

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

SIMONE SILVEIRA NERY DA SILVA COFANI DOS SANTOS

**Caracterização química de leite em pó para produção de
material de referência certificado**

Piracicaba

2016

SIMONE SILVEIRA NERY DA SILVA COFANI DOS SANTOS

**Caracterização química de leite em pó para produção de
material de referência certificado**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestra em
Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabete A. De Nadai
Fernandes**

Piracicaba

2016

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Santos, Simone Silveira Nery da Silva Cofani dos

Caracterização química de leite em pó para produção de material de referência certificado / Simone Silveira Nery da Silva Cofani dos Santos; orientadora Elisabete A. De Nadai Fernandes. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

80 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Composição química 2. Elementos químicos 3. Metrologia 4 Qualidade dos alimentos I. Título

CDU 543.522: (637.143-006.063)

Ao meu esposo e à minha filha, pelo amor e carinho que me dedicam sempre

À minha mãe e à minha sogra pela força e torcida com amor

Ao meu querido Sogra-Pai que me apoiou enquanto pôde, e deixou saudades

Ao meu Pai, que se vivo fosse, estaria muito feliz pela ocasião

Aos meus amados Gatos que estiveram do meu lado todo tempo da elaboração deste trabalho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

ÀS INSTITUIÇÕES:

- ✓ Universidade de São Paulo (USP)
- ✓ Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)
- ✓ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)
- ✓ Laboratório de Radioisótopos (LRi) do CENA

AOS COLABORADORES:

- ✓ Prof^a. Dr^a. Elisabete A. De Nadai Fernandes, pelas oportunidades oferecidas, orientação, incentivo, confiança e amizade
- ✓ Dr. Márcio Arruda Bacchi, pela amizade e sempre pronta ajuda em todos os momentos
- ✓ Dr. Luís Gustavo Cofani dos Santos, pelo amor, companheirismo e auxílio na realização de procedimentos laboratoriais e atividades em geral
- ✓ Prof. Dr. Gabriel Adrián Sarriés, pelas sugestões e auxílio estatístico e amizade
- ✓ Dr. André Araújo de Lima pela amizade e colaboração
- ✓ Marcos Busanello, pelas análises estatísticas e sugestões e pela amizade
- ✓ Lilian Seiko Kato, pela amizade e sempre pronta ajuda e companheirismo
- ✓ Adriana de Angelis Fogaça e Cláudio Luiz Gonzaga, pela amizade e ajuda em prover materiais essenciais ao bom andamento da pesquisa
- ✓ Silvana Regina Viccino Sarriés pela amizade e apoio
- ✓ Marília Ribeiro Garcia Henyei, pela amizade e correções das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica
- ✓ Aos motoristas do CENA pela prestatividade
- ✓ Aos amigos e colegas do LRi, que tornaram um período de longa dedicação em algo divertido: Camila Elias, Gabriela Apolinário Silva, Jéssica Caroline Gonzaga, Marcela Camargo Desiderio, Marcos Paulo Silva Lima, Natália Protti, Nathalia Luccas, Pedro Thiago Zambon Américo e Thiago Clemente Ferreira de Assis.

À minha amada e inspiradora Mãe Clélia,

Aos meus amados Pais do coração Roseli e Roberto (in memoriam),

À minha amada e incrível Filha Gabriela,

*E, especialmente, ao meu amado Esposo Gustavo, pelo incentivo, sugestões,
auxílio, disponibilidade nos momentos dedicados à elaboração desse trabalho,*

*Ao meu amado Pai Nelson (in memoriam) que sempre foi um grande amigo e
companheiro de jornada, que se aqui estivesse estaria muito feliz!*

Nunca é tarde demais para começar tudo de novo...

Raul Seixas

RESUMO

SANTOS, S. S. N. S. C. **Caracterização química de leite em pó para produção de material de referência certificado**. 2016. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

O leite é classificado quimicamente como uma dispersão mista de aspecto branco com sabor levemente adocicado. Além da elevada concentração de cálcio, contém micronutrientes, aminoácidos e ácidos graxos em proporções adequadas à nutrição humana. Segundo a FAO, até o final de 2016, a produção mundial de leite bovino atingirá 817 milhões de toneladas. No Brasil, o setor lácteo apresenta-se como uma atividade de impacto socioeconômico significativo. Para atender o anseio de uma sociedade cada vez mais preocupada com a qualidade dos produtos que consome, assim como exigências internacionais, a Rede Brasileira de Laboratórios Centralizados da Qualidade de Leite (RBQL) através do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, aprovou a Instrução Normativa nº 51 - IN51, contendo os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. Milhares de medições químicas são realizadas com o propósito de tomada de decisões e regulamentações da qualidade dos alimentos oferecidos à população mundial, sendo essencial existir confiabilidade nos resultados das análises químicas. Recomenda-se que os laboratórios analíticos utilizem materiais de referência certificados (MRC), provenientes de um fornecedor reconhecido e competente, que propiciem caracterização química inequívoca do material. Neste contexto, este trabalho objetivou a caracterização química de leite em pó bovino de diferentes tipos comercialmente disponíveis, com o propósito de fornecer subsídios para a produção de MRC dessa matriz alimentar. Foram adquiridas 72 amostras de leite em pó no comércio varejista, englobando os tipos integral, semidesnatado, desnatado, instantâneo e enriquecido. O método de análise por ativação neutrônica instrumental empregado permitiu a determinação dos elementos químicos essenciais Ca, Fe, K, Na e Zn, além de Br, Co, Cs e Rb. O emprego de materiais de referência certificados como controle da qualidade analítica corroborou a exatidão e a precisão dos resultados. Dentre as amostras estudadas, algumas são enriquecidas com os elementos químicos Ca e Fe. A hipótese de igualdade dos leites enriquecidos com Ca e Fe foi rejeitada para ambos, visto que observou-se a existência de diferenças estatísticas ($p < 0,001$) para esses elementos. A média aritmética dos leites enriquecidos com Fe foi de 167,7 mg/kg ($n = 15$), enquanto a média aritmética dos leites não-enriquecidos foi de 13,6 mg/kg ($n = 57$). A média aritmética dos leites enriquecidos com Ca foi de 22.822 mg/kg ($n = 3$), enquanto a média aritmética dos leites não-enriquecidos foi de 10.049 mg/kg ($n = 69$). De maneira geral, os leites em pó com menores quantidades de gordura (desnatado e semidesnatado) apresentaram maiores quantidades dos elementos químicos. Pela análise de agrupamento, verificou-se que a distância multivariada entre os leites em pó integrais foi menor, o que indica similaridade. Assim, entende-se como estratégica e viável a seleção deste tipo de leite em pó como candidato para a produção de material de referência certificado.

Palavras-chave: Material de referência. Leite em pó. INAA.

ABSTRACT

SANTOS, S. S. N. S. C. **Chemical characterization of milk powder for the production of certified reference material**. 2016. 80 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Milk is chemically classified as a mixed white appearance dispersion with a slightly sweet taste. Besides the high calcium concentration, the milk contains micronutrients, amino acids and fatty acids in proportions suitable for human nutrition. According to FAO, by the end of 2016, the world production of bovine milk will reach 817 million tons. In Brazil, the dairy sector is an activity with a significant socioeconomic impact. To meet the longing of a society increasingly concerned with the quality of the products it consumes, as well as the international requirements, the Brazilian Network of Centralized Milk Quality Laboratories (RBQL) through the National Program for the Improvement of Milk Quality (PNMQL), created by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, approved the Normative Instruction No. 51 - IN51, containing the technical regulations for milk production, identity and quality. Thousands of chemical measurements are performed for the purpose of making decisions and regulations of the quality of food offered to the world population, and it is essential to have reliability in the results of chemical analyses. It is recommended that analytical laboratories use certified reference materials (CRM) from a recognized and competent supplier that provides unequivocal chemical characterization of the material. In this context, this work aimed at the chemical characterization of bovine milk powder of different types commercially available, with the purpose of providing subsidies for the production of CRM of this food matrix. Seventy-two samples of milk powder were purchased in the retail market, including the integral, semi-skimmed, skimmed, instant and enriched types. Instrumental neutron activation allowed the determination of the essential chemical elements Ca, Fe, K, Na and Zn, as well Br, Co, Cs and Rb. The analytical quality control with certified reference materials corroborated the accuracy and precision of the results. Among the samples studied, some are enriched with the chemical elements Ca and Fe. The hypothesis of equality of Ca- and Fe-enriched milks was rejected for both, since there were statistical differences ($p < 0.001$) for these elements. The arithmetic mean of Fe-enriched milks was 167.7 mg/kg ($n = 15$), while the arithmetic mean of non-enriched milks was 13.6 mg/kg ($n = 57$). The arithmetic mean of Ca-enriched milks was 22,822 mg/kg ($n = 3$), while the arithmetic mean of non-enriched milks was 10,049 mg/kg ($n = 69$). In general, milk powder with lower amounts of fat (skimmed and semi-skimmed) had higher amounts of the chemical elements. The cluster analysis evidenced that the multivariate distance for the whole milk powder was smaller, which indicates the similarity. Thus, it is understood as strategic and viable the selection of this type of milk powder as candidate for production of certified reference material.

Keywords: Reference material. Milk powder. INAA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Crescimento da produção de leite bovino nos últimos 4 anos no Brasil (USDA, 2016).....	22
Figura 1.2	Crescimento do consumo de leite bovino nos últimos 4 anos no Brasil (USDA, 2016).....	23
Figura 2.1	Atribuições para o preparo de material de referência segundo ISO Guides 30,31, 32, 33, 34 e 35.....	27
Figura 2.2	Aplicações dos MRC. ISO Guides 30,31, 32, 33, 34 e 35.....	28
Figura 2.3	Comparação de espectros eletromagnéticos originados pela detecção da radiação proveniente da mesma fonte emissora, por três tipos de detectores de estado sólido.....	33
Figura 2.4	Classificação da NAA considerando a presença ou não de tratamentos químicos.....	35
Figura 3.1	Estados de origem das amostras de leite em pó.....	40
Figura 3.2	Distribuição das atividades laboratoriais em função da irradiação...	42
Figura 3.3	Acondicionamento das amostras em cápsulas de polietileno de alta pureza.....	43
Figura 3.4	Determinador de umidade utilizado na determinação de umidade residual, com aquecimento por infravermelho.....	44
Figura 3.5	Distribuição de amostras, materiais de referência certificados, branco e monitores de fluxo de nêutrons nos recipientes de irradiação (“coelhos”) correspondentes a um lote analítico.....	44
Figura 3.6	Reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN/CNEN localizado na cidade de São Paulo-SP, onde as amostras foram irradiadas.....	45
Figura 3.7	<i>Glove box</i> - Aparato projetado pelo Serviço de Proteção Radiológica do CENA/USP visando a minimização da exposição do usuário na manipulação de amostras radioativas.....	47
Figura 3.8	Visão parcial da sala de espectrometria gama “Prof. Dr. Epaminondas Sansígolo de Barros Ferraz”, localizada nas dependências do LRi/CENA/USP.....	48

