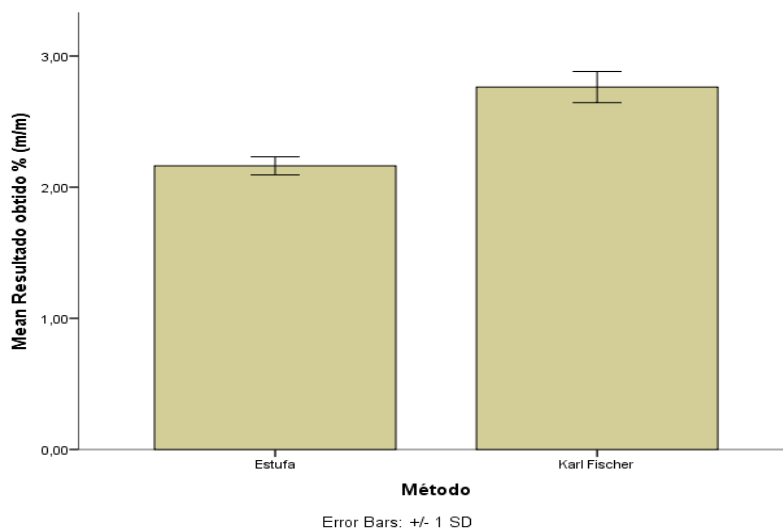


Figura 4.2- Comparação dos valores médios dos desvios do valor de referência face ao valor obtido (em absoluto) de humidade, quando comparadas as 40 análises para ambos os métodos (KF e Estufa). Os valores são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (DP)

Ao analisar os resultados obtidos (tabela 7.21, anexo 7.2), denotou-se que para o método da Estufa, estes apresentam alguma variabilidade nas 40 análises realizadas, ou seja, um valor médio de humidade de 2.16 %, um mínimo de 2.00% e um máximo de 2.26%. Esta variabilidade apresenta um desvio-padrão de 0.07 que deve-se às condicionantes do método analítico (ver ponto das desvantagens do método). Em termos médios, neste estudo obteve-se um desvio de 0.03 face ao valor de referência (2.16 % (m/m) vs 2.13 % (m/m)). Por outro lado, através dos dados obtidos nas 40 análises realizadas para o método de Karl Fischer, pode-se observar que estes apresentam uma humidade média de 2.76%, um mínimo de 2.61% um máximo de 2.95% e um desvio-padrão de 0.12. O desvio do valor obtido face ao valor de referência (2.76% vs 2.71%) foi de 0.05.

É também possível verificar que a média do desvio do valor de referência versus o valor obtido (absoluto) do método da Estufa é mais baixo que o desvio do método de Karl Fischer. Isto deve-se ao facto de, inicialmente na determinação da humidade pelo método Karl Fischer terem sido utilizadas temperaturas mais elevadas, o que fez com que queimasse mais a amostra, aumentando assim o valor de humidade. Adicionalmente é ainda possível observar que à medida que a temperatura do forno decresce (de 130°C para 120°C), o desvio dos valores obtidos face ao valor de referência é minimizado.

4.1.2 Comparação do Método de Estufa com o Método de Karl Fischer após encontrar Temperatura (°C) ótima de funcionamento do método Karl Fischer

Como é possível observar através da tabela 7.2.1 (anexo 7.2), para o método de Karl Fischer à medida que a temperatura do forno decresce (de 130°C para 120°C), o desvio dos valores obtidos face ao valor de referência é minimizado. Assim, procedeu-se à comparação de ambos os métodos apenas para os valores onde os desvios são menores no Karl Fischer (o que corresponde a uma temperatura = 120°C), ou seja, da análise N21 à N40 de ambos os métodos. Por conseguinte, os resultados alcançados permitiram concluir que, quando comparados os dois métodos para as 20 análises para o “Resultado obtido % (m/m)”, existiram diferenças significativas (“Resultado obtido % (m/m)”: $t_{(38)} = -29.624$; $p\text{-value} = 0.000 < 0.05$). Por outro lado, quando comparados os desvios dos valores obtidos com os valores de referência de cada método, pode-se verificar que não existiram diferenças significativas (“Desvio Ref. vs Valor (abs)”: $t_{(38)} = 0.759$, $p\text{-value} = 0,000 < 0,05$; figuras 4.3 e 4.4, respetivamente).

Ao analisar os resultados obtidos (tabela 7.21, anexo 7.2), para ambos os métodos nas 20 análises (N21 à N40), denotou-se que para o método de Karl Fischer e para o método de Estufa, em termos médios os valores obtidos % (m/m) foram de 2.65% e 2.16%, respetivamente, apresentando desta forma diferenças estatisticamente significativas entre os dois métodos. O mesmo não se verificou para os resultados obtidos do desvio do valor obtido face ao valor de referência, onde se obteve em termos médios para o método de Estufa um desvio de 0.07 face ao valor de referência e um desvio de 0.06, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre eles, sendo os valores obtidos muito próximos entre si.

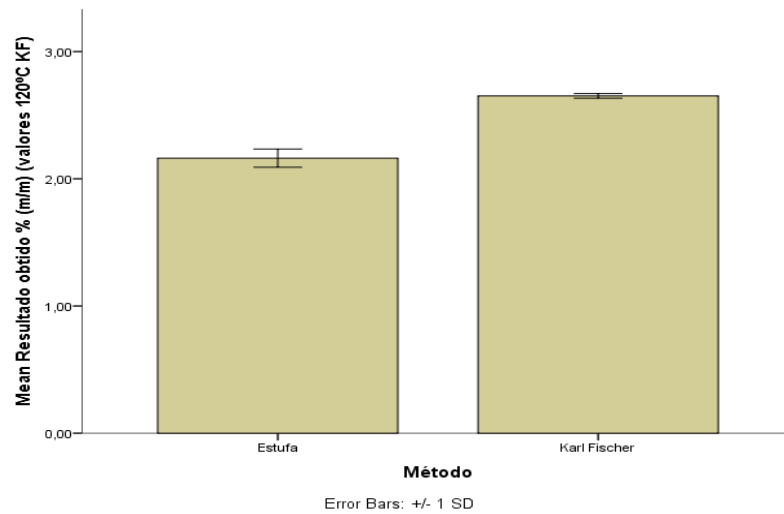


Figura 4.3- Comparação dos valores médios de humidade, quando comparadas as 20 análises para ambos os métodos (KF e Estufa). Os valores são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (DP)

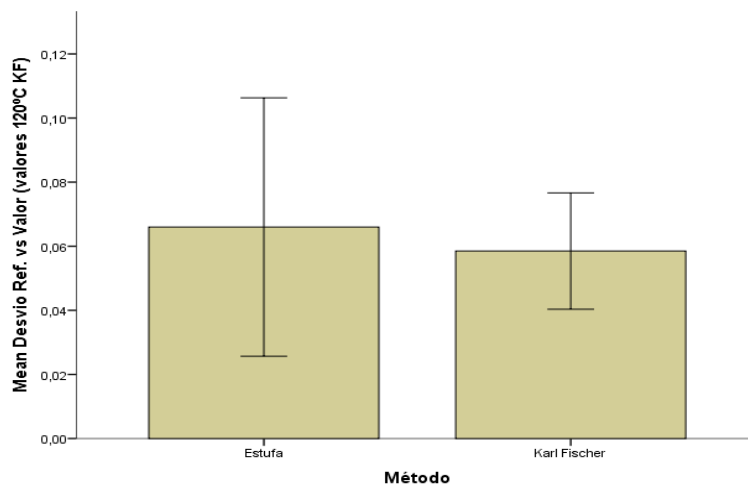


Figura 4.4- Comparação dos valores médios dos desvios do valor de referência face ao valor obtido (em absoluto) de humidade, quando comparadas as 20 análises para ambos os métodos (KF e Estufa). Os valores são expressos sob a forma de média \pm desvio-padrão (DP)

4.2 Validação do método de Karl Fischer e do método de Estufa

A validação de um método analítico é um aspeto crucial da garantia da qualidade analítica pelo que tem recebido uma atenção considerável por parte da comunidade científica, comités industriais e entidades reguladoras. Isso ocorre pela necessidade de uniformizar os critérios utilizados com o fim de demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é praticado tem as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida (Jorge e Costa Pereira, 2008).

Segundo a Norma NP EN/IEC 17025, a validação de um método é a confirmação, através de evidências objetivas, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos. No processo de validação o método é avaliado em termos da sua representatividade, reprodutibilidade e repetibilidade (NP EN ISO/IEC 17025, 2000).

Para validação dos métodos em estudo, focou-se apenas na precisão dos resultados analíticos, em particular na repetibilidade e reprodutibilidade, e também na exatidão (mais propriamente nos valores do z-score).

O z-score dá-nos para cada determinação e por amostra a avaliação de resultados através de amostras teste, ou seja, amostras de referência. O z-score indica quantos desvios-padrões de uma observação estão acima ou abaixo da média

O valor do fator de desempenho (z-score) é estimado através da seguinte equação:

$$z = \frac{|x - X|}{\sigma}$$

Onde x é o valor obtido, X é o valor de referência e σ representa o desvio padrão da amostra de referência (sendo este fixo), ou seja, o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial (Jorge e Costa Pereira, 2008).

Segundo a ISO/IEC 17043 se o fator de desempenho em módulo for menor ou igual a dois, o desempenho é satisfatório, caso se encontre entre dois e três, o desempenho é questionável e por último se for superior ou igual a três o desempenho do método é insatisfatório, como se pode observar na tabela 4.1, abaixo apresentada

Tabela 4.1- Interpretação dos resultados para o z-score

Código	Interpretação	Condição
S	Satisfatório	$ z\text{-score} \leq 2.0$
Q	Questionável	$2.0 < z\text{-score} < 3.0$
I	Insatisfatório	$3.0 \leq z\text{-score} $

No processo de validação dos métodos, como referido anteriormente, utilizou-se uma amostra de referência de leite em pó, com valor de humidade conhecido para o método de Karl Fischer e de Estufa (2.71 % (m/m) e 2.13 % (m/m), respetivamente). Para ambos os métodos a amostra padrão foi ensaiada 40 vezes. De referir ainda, que para a validação do método de Karl Fischer, foi incluído uma variável específica do método de Karl Fischer (temperatura do forno).

4.2.1 Validação do método Karl Fischer

4.2.1.1 Análise da repetibilidade do método de Karl Fischer

Segundo a LI-08.55-1- “Determinação da humidade segundo o Karl Fischer”, a repetibilidade é a diferença entre os resultados individuais obtidos pelo mesmo método com mesma amostra, nas mesmas condições (mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo laboratório e curto intervalo de tempo), não devendo exceder 0.05g de água por 100g de amostra.

No processo de validação do método Karl Fischer para a determinação da repetibilidade, realizaram-se 40 análises (n=40), sobre a mesma amostra de leite em pó, realizadas pelo mesmo técnico, no mesmo aparelho, num espaço de dois dias consecutivos.

Analisando os resultados obtidos do método (tabela 7.2.1, anexo 7.2), obteve-se em termos médios (para as 40 análises realizadas) uma humidade de 2,76 % (m/m), o que corresponde a um desvio padrão de 0.12. Comparando o valor médio da humidade com o valor de referência (2.71 % (m/m)), obtém-se um desvio de 0.05.