Figura 3.9	Interfaces principais dos aplicativos QuantuMCA e QuantuINAA, utilizados nas análises espectrais, determinações químicas e cálculo das incertezas associadas.....	52
Figura 3.10	Estratégia para escolha do tipo de teste estatístico empregado.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Figura 4.1	Gráfico de distribuição <i>Boxplot</i> para o elemento químico Ca (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado, integral e semidesnatado.....	57
Figura 4.2	Gráfico de distribuição <i>Boxplot</i> para o elemento químico K (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado, integral e semidesnatado.....	57
Figura 4.3	Gráfico de distribuição <i>Boxplot</i> para o elemento químico Na (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado, integral e semidesnatado.....	58
Figura 4.4	Gráfico de distribuição <i>Boxplot</i> para o elemento químico Zn (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado, integral e semidesnatado.....	58
Figura 4.5	Gráfico de distribuição <i>Boxplot</i> para o elemento químico Fe (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado, integral e semidesnatado.....	59
Figura 4.6	Gráfico de distribuição <i>Boxplot</i> para o elemento químico Zn (mg/kg; base seca), considerando o método de processamento não instantâneo e instantâneo para o leite em pó integral.....	61
Figura 4.7	Análise de agrupamento considerando os nove elementos químicos observados (Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn) para os três tipos de leite adquiridos (desnatado, semidesnatado e integral).....	66
Figura 4.8	<i>Biplot</i> dos componentes principais 1 e 2, representando 65,84 % da variabilidade dos dados.....	68
Figura 4.9	Números <i>En</i> calculados a partir das frações de massa dos elementos químicos determinados no material de referência IAEA A-11 (<i>Milk Powder</i>), nas cinco irradiações.....	69
Figura 4.10	Números <i>En</i> calculados a partir das frações de massa dos elementos químicos determinados no material de referência IAEA V-10 (<i>Hay Powder</i>), nas cinco irradiações.....	70
Figura 4.11	Números <i>En</i> calculados a partir das frações de massa dos elementos químicos determinados no material de referência NIST SRM1549 (<i>Non-Fat Milk Powder</i>), nas cinco irradiações.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Recomendações de Ca, em mg/dia, conforme a faixa etária e grupos de gestantes lactantes, segundo DRIs.....	21
Tabela 2.2	Recomendação calórica média (kcal), número de porções diárias e valor energético médio das porções (kcal).....	23
Tabela 2.3	Classificação do leite em pó em função do teor de gordura, expresso em % (m/m), segundo a Portaria N.º 369 de 04 de setembro de 1997.....	24
Tabela 2.4	Relação de materiais de referência certificados de leite em pó (MRC), com breve descrição (Descrição), ano de fabricação (Ano) e país produtor (País) (COMAR, 2014).....	30
Tabela 3.1	Amostras de leite em pó adquiridas no comércio varejista, apresentando o tipo (integral, desnatado e semidesnatado), designação comercial (não-instantâneo e instantâneo) além de códigos de identificação e estado (UF).....	41
Tabela 3.2	Materiais de referência certificados utilizados nos cinco lotes de amostras, com respectivos códigos de identificação, produtores e matrizes.....	45
Tabela 3.3	Data da irradiação, localização no reator (posição/prateleira) e valores médios e desvio padrão do fluxo de nêutrons térmicos para os cinco lotes encaminhados ao reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN/CNEN.....	46
Tabela 3.4	Condições experimentais observadas nas medições da atividade induzida nas amostras, materiais de referência certificados e brancos analíticos.....	49
Tabela 3.5	Condições experimentais observadas nas medições da atividade induzida nos monitores de fluxo.....	50
Tabela 3.6	Radionuclídeos utilizados na determinação dos elementos químicos (Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn) nas amostras e monitores de fluxo (Cr), acompanhados de meia-vida (dias) e principal energia de emissão gama (keV) com respectivo parâmetro k0. Fonte: Aplicativo QuantuINAA (BACCHI; FERNANDES, 2003).....	51

Tabela 4.1	Frações de massa médias (mg/kg; base seca) de cada elemento químico nas amostras de leite desnatado (DES), semidesnatado (SDES) e integral (INT), seguidas de respectivos desvios-padrão, valores de probabilidade (p) e testes estatísticos utilizados.....	56
Tabela 4.2	Frações de massa médias (mg/kg; base seca) para cada elemento químico considerando o tipo de processamento de leite em pó integral não-instantâneo e instantâneo, seguidas dos respectivos valores de probabilidade (p) e testes estatísticos utilizados.....	60
Tabela 4.3	Matriz de correlação residual para os elementos químicos determinados nas amostras de leite em pó.....	63
Tabela 4.4	Nomenclatura das correlações (coeficiente de <i>Pearson</i> - r), variando de perfeita positiva a perfeita negativa, proposta por Santos (2007).....	64
Tabela 4.5	Classificação das correlações estatisticamente significativas.....	65
Tabela 4.6	Frações de massa de Br e Cs determinados no material de referência IAEA A-11 (<i>Milk Powder</i>) nas cinco irradiações, acompanhadas das respectivas incertezas expandidas. Valores expressos em mg/kg (base seca).....	70
Tabela 4.7	Frações de massa de Cs, K e Na no material de referência IAEA V 10 (<i>Hay Powder</i>) determinados nas cinco irradiações, acompanhadas das respectivas incertezas expandidas (%). Valores expressos em mg/kg (base seca).....	71
Tabela 4.8	Frações de massa de Br, Co, Cs e Rb determinados no material de referência NIST SRM1549 (<i>Non-Fat Milk Powder</i>) nas cinco irradiações, acompanhadas das respectivas incertezas expandidas (%). Valores expressos em mg/kg (base seca).....	73

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 2.1	Equação mais popular na NAA	34
Equação 2.2	Equação fundamental	36
Equação 2.3	Equação do método comparativo	37
Equação 2.4	Equação do método k_0	38
Equação 3.1	Equação para determinação do limite de detecção utilizado pelo aplicativo Quantu INAA	53
Equação 3.2	Equação para determinação do número E_n	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 O leite	20
2.2 Leite em pó	24
2.3 Controle da qualidade dos alimentos	25
2.4 Materiais de referência	26
2.5 Comutabilidade de um material de referência	32
2.6 Análise por ativação neutrônica (NAA)	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Planejamento experimental	39
3.2 Amostragem.....	39
3.3 Atividades laboratoriais	42
3.3.1 Encapsulamento.....	42
3.3.2 Irradiação.....	45
3.3.3 Detecção da atividade induzida	46
3.3.4 Determinações químicas.....	50
3.3.5 Controle da qualidade analítica	53
3.3.6 Análises estatísticas	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Leite desnatado x leite semidesnatado x leite integral	56
4.2 Leite em pó não-instantâneo x leite em pó instantâneo.....	59
4.3 Leite em pó enriquecido x leite em pó não-enriquecido	61
4.3.1 Leite em pó enriquecido com Fe x leite em pó não-enriquecido.....	61
4.3.2 Leite em pó enriquecido com Ca x leite em pó não-enriquecido	62
4.4 Análises multivariadas.....	62

4.4.1 Matriz de correlação	62
4.4.2 Análise de agrupamento	66
4.4.3 Análise de componentes principais.....	67
4.5 Controle da qualidade analítica	69
4.5.1 IAEA A-11	69
4.5.2 IAEA V-10	70
4.5.3 NIST SRM1549.....	72
5 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

O leite é classificado quimicamente como uma dispersão mista de aspecto branco, sabor levemente adocicado, constituído de gorduras em emulsão, proteínas em estado coloidal (caseína), carboidratos (lactose), sais (citratos), vitaminas B e C em solução, sendo a água o meio dispersante. Além da alta concentração de cálcio, contém micronutrientes, aminoácidos e ácidos graxos em proporções adequadas à nutrição humana. Apesar de ser considerado um alimento completo, o leite não possui quantidade suficiente de Fe para atender as exigências de uma nutrição completa (CQUALI, 2008).

Segundo a FAO (2016), até o final de 2016, a produção mundial de leite bovino atingirá a marca de 817 milhões de toneladas. No Brasil, o setor lácteo vem apresentando-se como uma atividade de impacto socioeconômico significativo. A cadeia produtiva do leite pode ser considerada uma das mais complexas e representativas do agronegócio brasileiro. Nos últimos anos, o Brasil conquistou importância entre os principais produtores de leite no mundo. Destaca-se o crescimento da demanda interna e aumento da produção acima da média mundial (IFCN, 2013). Dados do *United States Department of Agriculture* (USDA) demonstram que, em 2015, o Brasil ocupou a 6ª posição no ranking mundial de produção de leite com 26,3 milhões de toneladas, ficando atrás da União Europeia, Estados Unidos, Índia, China e Rússia, que são grandes produtores e importadores de lácteos. O relatório FAO - OCDE (2015) indicou que o Brasil, atualmente, é o segundo maior produtor de alimentos do mundo e que, em dez anos, poderá ser o número um no *ranking*. Assim sendo, observou-se que o agronegócio é um setor independente e que não foi afetado pela crise econômica que o país vem enfrentando. O relatório destacou, ainda, que o Brasil tem progredido de forma extraordinária na erradicação da fome e da pobreza.

Para atender o anseio de uma sociedade cada vez mais preocupada com a qualidade dos produtos que consome, assim como as exigências internacionais, a Rede Brasileira de Laboratórios Centralizados da Qualidade de Leite (RBQL) através do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, aprovou a Instrução Normativa nº 51 - IN51 (BRASIL, 2002). A IN51 contém os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e do transporte (BRASIL, 2002). Ao observar os limites máximos de eventuais resíduos químicos presentes no leite, a IN51 remete ao Plano Nacional de Controle

de Resíduos (PNCR), que por sua vez menciona a Resolução - RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013: Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos (As 0,05 mg/kg; Pb 0,02 mg/kg; Cd 0,05 mg/kg e Sn 250 mg/kg) (ANVISA, 2013).

O leite *in natura*, com aproximadamente 90% de água, é altamente perecível exigindo embalagem, transporte e estocagem especiais. Já o leite em pó possui maior estabilidade e facilidade de transporte, tornando-o um produto estratégico para o comércio nacional e internacional (VENTURINI et al., 2007). Em média, 100 litros de leite fluido produzem 13 kg de leite em pó integral ou 9 kg de leite em pó desnatado (LATICINIO.NET, 2016). O leite em pó é um dos principais lácteos concentrados produzidos no Brasil, apresentado na forma de pó particulado ou aglomerado (PERRONE et al., 2008). Mundialmente, dados fornecidos pela FAO (2016) estimam que, até o final de 2016, a produção de leite em pó seja de aproximadamente 2.518.000 de toneladas.

As medições químicas realizadas nos alimentos têm por finalidade avaliar a composição bem como verificar a qualidade e a segurança. Em termos mundiais, são feitas milhares de medições químicas com o propósito de tomada de decisões e regulamentações acerca da qualidade dos alimentos oferecidos à população mundial. Por essas razões, é essencial existir confiabilidade nos resultados de análises químicas, que devem ser exatos e precisos. A possibilidade de cometer erros grosseiros é elevada especialmente quando se quantificam elementos traços (DYBCZYNSKI, 2002).

Segundo a ABNT ISO/IEC 17025 (2006), para a garantia da rastreabilidade das medições, validação de métodos, incerteza de medição e controle da qualidade, recomenda-se que os laboratórios utilizem materiais de referência certificados, provenientes de um fornecedor competente, de forma a propiciar uma caracterização confiável de um material de matriz análoga. Mesmo havendo em uso milhares de materiais de referência certificados, ainda existe carência em algumas áreas estratégicas, como agricultura, saúde, ambiente e indústria (BOSSU et al., 2009). Ao utilizar um material de referência certificado, o usuário tem em mãos um meio de avaliar a exatidão e a precisão do método de medição, estabelecendo, assim, a rastreabilidade metrológica dos resultados obtidos (ABNT ISO GUIA 33, 2002).

Material de referência é um material suficientemente homogêneo e estável com referência a propriedades especificadas, que foi estabelecido para ser adequado ao uso pretendido na medição ou no exame de propriedades nominais. O material de referência

“certificado” possui as mesmas propriedades do material de referência, no entanto, vem acompanhado de documentação emitida por um órgão autorizado e fornecendo um ou mais valores de propriedade especificados com incertezas e rastreabilidade associadas, usando procedimentos válidos (VIM, 2012). Até a presente data, poucos são os materiais de referência certificados em elementos químicos disponíveis comercialmente para a matriz leite em pó, especialmente no Brasil que vem ocupando crescente posição de liderança na produção e comercialização, portanto, com a obrigatoriedade de demonstrar a qualidade do produto ofertado por meio de análises químicas confiáveis para driblar barreiras não tarifárias.

Neste contexto, este trabalho objetivou a caracterização química inorgânica de leite em pó bovino de diferentes tipos comercialmente disponíveis, com o propósito de fornecer subsídios para a produção de materiais de referência certificados dessa matriz alimentar. Assim sendo, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Selecionar os principais tipos e marcas de leite em pó bovino disponíveis para consumo, com vista à potencialidade como candidato à produção de material de referência;
- ✓ Proceder às análises químicas das amostras de leite em pó, empregando análise por ativação neutrônica instrumental (INAA);
- ✓ Analisar e correlacionar todas as variáveis determinadas utilizando ferramentas estatísticas;
- ✓ Identificar, as amostras de leite em pó de maior representatividade matriz/analito para a produção do material de referência certificado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O leite

Conforme o artigo 475 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), "*entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda*" (BRASIL, 1952).

O leite é uma emulsão de matéria gordurosa, em um líquido contendo numerosos elementos na forma coloidal e em suspensão, necessários à manutenção e ao desenvolvimento de um indivíduo, formando uma solução verdadeira (OLIVEIRA, 2009; ABREU, 2011).

Segundo Silva (1997), estima-se que o leite possua aproximadamente cem mil constituintes distintos, embora a maioria não tenha sido identificada. A qualidade nutricional do leite e derivados coloca este alimento entre um dos mais importantes na dieta humana, em especial na alimentação de crianças e jovens, levando em consideração que possuem maior necessidade de proteínas, vitaminas e ácidos graxos essenciais (CAMPOS; TREPTOW; SOARES, 1998).

O leite destaca-se por ser fonte de proteínas de alta qualidade, gorduras, carboidratos, além de ser rico em vitaminas e minerais, em especial o cálcio, cuja importância está relacionada com funções no organismo humano, pois contribui para a formação do tecido ósseo, promove o crescimento, regula o sistema nervoso e aumenta a resistência a infecções (TOMBINI et al., 2012). França e Martini (2014) descrevem o cálcio como o mineral de maior abundância no corpo humano, sendo fundamental na formação e mineralização dos ossos e dentes, e, ainda, regulando eventos intracelulares em vários tecidos. Em 2012, Zhu e Price publicaram uma revisão que a ingestão de cálcio, principalmente derivado de laticínio, pode fixar este mineral no esqueleto durante o crescimento chegando ao pico na fase adulta. Além disso, o cálcio é fundamental para outras funções no organismo, por exemplo, divisão celular, contração muscular, secreção de hormônios e coagulação do sangue (PASCHOAL et al., 2015).

O relatório do *Dietary Reference Intakes* (DRIs) estabeleceu recomendações diárias de ingestão adequada (IA) e limite superior tolerável (LST) de Ca, conforme a faixa etária e grupos de gestantes e lactantes. Essas informações podem ser observadas na Tabela 2.1 (IOM, 2011).

Tabela 2.1 - Recomendações de Ca, em mg/dia, conforme a faixa etária e grupos de gestantes lactantes, segundo DRIs.

Cálcio	LST (g)	IA (mg)	Cálcio	LST (g)	IA (mg)
Bebês			Crianças		
0-6 meses		210	1-3 anos	2,5	500
7-12 meses		270	4-8 anos	2,5	800
Gestantes			Lactantes		
< 18 anos	2,5	1300	< 18 anos	2,5	1300
19-30 anos	2,5	1000	19-30 anos	2,5	1000
31-50 anos	2,5	1000	31-50 anos	2,5	1000
Homens			Mulheres		
9-13 anos	2,5	1300	9-13 anos	2,5	1300
14-18 anos	2,5	1300	14-18 anos	2,5	1300
19-30 anos	2,5	1000	19-30 anos	2,5	1000
31-50 anos	2,5	1000	31-50 anos	2,5	1000
51-70 anos	2,5	1200	51-70 anos	2,5	1200
>70 anos	2,5	1200	>70 anos	2,5	1200

A constituição do leite é basicamente de lactose, gordura, proteínas e sais minerais, sendo um produto rico em vitaminas A, B e D. A vitamina A fortalece a visão e ajuda a combater infecções, a vitamina B ajuda no crescimento normal da criança e é essencial para a saúde da pele e a vitamina D ajuda no crescimento normal do esqueleto, evitando o raquitismo, sendo indispensável para a absorção de cálcio e fósforo no organismo. Um litro de leite integral fornece cerca de 620 kcal, equivalendo energeticamente a 9 ovos de galinha, 625 g de frango, 600 g de carne bovina ou 1162 g de peixe (INMETRO, 1998). O leite contém,

ainda, teores consideráveis de cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio e baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês (SILVA, 1997).

A produção de lácteos dos países Argentina, Austrália, Belarus, Brasil, Canadá, China, União Europeia, Índia, Japão, Coréia, México, Nova Zelândia, Rússia, Taiwan e Ucrânia é voltada, principalmente, para atender o mercado interno que é de grande proporção (USDA, 2016). Observa-se nas Figuras 1.1 e 1.2 que tanto a produção como o consumo de leite fluido no Brasil aumentaram gradativamente nos últimos 4 anos (USDA, 2016).

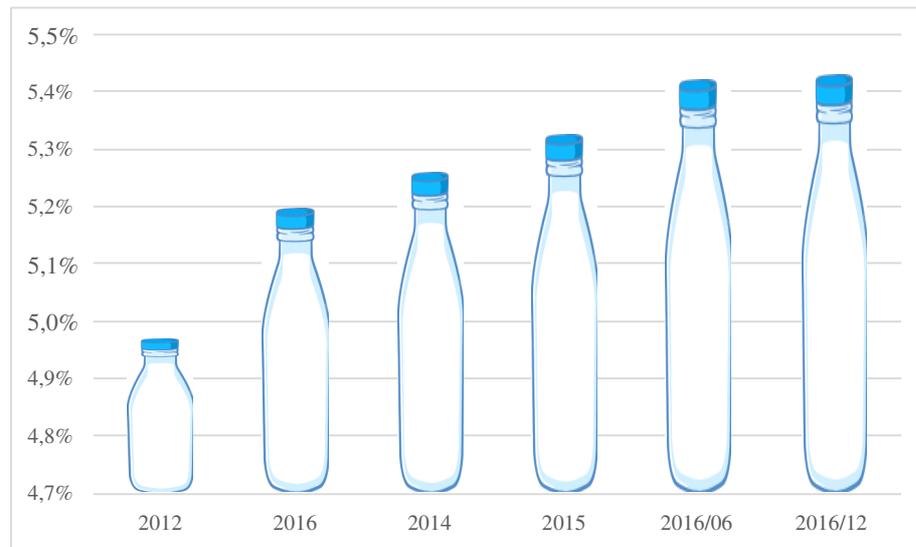


Figura 1.1 - Crescimento da produção de leite bovino nos últimos 4 anos no Brasil (USDA, 2016).

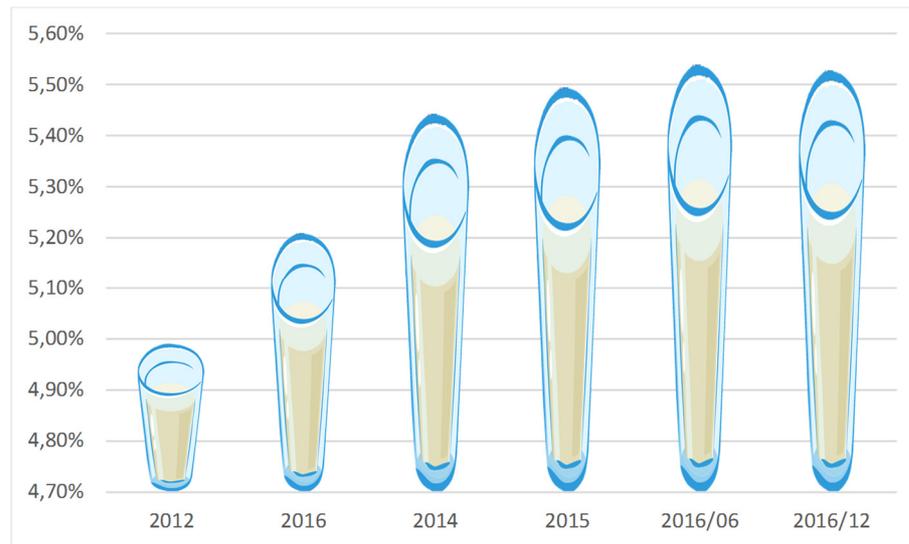


Figura 1.2 - Crescimento do consumo de leite bovino nos últimos 4 anos no Brasil (USDA, 2016).

Segundo o *International Dairy Federation* (IDF), o setor lácteo é uma indústria global dinâmica que, desde o ano de 2000, vem crescendo de maneira estável cerca de 2,5% ao ano. Estima-se, também, que o consumo de lácteos aumentará em 20% ou mais até 2021 (IDF, 2013).

Na Tabela 2.2, constam informações do “Guia Alimentar do Ministério da Saúde”, que recomenda o consumo diário de três porções (360 kcal) de leite e derivados, sendo que esta quantia atende as necessidades diárias de cálcio (BRASIL, 2005). É interessante que adultos, sempre que possível, consumam leite e derivados menos gordurosos. Crianças, adolescentes e mulheres gestantes devem consumir leite e derivados integrais (PHILIPPI, 2014).

Tabela 2.2 - Recomendação calórica média (kcal), número de porções diárias e valor energético médio das porções (kcal).