Tal como anteriormente já foi referido, o processo de validação do método Karl Fischer incluiu também a variável “temperatura do forno”. Os dados médios resultantes

das humidades determinadas nas gamas de temperatura 130°C, 125°C e 120°C estão representados na seguinte tabela.

Tabela 4.2- Resultados médios obtidos para as várias temperaturas do forno do método Karl Fischer (130°C, 125°C e 120°C).

Temperatura do Forno °C	Nr. Análise	Média Resultados % (m/m)	Valor referencia %(m/m)	Desvio médio (abs)
130	N1 a N10	2,92	2,71	0,21
125	N11 a N20	2,83	2,71	0,12
120	N21 a N40	2,65	2,71	0,06

Analisando a tabela 4.2, verificou-se que a temperatura ótima da análise no forno é de 120°C, temperatura à qual o desvio médio absoluto face ao valor de referência é minimizado (desvio de 0.06). De acordo com a tabela 7.2.1 (anexo 7.2), foram realizadas 20 análises à temperatura de 120°C que apresentaram um valor médio de humidade de 2.65 % (m/m), máximos e mínimos de 2.68 e 2.61 respetivamente e um desvio-padrão de 0.018. Analisando o valor entre a média, máximos e mínimos obtidos (aproximadamente 0.04 g de água /100g de amostra), pode-se concluir que este é inferior ao desvio que representa a repetibilidade deste método (0.05 g de água /100g de amostra) de acordo com a LI-08.55-1.

4.2.1.2 Análise da reprodutibilidade do método de Karl Fischer

A reprodutibilidade é a aproximação entre resultados das medições da mesma amostra efetuada com alteração de pelo menos uma das condições de medição, ou seja, o mesmo laboratório ou diferentes laboratórios, diferentes analistas, diferentes equipamentos o e/ou diferentes épocas.

No processo de validação do método Karl Fischer para a determinação da reprodutibilidade, realizaram-se 8 análises (n=8) com uma temperatura do forno de 120°C, sobre a mesma amostra de leite em pó, realizadas pelo mesmo aparelho, por diferentes analistas num espaço de dois dias consecutivos (ou seja, o analista 1 faz num dia e o analista 2 faz no dia seguinte).

Conforme é patente na tabela 7.2.4 (anexo 7.2), o valor médio da humidade para a reprodutibilidade para o método Karl Fischer segundo o analista 1 foi de 2,67% (m/m), o que quando comparado com o valor de referência (2.71 %(m/m)), obtém-se um desvio de 0.04, que corresponde a um desvio padrão médio de 0.02. O analista 2 obteve em termos

médios uma humidade de 2.66%. Comparando este valor com o valor de referência obtém-se um desvio de 0.05 que corresponde a um desvio padrão de 0.01. Mediante estes resultados, pode-se afirmar que o método de Karl Fischer apresenta uma ótima reprodutibilidade, encontrando-se desta forma, validade no que diz respeito à reprodutibilidade.

4.2.1.3 Análise da exatidão do método de Karl Fischer

A exatidão de um método analítico traduz a proximidade do valor obtido em relação ao valor esperado, estipulado (valor de real), ou seja, é a diferença entre o valor real presente na amostra e o valor obtido na análise (Chasin et al, 1998). É avaliada através da inexatidão (ensaios interlaboratoriais, materiais de referência certificados), isto é, o afastamento entre os valores esperado e obtido. Um método diz-se exato se o erro sistemático (módulo do erro absoluto) sistemático é sabidamente não significativo (Costa Pereira, 2008).

Na avaliação da exatidão utilizando uma amostra de referência, os valores médios obtidos pelo laboratório e o desvio padrão de uma série de ensaios, devem ser comparados com os valores da amostra de referência. Para esta comparação podem ser utilizados o erro absoluto, o erro relativo, o fator de desempenho (z-score), o erro normalizado e testes de recuperação (Guia Relacre, 2000). No presente estudo, na avaliação da exatidão dos métodos Karl Fischer e Estufa, foi utilizado o fator de desempenho (z-score).

Através da análise dos resultados obtidos (tabela 7.2.1, anexo 7.2), pode-se verificar que inicialmente obteve-se em termos médios um z-score de 0.82 (satisfatório) nas 40 análises efetuadas. Por outro lado, através dos dados obtidos após encontrar a temperatura ótima de funcionamento do método de Karl Fischer (120°C), pode-se observar que para as 20 análises efetuadas a esta temperatura obteve-se um z-score médio de 0.43 (muito satisfatório).

4.2.2 Validação do método de Estufa

4.2.2.1 Análise da repetibilidade do método de Estufa

Segundo a LI-00.500-1- “Determinação da humidade segundo o método da Estufa”, a repetibilidade é a diferença entre os resultados individuais obtidos pelo mesmo método com mesma amostra, nas mesmas condições (mesmo analista, mesmo

equipamento, mesmo laboratório e curto intervalo de tempo), não devendo exceder 0.10g de água por 100g de amostra.

Analisando os resultados obtidos (tabela 7.2.1, anexo 7.2), obteve-se em termos médios (para as 40 análises realizadas) uma humidade de 2.16 % (m/m), o que corresponde a um desvio-padrão de 0.07. Comparando o valor médio da humidade com o valor de referência (2.13 % (m/m)), obtém-se um desvio de 0.03.

4.2.2.2 Análise da reprodutibilidade do método de Estufa

De acordo com a LI-00.500-1, a reprodutibilidade é a aproximação entre resultados das medições da mesma amostra efetuada com alteração de pelo menos uma das condições de medição, ou seja, o mesmo laboratório ou diferentes laboratórios, diferentes analistas, diferentes equipamentos e/ou diferentes épocas não devendo exceder os 0.30g de água por 100g de amostra.