Grupo de alimento	Recomendação calórica média do grupo	Número de porções diárias	Valor energético médio por porção
Leite e derivados	360	3	120

2.2 Leite em pó

A secagem por desidratação é a forma mais antiga de preservar alimentos, sendo um meio econômico que possibilita evitar a deterioração e facilitar o armazenamento, o transporte e, até mesmo, a distribuição. No livro “*The Travels of Marco Polo*” (POLO; KOMROFF, 2003), está relatado que o povo Mongol, em meados de 1235, carregava nas viagens leite desnatado desidratado ao sol como um tipo de pasta. Estima-se, assim, que foram os mongóis que introduziram a secagem do leite como forma de conservação para as grandes viagens. A durabilidade do leite é comprometida e limitada devido à presença de microrganismos que se multiplicam causando modificações físico-químicas. Campos, Treptow e Soares (1998) ressaltam que o leite, além de ser altamente perecível, é um produto sujeito a entressafra entre os meses de maio e agosto, quando o volume produzido pode reduzir em até 35 %.

A estabilidade do leite em pó integral se deve à proteção dos glóbulos de gordura por uma camada de lactose, o que evita o contato com oxigênio, além da formação de antioxidantes durante a secagem à temperatura elevada. No geral, a estabilidade do leite em pó integral é comprometida pela proximidade de metais com os lipídeos. O leite em pó desnatado não apresenta problemas oxidativos, em virtude da remoção de lipídeos durante o processamento, podendo ser armazenado à temperatura ambiente por período acima de um ano (ARAÚJO, 2011). Na Tabela 2.3, constam as informações referentes à classificação do leite segundo a quantidade de gordura, expressa em % (m/m), segundo a Portaria N° 369 de 04 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997).

Tabela 2.3 - Classificação do leite em pó em função do teor de gordura, expresso em % (m/m), segundo a Portaria N.º 369 de 04 de setembro de 1997.

Tipo	Teor de gordura
Integral ou gordo	≥ 26
Semidesnatado	1,5 - 25,9
Desnatado	< 1,5

O consumidor anseia por um leite em pó facilmente solúvel que, após dissolução, apresente características sensoriais do leite *in natura*. O leite em pó instantâneo visa atender esses consumidores, que são mais exigentes quanto à praticidade e à qualidade. Diversos fatores estão relacionados com a obtenção de leite em pó instantâneo, dentre os quais destacam-se gordura livre, densidade da partícula, aglomeração, intensidade do tratamento térmico, presença de lactose amorfa, retorno de finos para câmara de secagem, tipo de atomizador e equipamento de secagem empregado (PERRONE et al., 2008).

2.3 Controle da qualidade dos alimentos

Mundialmente, os consumidores estão cada vez mais à procura de informações sobre os alimentos que consomem. Santos (2000) destaca que o consumidor está mais atento à cadeia de produtos lácteos, exigindo produtos alimentícios seguros e de alta qualidade, preocupando-se, ainda, com a saúde e bem-estar dos animais que produzem o leite. Análises confiáveis de leite em pó são essenciais tanto para avaliar a qualidade como para garantir a segurança (ERM, 2013).

A rotulagem é uma ótima fonte de informação nutricional que está disponível ao consumidor. No Brasil, existem regulamentações técnicas para as informações dos alimentos, citando-se, como exemplo, os alimentos *diets* - Portaria N° 29/1998 (ANVISA, 1998) e *lights* - Resolução RDC N° 54/2012 (ANVISA, 2012). Também é comum encontrar nos rótulos informações sobre a presença de determinadas substâncias, como o glúten, regulamentado pela Lei n° 10.674, de 16 de maio de 2003, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Apesar de tais informações e outras estarem disponíveis no rótulo, nem sempre o consumidor possui esclarecimento suficiente para entender o significado de alguns termos, o que pode levar a um uso incorreto do alimento. De acordo com o item 3, do artigo 6° da Lei 8078/90 (Código de Proteção e Defesa do Consumidor), é por meio do rótulo dos alimentos que se tem acesso a informações como quantidade, características nutricionais, composição, qualidade e riscos que os produtos poderiam apresentar.

Derivados do leite bovino possuem uma forte importância social e econômica no mercado de produtos lácteos, havendo alto risco de manipulação fraudulenta neste setor, como, por exemplo, a substituição de leite por soro (SANTOS, 2009).

As medições químicas realizadas nos alimentos visam avaliar composição e verificar qualidade e segurança. Em todo o mundo, são realizadas milhares de medições químicas com o propósito de tomada de decisões e regulamentações da qualidade dos alimentos oferecidos à população mundial. Por essas razões, é essencial existir confiabilidade nos resultados de análises químicas, que devem ser exatos e precisos.

2.4 Materiais de referência

O próprio nome “Material de Referência” já dá indicação da utilidade, ou seja, atua como referência de um resultado em uma análise. É sabida a importância de utilizar um material de referência certificado no desenvolvimento e execução de um método analítico.

A função do material de referência certificado é essencialmente deter valores certificados de uma ou mais grandezas, associados a incertezas, de um determinado material. A relevância deste papel é incontestável, contudo, o grande desafio recai na indisponibilidade de material de referência certificado para atender as demandas de todos os setores. Os materiais de referência certificados reduzem perdas causadas por resultados analíticos incorretos, pois permitem a verificação da exatidão das medições (HERZIG et al., 2002).

Na química analítica, os materiais de referência certificados são fundamentais para estabelecer a rastreabilidade, assegurando confiabilidade e exatidão aos resultados de medição, dando credibilidade aos resultados de análises químicas quantitativas, garantindo a comparabilidade dos resultados nos programas de controle da qualidade em laboratórios (BOSSU et al., 2009).

Segundo o VIM (2012), rastreabilidade metrológica pode ser definida como a *“propriedade dum resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através duma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição”*.

A *International Organization for Standardization - ISO/IEC 17043* (2010) define as comparações interlaboratoriais como organização, desempenho e avaliação de medidas ou

testes com os mesmos itens ou similares, por dois ou mais laboratórios de acordo com condições predeterminadas, com a finalidade de comparar os laboratórios de análises, bem como avaliar os métodos e padrões. A preparação de materiais de referência é dada pelos Guias ISO 31, 32, 33, 34 e 35, descritos na Figura 2.1.

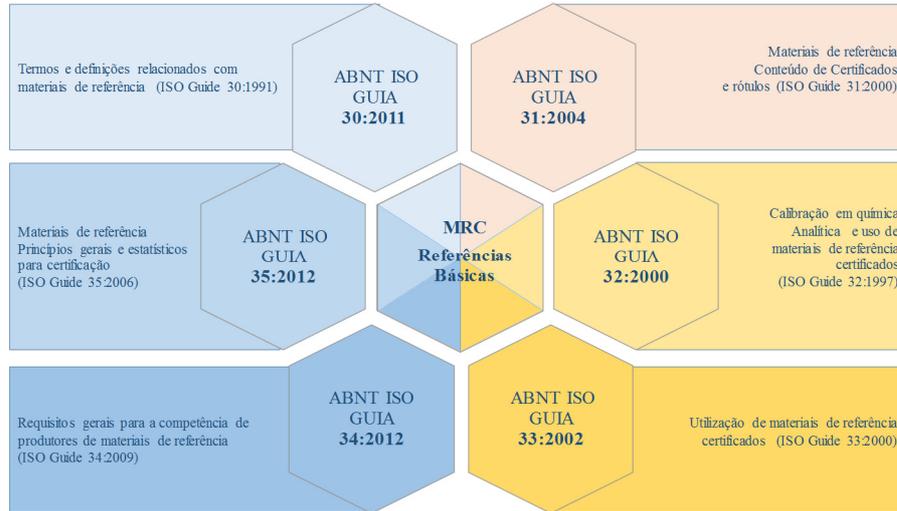


Figura 2.1 - Atribuições para o preparo de material de referência segundo ISO Guides 30,31, 32, 33, 34 e 35.

Na Figura 2.2, pode ser observado o fluxograma das diversas aplicações dos materiais de referência.

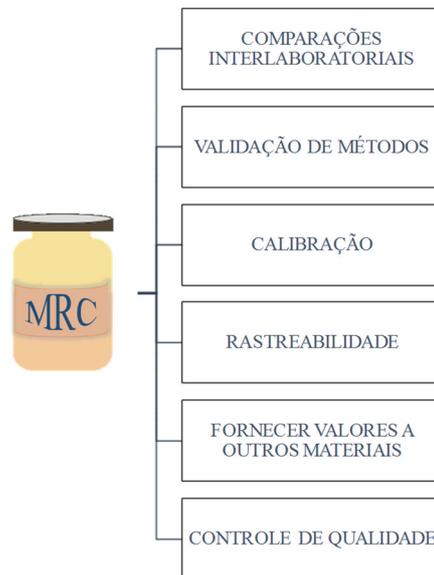


Figura 2.2 - Aplicações dos MRC. ISO Guides 30,31, 32, 33, 34 e 35.

Acessando-se a base de dados internacional *Code of Reference Materials* – COMAR (<http://www.comar.bam.de>), verifica-se que há aproximadamente 11 mil materiais de referência registrados. Destes, apenas 19 registros são de materiais de referência de leite em pó, sendo que 2 materiais de referência (ERM-BD 150 e ERM-BD 151) são destinados ao controle de alguns elementos inorgânicos (Tabela 2.4). Os países produtores desta matriz são Bélgica (*Institute for Reference Materials and Measurements* – IRMM); China (*Institute of Measurements and Testing Technology* – SIMT), Japão (*National Metrology Institute of Japan* – NMIJ) e Alemanha (Laboratório *Muva Kempten* – MUVA) (COMAR, 2014).

Fora dos registros da COMAR, pode ser encontrado outro material de referência certificado da matriz leite em pó, produzido pelo *National Institute of Standards and Technology* - NIST, Estados Unidos, comercialmente identificado por "*Whole Milk Powder*" - SRM 1549a. Diferentemente de sua primeira versão ("*Whole Milk Powder*" - SRM 1549), o SRM 1549a possui certificação de outros parâmetros, incluindo algumas análises centesimais (NIST, 2016).

A atividade de produção de material de referência certificado é complexa, demorada e de elevado custo. Requer atenção e supervisão constante de especialistas, já que

qualquer erro em algum dos processos envolvidos pode reduzir drasticamente as chances de sucesso (RICHTER, 1999; EAG DG RTD, 2000; DYBCZYNSKI, 2002).

Em 2012, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz) realizou oficina de trabalho intitulada “Resíduos de Contaminantes em Alimentos e outros itens de Interesse para o Controle de Qualidade em Saúde: Elaboração de uma agenda para a oferta nacional de Ensaios de Proficiência e Materiais de Referência para o ano de 2013-2015” (ANVISA, 2012). A principal conclusão do evento que serviu de alerta a toda comunidade está transcrita: "Evidenciou-se uma vasta necessidade de oferta de ensaios de proficiência e de materiais de referência para atender às necessidades dos sistemas da qualidade implantados em laboratórios públicos e privados nacionais".

O Centro de Energia Nuclear na Agricultura tem se envolvido com metrologia em química há várias décadas, com desenvolvimento de métodos analíticos avançados e de materiais de referência voltados à agricultura e ao ambiente. A primeira atividade de destaque foi a elaboração de um material de referência de farinha de soja (IAEA-361) para a certificação de concentrações de elementos químicos, em projeto financiado pela IAEA e conduzido pelo Laboratório de Química Analítica do CENA em 1991/1992.

Tabela 2.4 - Relação de materiais de referência certificados de leite em pó (MRC), com breve descrição (Descrição), ano de fabricação (Ano) e país produtor (País) (COMAR, 2014).

MRC	Descrição	Ano	País
BCR-187	Pesticides in natural milk powder	1989	Bélgica
BCR-188	Pesticides in milk powder	1989	Bélgica
BCR-450	Polychlorinated biphenyls (pcbs) in natural milk powder	1993	Bélgica
BCR-528	Bacillus cereus in milk powder; ISO 7932; method no. L00.00-25	1994	Bélgica
BCR-607	Polychlorodibenzo-p-dioxins and polychlorobibensofurans (pcdfs)	1997	Bélgica
BCR-685	Skim milk powder certified for its content of crude protein and fat	2008	Bélgica
CRM 2577-12	¹³⁷ Cs e ⁴⁰ K in milk powder	2012	Bélgica
ERM-BD150	Trace elements in skimmed milk powder	2013	Bélgica
ERM-BD151	Trace elements in skimmed milk powder	2013	Bélgica
ERM-BD-282	Aflatoxin m1 in whole milk powder zero level	2001	Bélgica
ERM-BD-283	Aflatoxin m1 in whole milk powder low level	2001	Bélgica
ERM-BD-284	Aflatoxin m1 in whole milk powder high level	2002	Bélgica
ERM-BD600	Wole milk powder	2011	Bélgica
GBW-08509	Non fat milk powder for use in chemical analysis	1992	China
MUVA-MP-0203	Milk powder, roller dried; food	2010	Alemanha
MUVA-MP-0204	Spray dried skimmed milk powder; food; nitrate	2011	Alemanha
MUVA-MP-0205	Spray dried milk powder; food	2011	Alemanha
MUVA-MP-0206	Spray dried milk powder (fat reduced); food; nitrate	2011	Alemanha
NMIJ-7512A	NMIJ CRM 7512-a trace elements in milk powder	2012	Japão

Além da preocupação com a implementação de princípios de qualidade e metrologia, houve também a capacitação para o desenvolvimento de materiais de referência, pela produção de um material de referência de café, em projeto de pós-doutoramento, projeto fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP). Participou-se, ainda, de projeto da IAEA (INT/1/054), realizado entre 2003 e 2004, que visou o estabelecimento de competências na preparação de materiais de referência e na organização de ensaios de proficiência. Esse projeto envolveu a realização de diversos workshops, bem como a organização completa de um ensaio de proficiência, desde a produção do material teste até a avaliação dos resultados.

Ainda, nesse contexto, destaca-se o projeto intitulado Centro Colaborador em Defesa Agropecuária: Produção de Materiais de Referência Certificados e Organização de Ensaio de Proficiência para Resíduos e Contaminantes Inorgânicos" (578765/2008-0), fomentado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Agricultura da Pecuária e Abastecimento (MAPA), que teve como objetivo produzir materiais de referência certificados de matrizes biológica e geológica no âmbito agrícola, a saber: quatro tecidos e/ou produtos de origem animal, ou seja, sangue de caprinos, músculo, rim e fígado; quatro materiais de insumos agropecuários, ou seja, adubo fosfatado, forragem, concentrado e mistura mineral usados em alimentação animal e dois de produtos de origem vegetal, ou seja, arroz e tomate - em parceria com o Laboratório de Ciências Exatas (LCE) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), ambos da Universidade de São Paulo (USP), e Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

O grupo tem atuado no principal fórum metrológico mundial, o Consultative Committee for Amount of Substance – Metrology in Chemistry and Biology (CCQM) desde 2001, por meio de presença constante e efetiva no Inorganic Analysis Working Group (IAWG). Nesse período, houve participação em 14 exercícios metrológicos do CCQM, como seguem:

- ✓ CCQM-P11 - *Arsenic in shellfish*, NIST-USA, 2001;
- ✓ CCQM-P29 - *Cadmium and zinc amount content in rice*, IRMM-Europe, 2001;
- ✓ CCQM-K31 - *Arsenic in shellfish*, NIST-USA, 2002;
- ✓ CCQM-P39 - *Hg, Pb, Se, and As in tuna fish*, IRMM-Europe, 2003;
- ✓ CCQM-P56 - *Determination of minor elements in steel*, NMIJ-Japan, 2004;
- ✓ CCQM-P34.1 - *Allowing additions in aluminium*, BAM-Germany, 2004;
- ✓ CCQM-P39.1 - *As, Hg, Pb and Se in salmon*, IRMM-Europe, 2004;
- ✓ CCQM-P65 - *Chemical composition of clay*, CENAN-Mexico, 2004;
- ✓ CCQM-P70 - *Trace elements in sewage sludge*, IRMM-Europe, 2005;
- ✓ CCQM-P66 - *Metal in fertilizer*, NIST-USA, 2005;
- ✓ CCQM-P85 - *Essential and toxic elements in bovine liver*, NIST-USA, 2006;

- ✓ CCQM-P64.1 - *Whole fat soybean*, NIM-China, 2007;
- ✓ CCQM-P65.1 - *Chemical composition of clay*, CENAN-Mexico, 2007;
- ✓ CCQM-K43.1 - *Marine fish*, NMIJ-Japan, 2007;
- ✓ CCQM-P126 - *Trace and Essential Elements in Herba Ecliptae*, GL, China, 2011.

2.5 Comutabilidade de um material de referência

A terminologia “comutabilidade” inicialmente foi utilizada como definição da capacidade de se possuir propriedade de intercomparação em materiais de referência, de calibração ou de controle, demonstrada por amostras clínicas autênticas, quando medidas por mais de um sistema analítico (REJ, 1993; RICOS et al., 1997). No entanto, documentos da *International Standardization Organization* (ISO) ampliaram este conceito, definindo comutabilidade como a equivalência das relações matemáticas entre os resultados de diferentes sistemas analíticos de medida, para um material de referência e um determinado analito de determinada amostra (MILLER et al., 2009).

No Manual do Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos de 2007 (PALC, 2007), comutatividade ou comutabilidade (do inglês *commutability*) foi definida como a capacidade demonstrável estatisticamente ou de outra forma de que dois ou mais sistemas analíticos geram, para as mesmas amostras de pacientes, resultados clinicamente equivalentes. Na versão 2010 da norma PALC, este conceito passa a ser atribuído ao termo equivalência.

Em 2012, o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012) publicou que a comutabilidade de um material de referência é demonstrada pelo grau de concordância entre a relação dos resultados da medição de um determinado material, obtido de acordo com dois procedimentos de medição de dados, bem como a relação obtida entre os resultados da medição para outros materiais especificados. O material de referência em questão é geralmente um calibrador e os outros materiais referidos são geralmente amostras de rotina. A estabilidade do material de referência comutável deve ser monitorada regularmente.

A comutabilidade objetiva verificar se os resultados entre os diferentes sistemas analíticos são concordantes ou equivalentes, assim os resultados dos sistemas, métodos ou instrumentos testes não devem se desviar dos resultados do sistema, método ou instrumento

referência mais que os valores definidos pelo controle da qualidade analítica para erro aleatório (precisão), erro sistemático (bias ou exatidão) e erro total (ET). A precisão do sistema analítico é a capacidade de, em determinações repetidas de uma mesma amostra, fornecer resultados próximos entre si. A exatidão é a capacidade de apresentar resultados próximos do valor verdadeiro. Já ET representa a soma dos erros aleatório e sistemático (CLSI, 2001).

2.6 Análise por ativação neutrônica (NAA)

Há aproximadamente 80 anos, utilizou-se pela primeira vez da análise por ativação neutrônica (NAA). Desde o surgimento, ela vem amadurecendo como técnica analítica, tendo o auge nas décadas de 70 e 80 devido, principalmente, a dois grandes feitos históricos. Nas décadas de 50 e 60, houve o surgimento e a disseminação dos reatores nucleares de pesquisa. Na década de 70, os detectores de germânio se tornaram populares, o que possibilitou a NAA se tornar uma técnica analítica multielementar como é conhecida atualmente.

Na Figura 2.3, é possível observar o efeito da baixa resolução na quantificação de grande número de fotopicos (ORTEC, 2016). A mesma fonte emissora foi avaliada por três tipos de detectores sólidos, compostos de materiais diferentes, ou seja, cristal de iodeto de sódio (NaI), brometo de lantânio (LaBr_3) e germânio hiperpuro (HPGe).

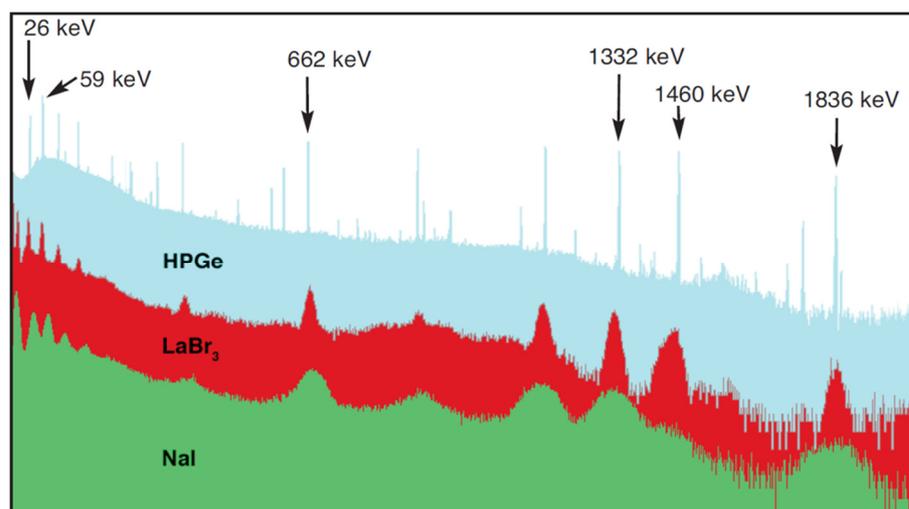
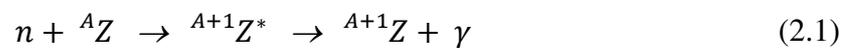


Figura 2.3 - Comparação de espectros eletromagnéticos originados pela detecção da radiação proveniente da mesma fonte emissora, por três tipos de detectores de estado sólido.

O princípio fundamenta-se na utilização de reações nucleares para a produção de radionuclídeos ou estados excitados de núclídeos estáveis que se deseja quantificar através do bombardeamento das amostras, seja por nêutrons, partículas carregadas ou fótons. Porém, por tratar-se da análise por ativação neutrônica (NAA), focar-se-á aqui somente no bombardeamento por nêutrons. Segundo Alfassi (1994a), quando um nêutron colide com um núcleo atômico, diversos tipos de reações podem ocorrer, porém a mais encontrada em NAA é a captura radioativa, que é regida pela Equação 2.1.



Onde:

n	Nêutron
A_Z	núcleo alvo
${}^{A+1}_Z^*$	núcleo gerado instável
${}^{A+1}_Z$	núcleo gerado estável
γ	raio gama

Atenção especial deve ser dada às inúmeras formas de interferências espectrais que podem ocorrer na NAA. Dependendo da energia do nêutron que incide no núcleo alvo, ${}^{28}\text{Al}$ pode ser originado de três maneiras, ou seja, de ${}^{27}\text{Al}$, ${}^{28}\text{Si}$ e ${}^{31}\text{P}$. Radionuclídeos podem emitir raios gama de mesma energia (${}^{203}\text{Hg}$ e ${}^{75}\text{Se}$) (SANTOS, 2004) e próximos como acontece em ${}^{65}\text{Zn}$ (1115 keV) e ${}^{46}\text{Sc}$ (1120 keV) (VIDAL et al., 2015). Greenberg, Bode e Fernandes (2011) descreveram as características que possibilitaram tornar a NAA um método primário, como também outras condições de interferências espectrais.