O processo de validação do método da estufa para a determinação da reprodutibilidade, foi realizado da mesma forma que a validação para a determinação da reprodutibilidade do método de Karl Fischer ((8 análises (n=8)), sobre a mesma amostra de leite em pó pelo mesmo aparelho (estufa), por diferentes analistas num espaço de dois dias consecutivo (um analista em cada dia).

Através dos resultados obtidos (tabela 7.2.4, anexo 7.2), denotou-se que o valor médio da humidade para a reprodutibilidade do método de Estufa de acordo com o analista 1 foi de 2.21% (m/m), o que quando comparado com o valor de referência (2.13 % (m/m)), obtém-se um desvio de 0.08, o que corresponde a um desvio padrão de 0.02. Através dos resultados do analista 2, obteve-se em termos médios uma humidade de 2.20% que corresponde a um desvio padrão de 0.05. Comparando o valor médio obtido pelo analista 2 (2.20%) com o valor de referência (2.13), obtém-se um desvio de 0.07.

Comparando a reprodutibilidade do método de Estufa com o método de Karl Fischer, verifica-se que este último apresenta uma melhor reprodutibilidade. Isto deve-se ao fato de, na estufa haver várias condicionantes (ver ponto das desvantagens do método). Também o fato de ter sido realizado por diferentes analistas, pode ter influencia nos resultados finais.

4.2.2.3 Análise da exatidão do método de Estufa

Tal como anteriormente já foi referido, a avaliação da exatidão do método de Estufa foi realizada com base no fator de desempenho (z-score).

Através da análise dos resultados obtidos (tabela 7.2.1, anexo 7.2), pode-se verificar que inicialmente obteve-se em termos médios um z-score de 0.41 (satisfatório) nas 40 análises efetuadas. Por outro lado, através dos dados obtidos após encontrar a temperatura ótima de funcionamento do método de Karl Fishcer (120°C), comparou-se as 20 análises (N21 à n40) de ambos os métodos e obteve-se um z-score médio de 0.51. Comparando este valor de z-score com o valor de z-score obtido para as 20 análises do método de Karl Fishcer (T°C=120), verifica-se que este é inferior no método de Karl Fischer pelo que se pode concluir que o método de Karl Fischer é mais exato que o método de Estufa.

Capítulo 5 – Conclusões

A medição e o controlo da humidade são de grande importância para diversas áreas da indústria, tanto para manutenção da qualidade dos produtos no armazenamento, como para garantir a qualidade final do produto na linha de produção. O trabalho desenvolvido teve essencialmente um objetivo – a comparação de dois métodos analíticos de referência para a determinação do teor de humidade do leite em pó (Estufa versus Karl Fischer), com intuito de validar este último. Para esse efeito, foi utilizada uma amostra de referência com valor de humidade conhecido para ambos os métodos (2.71% para o método de Karl Fischer e 2.13% para o método de Estufa).

Na análise dos resultados utilizou-se a ferramenta estatística SPSS e aplicou-se o teste t-student para comparar as médias dos resultados obtidos. Verificou-se através dos resultados obtidos que, quando comparado o método da Estufa com o Karl Fischer para as 40 análises, verificou-se que em termos médios ambos os métodos apresentaram diferenças significativas quer para os resultados obtidos (2.76% e 2.16%, para o método de Karl Fischer e para o método de Estufa, respetivamente), quer para os desvios do valor obtido face ao valor de referência (0.07 para a Estufa e 0.11 para o Karl Fischer). Após ter-se encontrado a temperatura ótima de funcionamento do método de Karl Fischer, comparou-se novamente ambos os métodos para as 20 análises realizadas à temperatura ótima de funcionamento do Karl Fischer (120°C) e verificou-se que em relação aos valores obtidos para ambos os métodos, em termos médios existiram diferenças significativas (2.65% para a Estufa e 2.16% para o Karl Fischer). Em relação ao valor obtido face ao valor de referência para as 20 análises, não houve diferenças significativas (0.07 para o método de Estufa e 0.06 para o método de Karl Fischer).

A avaliação da validação dos métodos foi feita com base na precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e na exatidão. De acordo com os resultados obtidos, em termos de repetibilidade, inicialmente e uma vez que ainda não tinha sido encontrada a temperatura ótima de funcionamento do método Karl Fischer obteve-se em termos médios uma humidade de 2.76%, que corresponde a um desvio padrão de 0.12. Após ter sido encontrada a temperatura ótima de funcionamento do método (120°C) obteve-se um valor médio 2.65% de humidade que corresponde a desvio padrão de 0.02. Em relação ao método de Estufa, em termos médios obteve-se 2.16% de humidade que corresponde a um desvio padrão de 0.03, logo ambos os métodos encontram-se validados em termos

de repetibilidade verificando-se que o método Karl Fischer apresenta uma melhor repetibilidade (desvio padrão= 0.02).

Quanto à reprodutibilidade, para ambos os métodos foram efetuadas 8 análises por diferentes analistas num espaço de dois dias consecutivos (o analista 1 fez num dia e o analista 2 fez no dia seguinte). No que diz respeito à reprodutibilidade para o método Karl Fischer, verificou-se que não existiram diferenças significativas quando comparados os valores de humidade obtidos por ambos os analistas, 2.67% de humidade com um desvio padrão de 0.02 e 2.66% de humidade com um desvio padrão de 0.01 para o analista 1 e para o analista 2, respetivamente. No método de Estufa, o desvio padrão entre os dois analistas foi maior em relação ao método de Karl Fischer, o que nos leva a concluir que, apesar de ambos os métodos se encontrarem validados em termos de reprodutibilidade, o método de Karl Fischer apresenta melhor reprodutibilidade.