Uma das formas de classificação da NAA é considerar o tratamento químico. Com esse critério, pode-se dividi-la em três grupos distintos (Figura 2.4). Se não houver qualquer tipo de tratamento químico, tem-se a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA - *Instrumental Neutron Activation Analysis*). Se o tratamento químico for antes da irradiação, tem-se a análise por ativação neutrônica química (CNAA - *Chemical Neutron*

Activation Analysis) e se for após a irradiação, tem-se a análise por ativação neutrônica radioquímica (RNAA - *Radiochemical Neutron Activation Analysis*) (EHMANN; VANCE, 1991).

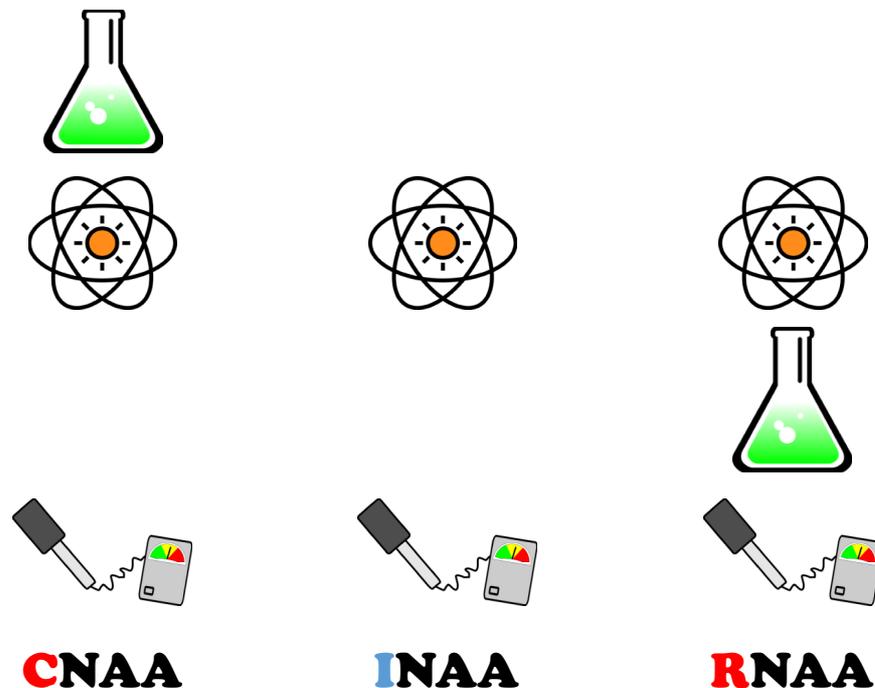


Figura 2.4 - Classificação da NAA considerando a presença ou não de tratamento químico.

A NAA também pode ser classificada de acordo com a energia dos nêutrons que incidem nos núcleos alvos. A ativação geralmente é feita com nêutrons térmicos (energia de aproximadamente 0,025 eV), por se tratar de uma energia que favorece o maior número de reações nucleares e alta probabilidade de geração de radionuclídeos. Porém, também podem ser empregados nêutrons epitérmicos (energia entre 0,1 eV a 1 MeV) e rápidos (energia acima de 1 MeV) (ALFASSI, 1994b).

As determinações químicas pela NAA são diretamente proporcionais às radiações gama emitidas pelos radionuclídeos presentes nas amostras, cuja ativação foi realizada pelo bombardeamento de nêutrons (EHMANN; VANCE, 1991). Elas podem ser realizadas de três maneiras. A primeira, menos utilizada devido à complexidade da determinação exata de todos

os parâmetros nucleares envolvidos na equação fundamental (Equação 2.2), é conhecida como paramétrico ou absoluto (PARRY, 1991).

$$A = \left(\frac{m}{M} \right) \cdot \theta \cdot N_A \cdot \phi \cdot \sigma \cdot \gamma \cdot \varepsilon \cdot S \cdot D \cdot C \quad (2.2)$$

Onde:

A	taxa de contagem do raio gama
m	massa do elemento
M	massa atômica do elemento
θ	abundância isotópica
N_A	número de Avogrado
ϕ	fluxo de nêutrons
σ	seção de choque efetiva da reação
γ	intensidade de emissão do raio gama
ε	eficiência detecção do raio gama
S	fator de saturação
D	fator de decaimento
C	fator de medição

A segunda, conhecida como método comparativo (Equação 2.3), necessita irradiar padrões dos elementos químicos de interesse conjuntamente com as amostras, assumindo condições de irradiação similares para amostras e padrões (EHMANN; VANCE, 1991).

$$\frac{R_{std}}{R_{sam}} = \frac{W_{std}(e^{-\lambda.T_{std}})_{std}}{W_{sam}(e^{-\lambda.T_{sam}})_{sam}} \quad (2.3)$$

Onde:

std	índice para padrão
sam	índice para amostra
R_{std}	taxa de contagem do padrão
R_{sam}	taxa de contagem da amostra
W_{std}	massa do padrão
W_{sam}	massa da amostra
T_{std}	tempo decaimento do padrão
T_{sam}	tempo de decaimento da amostra
λ	constante de decaimento

Mesmo considerando a maior facilidade algébrica da Equação 2.3 se comparada à Equação 2.2, há de se considerar também que o método comparativo possui a alta complexidade laboratorial e elevado custo operacional. Dessa forma, a utilização de um fator simples que substituísse os parâmetros nucleares envolvidos, diminuísse a quantidade de atividades laboratoriais e, conseqüentemente, reduzisse as incertezas analíticas foi sempre almejada. Diversos métodos surgiram em que se empregava um único elemento como comparador único. Neste escopo, surgiu o método *ko*. Em sua publicação, De Corte (2001) indica a equação geral para obtenção das frações de massa de um elemento químico (ρ_a), conforme adaptação indicada na Equação 2.4.

$$\rho_a = \frac{\left(\frac{N}{W \cdot t \cdot S \cdot D \cdot C}\right)_a}{A_{Au}} \frac{1}{k_{0,Au}(a)} \left(\frac{f + Q_{0,Au}(\alpha)}{f + Q_{0,a}(\alpha)}\right) \frac{\varepsilon_{Au}}{\varepsilon_a} \quad (2.4)$$

Onde:

- a índice para analito
- Au índice para comparador (ouro)
- ρ_a concentração de um elemento
- N área do fotopico de interesse
- W massa da amostra
- t tempo de medição da amostra
- S fator de saturação
- D fator de correção de decaimento radioativo para tempo zero
- C fator de correção de decaimento radioativo durante a contagem
- A taxa de contagem específica
- ε eficiência de detecção do fotopico
- f razão entre fluxo de nêutrons térmico e epitérmico
- Q_0 integral de ressonância
- α parâmetro de distribuição de energia dos nêutrons epitérmicos

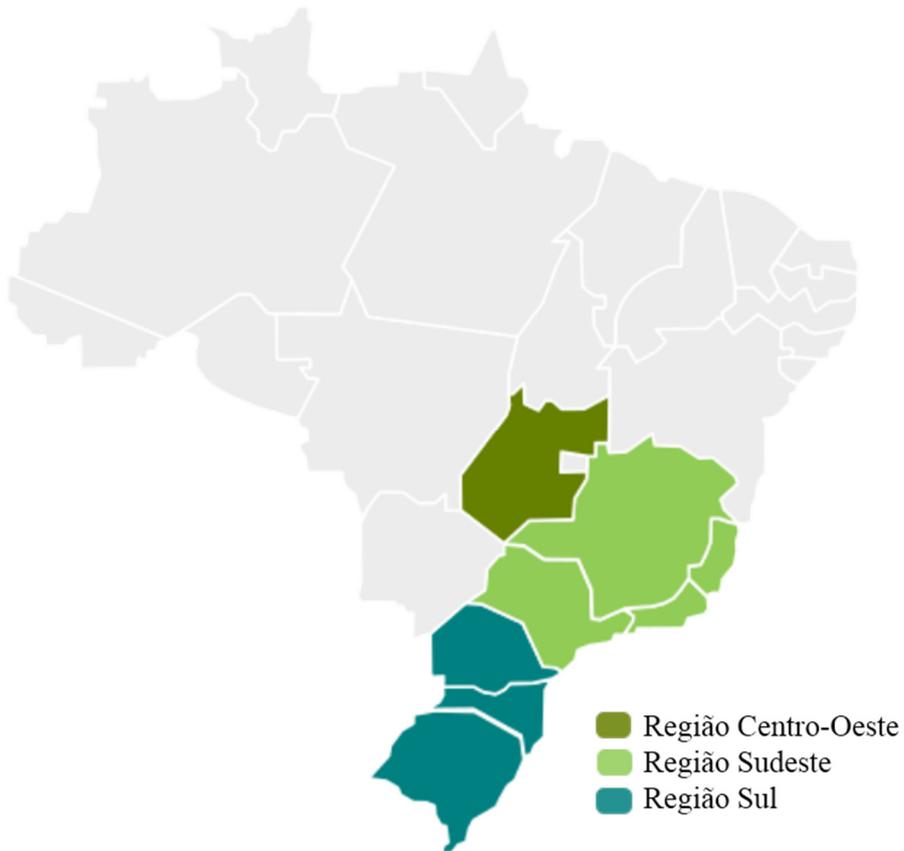
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Planejamento experimental

Como atividade inicial deste projeto, foi realizado minucioso levantamento dos principais tipos e marcas de leite em pó bovino disponíveis no mercado para consumo, inicialmente por meio eletrônico e depois por visitas a estabelecimentos comerciais principalmente da cidade de Piracicaba – SP. Para a seleção dos leites a serem amostrados, foram levadas em consideração as “Informações Nutricionais” contidas nos rótulos, local de produção e envase. Ainda nessa etapa de planejamento, definiu-se pela coleta de três amostras de cada tipo e marca de leite, de diferentes lotes ou datas de produção.

3.2 Amostragem

As amostras de leite em pó adquiridas no mercado varejista foram de sete estados brasileiros indicados na Figura 3.1. Doze marcas de leite em pó compreendendo as categorias integral, desnatado, semidesnatado e instantâneo foram amostradas, totalizando 72 amostras, ou seja, 24 amostras em triplicata. Informações pormenorizadas constam na Tabela 3.1, onde é possível identificar os componentes adicionados aos leites enriquecidos, além de codificação e estado (UF) de origem. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Radioisótopos (LRi/CENA/USP), sendo que, na recepção, criou-se um banco de dados para garantir a rastreabilidade. Nesse banco de dados, foram inseridas todas as informações nutricionais contidas no rótulo das embalagens, como tipo, designação comercial, local de envase, data de fabricação e data de validade. Na sequência, deu-se início às atividades inerentes à quantificação química por meio da análise por ativação neutrônica instrumental (INAA).