No que diz respeito à exatidão, esta foi avaliada com base no fator de desempenho (z-score). De acordo com os resultados obtidos pode-se verificar que o método de Karl Fischer, trabalhando nas suas condições de temperatura ótima (120°C), apresentou em termos médios um valor de z-score mais baixo que o método de Estufa (0.43 e 0.51, respetivamente). Apesar de ambos os métodos, apresentarem valores de z-score muito satisfatórios, conclui-se que em termos de exatidão, o método de Karl Fischer é mais exato.

Assim, e tendo em conta, todos os resultados, conclui-se que, em termos gerais, para a avaliação da validação de ambos os métodos, o método de Karl Fischer demonstrou ser o mais indicado para a determinação da humidade do leite em pó.

Bibliografia

- Amiot, J. 1991. *Ciência y tecnologia de la leche*. Zaragoza. Editorial Acribia, S.A. 547p.
- Anklam,E. 1997. *Determination of the Moisture (Water) Content in Milk Products*. Environment Institute Food and Drug Analysis Consumer Protection Unit. Brussels, Luxembourg.
- A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis*. 17th edição. Gaithersburg, Maryland, 2000
- Bampi, M. 2011. *Estudo do tamanho de gotas e quantidade de água empregando espectroscopia NIR*. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Barcia, T.M.Ma. (2013). *Composição centesimal: Determinação dos componentes principais contidos nos alimentos*. Acedido a 21 de Agosto de 2013, disponível em: www.fea.unicamp.br
- BEHMER, M. L.A. 1984. *Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise*. São Paulo. Livraria Nobel. 320p.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F.O. 1992. *Química do processamento de alimentos*. São Paulo. Livraria Varela.151p.
- Bruttel, P., Schlink, R. 2006. *Water determination by Karl Fischer titration*. 80f. Monograph. Metrohm Ltd
- CECCHI, H. M. 2007. *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. São Paulo; Editora Unicamp.
- Chasin, A.M.; Nascimento, et all., *Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral*, Revista Brasileira Toxicologia, 1998, v.11, n.1, p.1-6
- Comissão Europeia (CE). 2007. *Regulamento da Comissão (CE) Nº 1441/2007. Critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios*. Jornal Oficial, L 322, 07/12/2007, pp 12-29.
- Condoeira, S.B. 2011. *Métodos de Controlo de Qualidade de Alimentos: Determinação do teor de humidade em cereais*. Faculdade de ciências, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.

Decreto de Lei n.º 213/2003 de 18 de Setembro. Diário da República nº 216/2003 - I Série-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Estatísticas Agrícolas 2012 – Instituto Nacional de Estatística Portugal – 2013 – Lisboa – INE disponível em: <http://www.ine.pt>

Fortuna. J. L. 2010. Métodos Modernos e Tradicionais de Análise de Humidade em Produtos de Origem Animal. Universidade Federal Fluminense. Niterói - Rio de Janeiro.

Foschiera, J. L. 2004 Indústria de Laticínios: Industrialização do leite, Análises e Produção de Derivados. Porto Alegre. Suliani Editografia Ltda.

Franco, G. 1992. Tabela de composição química de alimentos. 9 ed. Rio de Janeiro: Athenen.

Guia Relacre 13, “Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química”, Relacre, 2000

ISO/IEC 17043 “Conformity assessment — General requirements for proficiency testing”, 2010.

Jay, M. 2005. Microbiologia de Alimentos. 6º ed. – Porto Alegre: Ed. Artmed.

Jorge L.G.F.S. Costa Pereira. 2008. Caracterização e Validação de Métodos Analíticos. Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Leites em pó. Disponível em: www.inmetro.gov.br Acedido a 22 de Agosto de 2013.

Leites em pó. Disponível em: www.milknet.com.br Acedido a 5 de Março de 2013.

Lemos, A. Perrona, I. Stephani, R. 2005. Introdução à tecnologia de produtos lácteos concentrados e desidratados. Instituto de Laticínios Candido Tostes. XXII Congresso Nacional de Laticínios.

LI-00.500-1 “General Moisture Oven Method”, Nestlé Laboratory Instructions

LI-08.55-1 “Milk Powders and Similar Products Moisture Determination According to Karl Fischer”, Nestlé Laboratory Instructions

Madrid, A. Cenzamo, I. Vicente, J.M. 1996. Manual de indústrias dos alimentos. São Paulo. Livraria Varela. 599p.

Mapa (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Disponível em: www.agricultura.gov.br Acedido a 3 de Junho de 2013.

NP EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos Gerais de Competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração. Dezembro 2005. Instituto Português da Qualidade.

Ordóñez, J. A, Rodriguez, M. I. Álvarez, L. F., Sanz, M. L. G., et al. 2005. Tecnologia de Alimentos. Porto Alegre. Volume 2. Artmed Editora S.A. 279p.

Park, K.J.; António, G.C. 2006. Análise de Materiais Biológicos. Campinas. Faculdade de Engenharia Agrícola. Unicamp.

Pisechý, J. 1997. Handobook of Milk Powder Manufacture. Copenhagen, Denmark, 1997.

Portaria nº 533/93 de 21 de Maio. Diário da República nº 118/1993 - I Série-B. Ministério da Agricultura e Do Comércio e Turismo.

Ratti, C. Mujumdar, A. S. 1995. Infrared Drying. In: MUJUMDAR, A. S. (Vol. Eds.). Handbook of Industrial Drying. v. 1. New York: Marcell Dekker Inc., p. 567-588.

Ribeiro, E. 2005. Determinação de humidade em alimentos. Guarulhos.

Ribani M, Bottoli C, Collins C, Jardim I, Melo L. 2004. Validação em Métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quím. Nova, v.27, n.5, São Paulo

Salinas, R.D. Alimentos e Nutrição: Introdução à Bromatologia 3a edição, Porto Alegre: Artmed, 2002.

SILVA, D.J, Queiroz, A.C, Análise de Alimentos. 3ª edição. Universidade Federal de Viçosa, Editora UFV – 2004

SOCIÉTÉ SCIENTIFIQUE D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE. Leche y productos lácteos. v.2, Zaragoza. Editoria Acribia, S.A. 1993. 524p.

VARNAM, A, H.; SUTHERLAND, J. P. Leche y productos lácteos: tecnologia, química y microbiología. Volume 1. Zaragoza. Editorial Acribia, S.A. 1995. 476p.

7- Anexos

7.1 Anexo 1 – Metodologia

7.1.1 Preparação das cápsulas



Figura 7.1.1- Cápsulas na estufa (Hereaus)



Figura 7.1.2- Exsicador com cápsulas a arrefecer.



Figura 7.1.3 – Balança (Mettler) com cápsula vazia

7.1.2 Procedimento para a determinação da humidade (Método de Estufa)



Figura 7.1.4 – Pesagem da amostra (2g)



Figura 7.1.5 – Distribuição da amostra pela superfície da cápsula



Figura 7.1.6 – Amostra distribuída pela superfície da cápsula



Figura 7.1.7 – Estufa (Hereaus) com as placas contendo aproximadamente 2g de amostra.

7.1.3 Preparação dos frascos (Método Karl Fischer)



Figura 7.1.8- Exsicador com os frascos a arrefecer.

7.1.4 Preparação do Drift



Figura 7.1.9- Colocação do tubo metálico no frasco



Figura 7.1.10 -Colocação da tampa de borracha

7.1.5 Preparação do branco



Figura 7.1.11- Selagem do branco com fita de alumínio



Figura 7.1.12- Colocação da tampa de borracha

7.1.6 Procedimento para a determinação da humidade (Método Karl Fischer)



Figura 7.1.13- Tara do frasco vazio



Figura 7.1.14- Pesagem da amostra (~0.3g)



Figura 7.1.15- Selagem dos frascos com fita metálica



Figura 7.1.16- Aparelho Karl Fischer com as amostras.



Figura 7.1.17- Seleção do botão "drain"

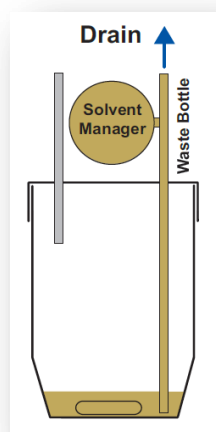


Figura 7.1.18- Drenagem do solvente



Figura 7.1.19- Seleção do botão "Fill".

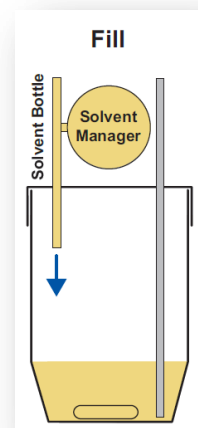


Figura7.1.20- Enchimento do copo de titulação com metanol.



Figura 7.1.21- Seleção do botão “Stirrer”



Figura 7.1.22- Seleção do botão “H₂O 120°”

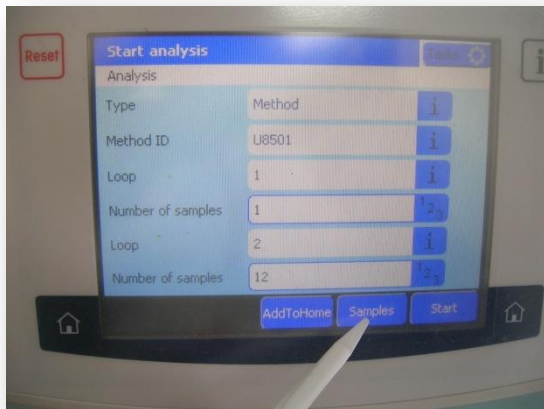


Figura 7.1.23- Seleção do botão “Samples”

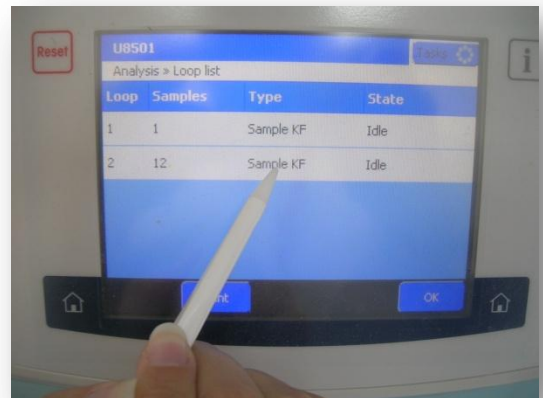


Figura 7.1.24- Seleção do Loop 2

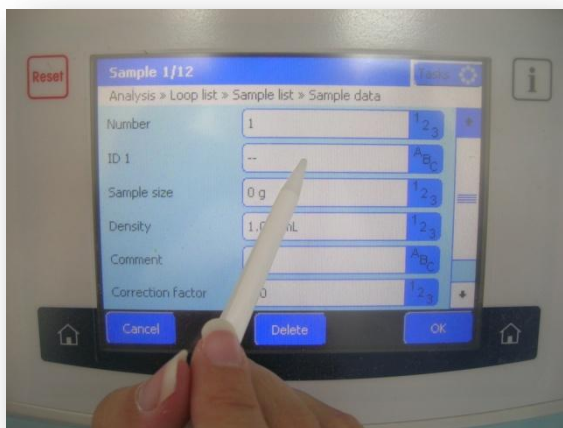


Figura 7.1.25- Seleção da tecla "ID 1"