Região Centro-Oeste



Goiás

Região Sudeste



Minas Gerais



Rio de Janeiro



São Paulo

Região Sul



Paraná



Rio Grande do Sul



Santa Catarina

Figura 3.1 - Estados de origem das amostras de leite em pó.

Tabela 3.1 - Amostras de leite em pó adquiridas no comércio varejista, apresentando o tipo (integral, desnatado e semidesnatado), designação comercial (não-instantâneo e instantâneo) além de códigos de identificação e estado (UF).

	Codificação	Tipo	Designação Comercial	Aditivos	UF
1	DES-01	Desnatado	Instantâneo	Ca; Vit. D	SP
2	DES-02	Desnatado	Instantâneo	Zero gordura	RJ
3	DES-03	Desnatado	Instantâneo	Vit. A, C e D	SP
4	DES-04	Desnatado	Instantâneo	Fe; Fit Zero; Vit. A, C e D	MG
5	SDES-01	Semidesnatado	Instantâneo	50% menos gordura	RJ
6	SDES-02	Semidesnatado	Instantâneo	Vit. A, C e D	MG
7	INT-C01	Integral	Não-instantâneo	Fe; Vit. A, C, D	MG
8	INT-C02	Integral	Não-instantâneo	Vit. A e D	SP
9	INT-C03	Integral	Não-instantâneo	-	GO
10	INT-C04	Integral	Não-instantâneo	-	SC
11	INT-C05	Integral	Não-instantâneo	-	GO
12	INT-C06	Integral	Não-instantâneo	-	PR
13	INT-C07	Integral	Não-instantâneo	-	MG
14	INT-C08	Integral	Não-instantâneo	Fe; Vit. A, C e D	MG
15	INT-C09	Integral	Não-instantâneo	Vit. A e D	MG
16	INT-C10	Integral	Não-instantâneo	-	RS
17	INT-I11	Integral	Instantâneo	Fe; Vit. A, C e D	MG
18	INT-I12	Integral	Instantâneo	-	RJ
19	INT-I13	Integral	Instantâneo	Fe; Vit. A, C e D	MG
20	INT-I14	Integral	Instantâneo	Vit. A e D	SP
21	INT-I15	Integral	Instantâneo	-	PR
22	INT-I16	Integral	Instantâneo	Vit. A, C e D	SC
23	INT-I17	Integral	Instantâneo	-	RS
24	INT-I18	Integral	Instantâneo	-	RS

3.3 Atividades laboratoriais

As atividades laboratoriais envolvidas na determinação dos elementos químicos de interesse nas amostras de leite em pó podem ser divididas, basicamente, entre atividades pré-irradiação e atividades pós-irradiação, sumarizadas na Figura 3.2 e detalhadas na sequência.

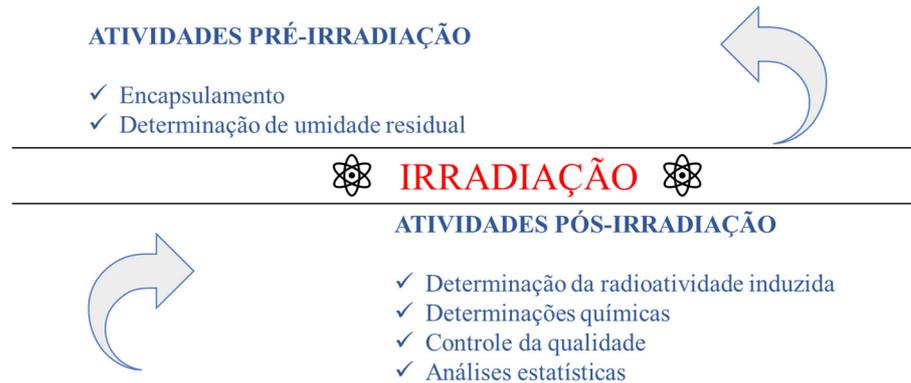


Figura 3.2 - Distribuição das atividades laboratoriais em função da irradiação.

3.3.1 Encapsulamento

Devido às características de granulometria e umidade, as amostras de leite em pó não necessitaram de processamento. Assim, porções analíticas de aproximadamente 300 mg foram acondicionadas diretamente em cápsulas de polietileno de alta pureza (tipo W - 12 mm de altura e 6 mm de diâmetro), confeccionadas pela *Posthumus Plastics*, Amsterdã, Holanda (Figura 3.3). Após o preenchimento e pesagens necessárias, ou seja, tara e massa total, para posterior determinação da massa líquida, as cápsulas foram seladas com bastão de quartzo incandescente, garantindo assim a integridade das porções analíticas contidas em seu interior durante a irradiação com nêutrons.



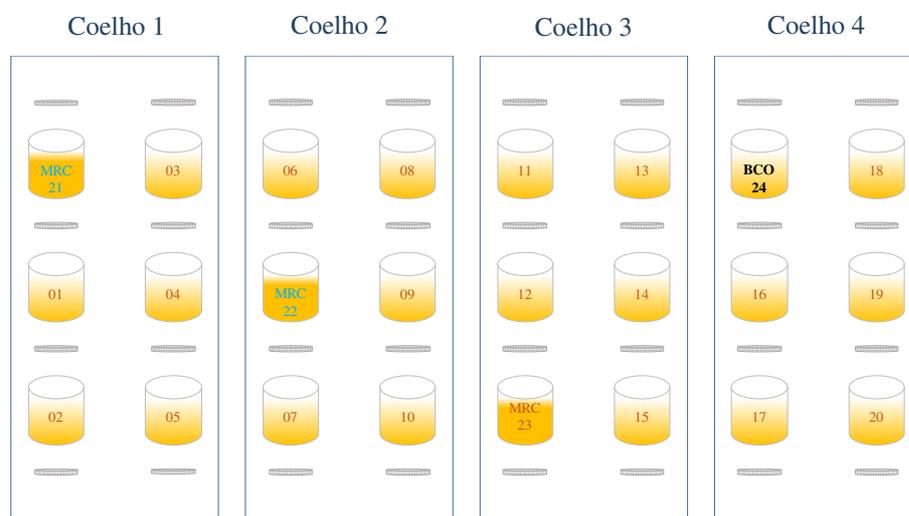
Figura 3.3 - Acondicionamento das amostras em cápsulas de polietileno de alta pureza.

Outras porções de aproximadamente 2,5 g foram destinadas à determinação da umidade residual, utilizando-se do protocolo de secagem por aquecimento com infravermelho para a matriz “leite em pó”, do determinador de umidade Mettler-Toledo HB43-S (Figura 3.4). Nesse protocolo, há um aquecimento a 110 °C por 6 - 7 minutos (METTLER-TOLEDO, 2008). Nesta fase, as alíquotas foram retiradas diretamente das embalagens comerciais e lacradas novamente para posterior armazenamento em armário, com baixa luminosidade, umidade e temperatura ambiente.

Entre as cápsulas, foram colocados fragmentos de aproximadamente 10 mg de fios de liga de Ni-Cr com fração de massa de Cr de $19,62 \pm 0,07 \%$ (FRANÇA; FERNANDES; BACCHI, 2003) para monitorar o fluxo de nêutrons térmicos durante a irradiação. Materiais de referência certificados foram incluídos nos lotes (Tabela 3.2) para controle da qualidade analítica e cápsulas vazias como branco analítico. Uma ilustração dos itens indicados anteriormente pode ser observada na Figura 3.5, sendo que o termo “coelho” se refere ao nome usualmente dado ao recipiente de alumínio contendo as amostras, que é lacrado e submergido na piscina do reator nuclear.



Figura 3.4 - Determinador de umidade utilizado na determinação de umidade residual, com aquecimento por infravermelho.



20 amostras; 3 Materiais de referência certificados; 1 branco analítico; 32 monitores de fluxo

Figura 3.5 - Distribuição de amostras, materiais de referência certificados, branco e monitores de fluxo de nêutrons nos recipientes de irradiação (“coelhos”) correspondentes a um lote analítico.

Tabela 3.2 - Materiais de referência certificados utilizados nos cinco lotes de amostras, com respectivos códigos de identificação, produtores e matrizes.

Produtor	Código	Matriz
IAEA	A-11	<i>Milk Powder</i>
NIST	SRM1549	<i>Non-Fat Milk Powder</i>
IAEA	V-10	<i>Hay Powder</i>

IAEA – *International Atomic Energy Agency, Áustria*

NIST – *National Institute of Standards and Technology, Estados Unidos da América*

3.3.2 Irradiação

Os cinco lotes foram irradiados no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 (Figura 3.6) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN/CNEN), na cidade de São Paulo – SP. As irradiações dos três primeiros lotes tiveram duração de 8 horas, enquanto as demais, 4 horas. As informações como data, localização no reator (posição/prateleira) e valores médios do fluxo de nêutrons térmicos podem ser observadas na Tabela 3.3.

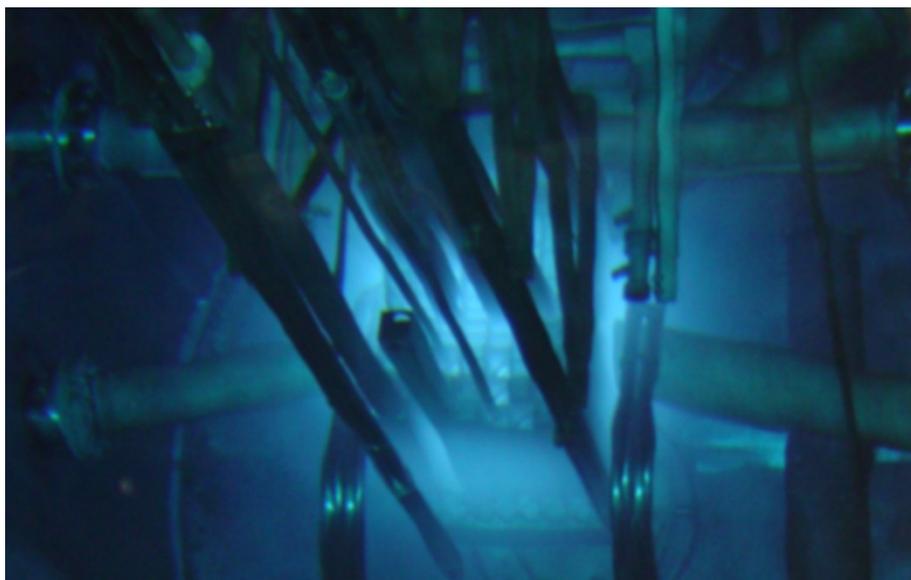


Figura 3.6 - Reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN/CNEN localizado na cidade de São Paulo-SP, onde as amostras foram irradiadas.

Tabela 3.3 - Data da irradiação, localização no reator (posição/prateleira) e valores médios e desvio padrão do fluxo de nêutrons térmicos para os cinco lotes encaminhados ao reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN/CNEN.