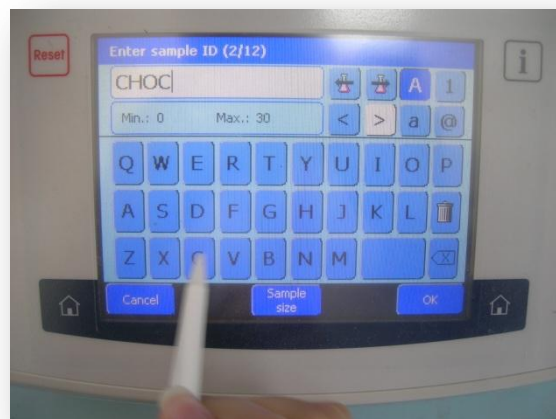


Figura 7.1.26- Identificação das amostras



Figura 7.1.27- Seleção da tecla "Sample size"



Figura 7.1.28- Impressora (Mettler-Toledo)

7.2 Anexo 2 – Tratamento Estatístico dos Resultados

Tabela 7.2.1 - Resultados do teor de humidade determinados pelos dois métodos (KF e Estufa) para a amostra de referência

Dada para a Validação dos métodos analíticos		Determinação da Humidade - Método de (KF) – LI 08.55-1							Determinação da Humidade - Método da Estufa – LI 00.500-1				
Data da Análise	Nr. Análise (n)	Tempo Análise (seg)	Temperatura do forno (°C)	Identificação da amostra de Referência (DDP 1- 2012)					Identificação da amostra de Referência (DDP-1 2012)				
				Valor de Referência % (m/m)	Resultado obtido % (m/m)	SDR used for z-score	Desvio		Valor de Referência % (m/m)	Resultado obtido % (m/m)	SDR used for z-score	Desvio	
z-score	Ref. vs Valor (abs)	z-score	Ref. vs Valor (abs)										
25-jun-13	N1	900	130	2,71	2,92	0,136	1,54	0,21	2,13	2,19	0,128	0,47	0,06
	N2	900	130	2,71	2,91	0,136	1,47	0,20	2,13	2,15	0,128	0,16	0,02
	N3	900	130	2,71	2,90	0,136	1,40	0,19	2,13	2,09	0,128	0,31	0,04
	N4	900	130	2,71	2,91	0,136	1,47	0,20	2,13	2,16	0,128	0,23	0,03
	N5	900	130	2,71	2,90	0,136	1,40	0,19	2,13	2,14	0,128	0,08	0,01
	N6	900	130	2,71	2,93	0,136	1,62	0,22	2,13	2,21	0,128	0,63	0,08
	N7	900	130	2,71	2,92	0,136	1,54	0,21	2,13	2,04	0,128	0,70	0,09
	N8	900	130	2,71	2,94	0,136	1,69	0,23	2,13	2,00	0,128	1,02	0,13
	N9	900	130	2,71	2,95	0,136	1,76	0,24	2,13	2,09	0,128	0,31	0,04
	N10	900	130	2,71	2,93	0,136	1,62	0,22	2,13	2,20	0,128	0,55	0,07
27/jun/32	N11	900	125	2,71	2,84	0,136	0,96	0,13	2,13	2,22	0,128	0,70	0,09
	N12	900	125	2,71	2,83	0,136	0,88	0,12	2,13	2,16	0,128	0,23	0,03
	N13	900	125	2,71	2,84	0,136	0,96	0,13	2,13	2,19	0,128	0,47	0,06
	N14	900	125	2,71	2,82	0,136	0,81	0,11	2,13	2,25	0,128	0,94	0,12
	N15	900	125	2,71	2,82	0,136	0,81	0,11	2,13	2,20	0,128	0,55	0,07
	N16	900	125	2,71	2,84	0,136	0,96	0,13	2,13	2,22	0,128	0,70	0,09
	N17	900	125	2,71	2,86	0,136	1,10	0,15	2,13	2,24	0,128	0,86	0,11
	N18	900	125	2,71	2,81	0,136	0,74	0,10	2,13	2,25	0,128	0,94	0,12
	N19	900	125	2,71	2,81	0,136	0,74	0,10	2,13	2,15	0,128	0,16	0,02
	N20	900	125	2,71	2,83	0,136	0,88	0,12	2,13	2,12	0,128	0,08	0,01
3-jul-13	N21	900	120	2,71	2,64	0,136	0,51	0,07	2,13	2,16	0,128	0,23	0,03
	N22	900	120	2,71	2,65	0,136	0,44	0,06	2,13	2,15	0,128	0,16	0,02
	N23	900	120	2,71	2,65	0,136	0,44	0,06	2,13	2,26	0,128	1,02	0,13
	N24	900	120	2,71	2,61	0,136	0,74	0,10	2,13	2,25	0,128	0,94	0,12
	N25	900	120	2,71	2,64	0,136	0,51	0,07	2,13	2,08	0,128	0,28	0,05
	N26	900	120	2,71	2,64	0,136	0,51	0,07	2,13	2,10	0,128	0,23	0,03
9-jul-13	N27	900	120	2,71	2,63	0,136	0,59	0,08	2,13	2,12	0,128	0,08	0,01
	N28	900	120	2,71	2,65	0,136	0,44	0,06	2,13	2,12	0,128	0,08	0,01
	N29	900	120	2,71	2,64	0,136	0,51	0,07	2,13	2,00	0,128	1,02	0,13
	N30	900	120	2,71	2,64	0,136	0,51	0,07	2,13	2,16	0,128	0,23	0,03
	N31	900	120	2,71	2,67	0,136	0,29	0,04	2,13	2,05	0,128	0,63	0,08
	N32	900	120	2,71	2,65	0,136	0,44	0,06	2,13	2,10	0,128	0,23	0,03
6-set-2013	N33	900	120	2,71	2,67	0,136	0,29	0,04	2,13	2,19	0,128	0,47	0,06
	N34	900	120	2,71	2,68	0,136	0,22	0,03	2,13	2,23	0,128	0,78	0,10

Comparação de Métodos Analíticos de Referência: Determinação da Humidade do Leite em Pó

2013

	N35	900	120	2,71	2,68	0,136	0,22	0,03	2,13	2,25	0,128	0,94	0,12
	N36	900	120	2,71	2,65	0,136	0,44	0,06	2,13	2,20	0,128	0,55	0,07
	N37	900	120	2,71	2,66	0,136	0,37	0,05	2,13	2,20	0,128	0,55	0,07
	N38	900	120	2,71	2,64	0,136	0,51	0,07	2,13	2,18	0,128	0,39	0,05
	N39	900	120	2,71	2,66	0,136	0,37	0,05	2,13	2,23	0,128	0,78	0,10
	N40	900	120	2,71	2,68	0,136	0,22	0,03	2,13	2,21	0,128	0,63	0,08
	Média				2,76					2,16			
	Mínimo				2,61					2,00			
	Máximo				2,95					2,26			
	SD				0,12					0,07			

Tabela 7.2.2 – Teste t-student para comparar a média dos valores obtidos bem como a média dos desvios para o método de Estufa e para o método de Karl Fischer nas 40 análises

		Teste de Levene para igualdade de Variâncias		Teste-t para igualdade de médias						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Diferença da média	Desvio Padrão da diferença	95% Intervalo de confiança para a diferença	
									Lower	Upper
Desvio Ref. vs Valor (abs)	Igualdade de variâncias assumido	11,937	,001	-3,884	78	,000	-,04675	,01204	-,07071	-,02279
	Igualdade de variâncias não assumido			-3,884	63,581	,000	-,04675	,01204	-,07080	-,02270
Resultado obtido % (m/m)	Igualdade de variâncias assumido	43,062	,000	-27,570	78	,000	-,60075	,02179	-,64413	-,55737
	Igualdade de variâncias não assumido			-27,570	62,591	,000	-,60075	,02179	-,64430	-,55720

Tabela 7.2.3 – Teste t-student para comparar a média dos valores obtidos bem como a média dos desvios para o método de Estufa e para o método de Karl Fischer nas 20 análises após encontrar temperatura ótima de funcionamento do Karl Fischer

		Teste de Levene para igualdade de Variâncias		Teste-t para igualdade de médias						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Diferença da média	Desvio Padrão da diferença	95% Intervalo de confiança para a diferença	
									Lower	Upper
Desvio Ref. vs Valor (abs)	Igualdade de variâncias assumido	15,091	,000	,759	38	,453	,00750	,00989	-,01251	,02751
	Igualdade de variâncias não assumido			,759	26,394	,455	,00750	,00989	-,01281	,02781
Resultado obtido % (m/m)	Igualdade de variâncias assumido	22,616	,000	-29,621	38	,000	-,48950	,01653	-,52295	-,45605
	Igualdade de variâncias não assumido			-29,621	21,427	,000	-,48950	,01653	-,52382	-,45518

Tabela 7.2.4- Resultados obtidos na determinação do teor de humidade por diferentes analistas

Dados para a validação da reprodutibilidade dos métodos	Determinação da Humidade - Método de Karl Fischer – LI 08.55-1							Determinação da Humidade - Método de Estufa – LI 00.500-1				
	Tempo Análise (seg)	Temperatura do forno (°C)	Identificação da amostra de Referência (DDP 1- 2012)					Identificação da amostra de Referência (DDP-1 2012)				
			Valor de Referência %(m/m)	Resultado obtido %(m/m) Analista 1	Desvio Ref. vs valor obtido (abs)	Resultado obtido %(m/m) Analista 2	Desvio Ref. vs valor obtido (abs)	Valor de Referência %(m/m)	Resultado obtido %(m/m) Analista 1	Desvio Ref. vs valor obtido (abs)	Resultado obtido %(m/m) Analista 2	Desvio Ref. vs valor obtido (abs)
N1	900	120	2,71	2,67	0,04	2.64	0.07	2,13	2,19	0,06	2.09	0.04
N2	900	120	2,71	2,68	0,03	2.66	0.05	2,13	2,23	0,10	2.16	0.03
N3	900	120	2,71	2,68	0,03	2.66	0.05	2,13	2,25	0,12	2.23	0.10
N4	900	120	2,71	2,65	0,06	2.65	0.06	2,13	2,20	0,07	2.18	0.05
N5	900	120	2,71	2,66	0,05	2.68	0.03	2,13	2,20	0,07	2.24	0.11
N6	900	120	2,71	2,64	0,07	2.67	0.04	2,13	2,18	0,05	2.21	0.08
N7	900	120	2,71	2,66	0,05	2.65	0.06	2,13	2,23	0,10	2.25	0.12
N8	900	120	2,71	2,68	0,03	2.66	0.05	2,13	2,21	0,08	2.20	0.07
Média				2,67		2.66		2,21			2.20	
Mínimo				2,64		2.64		2,18			2.09	
Máximo				2,68		2.68		2,25			2.25	
SD				0,02		0.01		0,02			0.05	