Lote	Data da irradiação	Posição	Prateleira	Fluxo ($\times 10^{12} \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
1	11/08/2014	14A	4; 5; 6; 7	$13,9 \pm 1,1$ (n = 24)
2	11/08/2014	14A	4; 5; 6; 7	$15,1 \pm 1,2$ (n = 24)
3	12/08/2014	14A	4; 5; 6; 7	$13,2 \pm 1,4$ (n = 24)
4	18/05/2015	13A	4; 5; 6; 7	$11,4 \pm 1,1$ (n = 21)
5	18/05/2015	14A	4; 5; 6; 7	$14,8 \pm 1,3$ (n = 22)

3.3.3 Detecção da atividade induzida

Após a irradiação, os lotes de amostras permaneceram no IPEN/CNEN até que a atividade total reduzisse a um valor que permitisse o transporte até o LRi/CENA/USP, localizado a aproximadamente 180 km de distância. Esse período, de aproximadamente 72 horas, é chamado “tempo de resfriamento”. A atividade das amostras foi verificada novamente quando chegaram ao LRi/CENA/USP com um contador Geiger-Müller, porém, só foram desembaladas dentro da *glove box* (Figura 3.7) quando a dose de radiação fosse inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (Dose Equivalente Efetiva Total - DEET de corpo inteiro é 0,05Sv).



Figura 3.7 - *Glove box* - Aparato projetado pelo Serviço de Proteção Radiológica do CENA/USP visando a minimização da exposição do usuário na manipulação de amostras radioativas.

As detecções da atividade induzida foram realizadas na sala de espectrometria gama “Prof. Dr. Epaminondas Sansígolo de Barros Ferraz” (Figura 3.8). Os dois espectrômetros utilizados possuem cristais coaxiais de germânio hiperpuro (HPGe), fabricados pela ORTEC, modelos GEM45190 e GEM50P4-83. Em relação ao fotopico 1332 keV do ^{60}Co , apresentam eficiência relativa de 45 % e 50 % e resolução de 1,80 keV e 1,90 keV, respectivamente.



Figura 3.8 - Visão parcial da sala de espectrometria gama “Prof. Dr. Epaminondas Sansígolo de Barros Ferraz”, localizada nas dependências do LRi/CENA/USP.

Como o objetivo é quantificar o maior número de elementos químicos, visto que os radionuclídeos produzidos possuem meias-vidas (T) bem diferentes, realizaram-se quatro medições da atividade induzida nas amostras. Com o decaimento radioativo e a redução da atividade total, as eficiências de detecção foram aumentadas pela diminuição da distância amostra-detector e o tempo de contagem foi prolongado, otimizando as condições para detecção de radionuclídeos com meias-vidas mais longas. Por haver interesse somente no radionuclídeo ^{51}Cr (320,08 keV, $T_{1/2} = 27,7$ dias) nos monitores de fluxo, realizaram-se apenas duas medições da atividade induzida. As condições experimentais de detecção para amostras e monitores de fluxo constam das Tabelas 3.4 e Tabela 3.5, respectivamente.

Tabela 3.4 - Condições experimentais observadas nas medições da atividade induzida nas amostras, materiais de referência certificados e brancos analíticos.

Lote	Medição	Detector	Decaimento (dias)	Distância (cm)	Tempo (s)
1	1	GEM50P4-83	5 - 6	$17,92 \pm 0,14$	900
	2	GEM45190	7 - 8	$9,253 \pm 0,006$	1800
	3	GEM45190	13 - 15	$1,66 \pm 0,02$	3600
	4	GEM50P4-83	27 - 30	$0,353 \pm 0,006$	7200
2	1	GEM45190	5	$20,36 \pm 0,07$	900
	2	GEM50P4-83	7	$8,09 \pm 0,03$	1800
	3	GEM50P4-83	12 - 14	$1,93 \pm 0,03$	3600
	4	GEM45190	27 - 30	$0,627 \pm 0,012$	7200
3	1	GEM45190	5 - 6	$17,77 \pm 0,04$	900
	2	GEM50P4-83	7 - 8	$5,80 \pm 0,05$	1800
	3	GEM45190	14 - 16	$1,593 \pm 0,012$	3600
	4	GEM50P4-83	41 - 45	$0,55 \pm 0,02$	7200
4	1	GEM50P4-83	6	$14,07 \pm 0,09$	900
	2	GEM45190	7 - 8	$3,037 \pm 0,006$	1800
	3	GEM50P4-83	15 - 17	$0,777 \pm 0,006$	3600
	4	GEM45190	41 - 44	$0,445 \pm 0,07$	7200
5	1	GEM45190	6	$14,08 \pm 0,14$	900
	2	GEM50P4-83	7 - 8	$3,323 \pm 0,006$	1800
	3	GEM45190	15 - 18	$0,42 \pm 0,02$	3600
	4	GEM50P4-83	41 - 44	$0,513 \pm 0,015$	7200

Tabela 3.5 - Condições experimentais observadas nas medições da atividade induzida nos monitores de fluxo.

Lote	Medição	Detector	Decaimento (dias)	Distância (cm)	Tempo (s)
1	1	GEM45190	56	$9,3 \pm 0,3$	*
	2	GEM50P4-83	57	$10,37 \pm 0,12$	*
2	1	GEM45190	57	$9,57 \pm 0,10$	*
	2	GEM50P4-83	58	$9,32 \pm 0,07$	*
3	1	GEM45190	58	$9,437 \pm 0,006$	*
	2	GEM50P4-83	59	$9,19 \pm 0,05$	*
4	1	GEM50P4-83	52	$3,26 \pm 0,02$	*
	2	GEM45190	55	$2,367 \pm 0,006$	*
5	1	GEM50P4-83	52	$3,26 \pm 0,03$	*
	2	GEM45190	55	$2,38 \pm 0,03$	*

* Entre 60 s e 180 s, otimizado para acúmulo de 30 mil contagens no fotopico 320,08 keV.

3.3.4 Determinações químicas

As determinações químicas foram realizadas pelo método *ko* de padronização, seguindo os procedimentos preconizados por Bacchi, Fernandes e França (2000) e Bacchi, Fernandes e Oliveira (2000). Para a realização dos cálculos propriamente ditos, fez-se uso dos aplicativos QuantuMCA e QuantuINAA (Figura 3.9) desenvolvidos pelo Dr. Márcio Arruda Bacchi (BACCHI; FERNANDES, 2003), Especialista em Laboratório do LRi/CENA/USP. Primeiramente, com o aplicativo QuantuMCA, são identificados e ajustados de forma automatizada os fopicos de interesse dos espectros selecionados. Já para o cálculo do fluxo de nêutrons e da fração de massa dos elementos químicos, bem como das incertezas analíticas associadas, fez-se uso do aplicativo QuantuINAA. Na Tabela 3.6, estão compiladas informações referentes aos radionuclídeos utilizados nas determinações da fração de massa dos elementos químicos.

Tabela 3.6 - Radionuclídeos utilizados na determinação dos elementos químicos, (Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn) nas amostras e monitores de fluxo (Cr), acompanhados de meia-vida (dias) e principal energia de emissão gama (keV) com respectivo parâmetro k_0 . Fonte: Aplicativo QuantuINAA (BACCHI; FERNANDES, 2003).

Elemento	Radionuclídeo	Meia-vida (dias)	Energia (keV)	k_0
Br	⁸² Br	1,4708	554,30	$2,38 \times 10^{-2}$
Ca	⁴⁷ Ca	4,5436	1297,06	$9,54 \times 10^{-7}$
Co	⁶⁰ Co	1925,23	1332,50	$1,32 \times 10^{+0}$
Cr	⁵¹ Cr	27,7	320,08	$2,62 \times 10^{-3}$
Cs	¹³⁴ Cs	753,14	795,87	$4,15 \times 10^{-1}$
Fe	⁵⁹ Fe	44,496	1099,25	$7,77 \times 10^{-5}$
K	⁴² K	0,515	1524,58	$9,46 \times 10^{-4}$
Na	²⁴ Na	0,624	1368,60	$4,62 \times 10^{-2}$
Rb	⁸⁶ Rb	18,66	1076,69	$7,65 \times 10^{-4}$
Zn	⁶⁵ Zn	244,1	1115,52	$5,72 \times 10^{-3}$

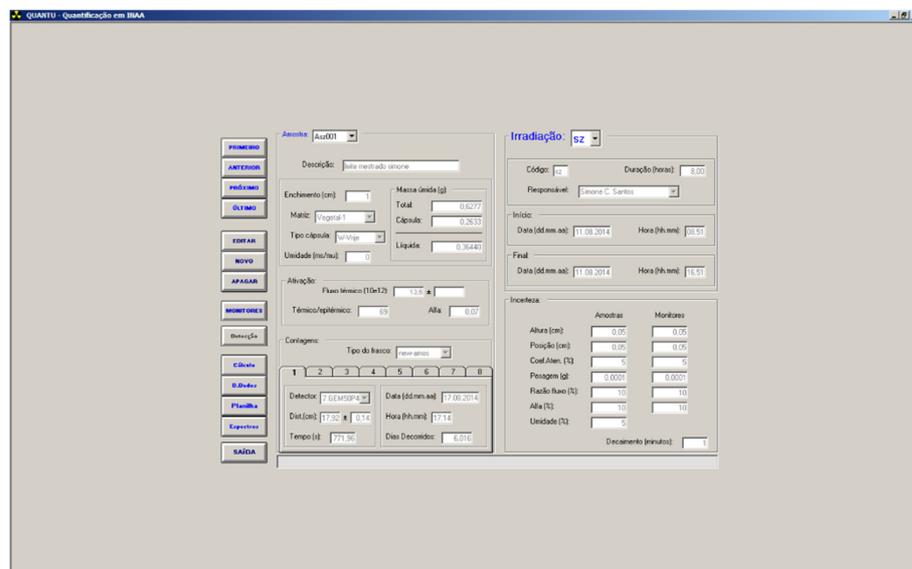
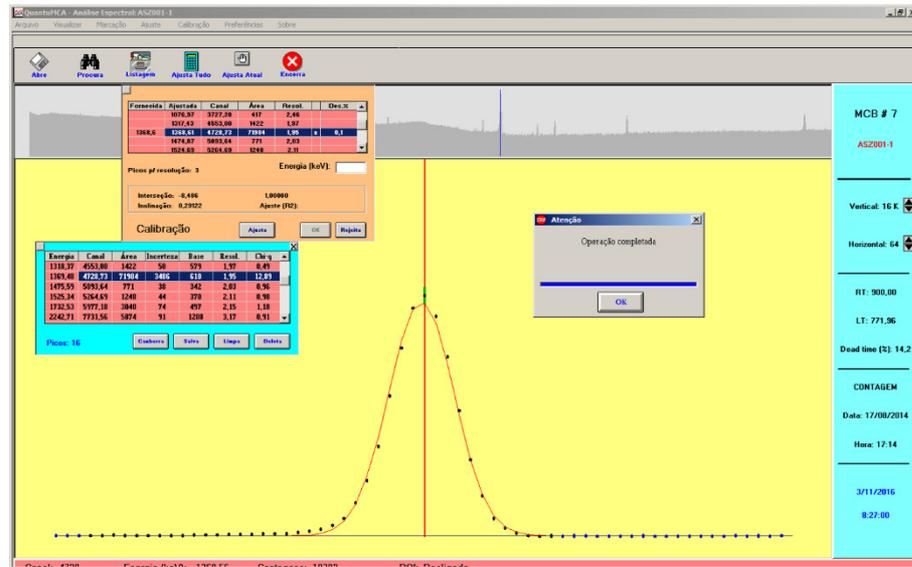


Figura 3.9 - Interfaces principais dos aplicativos QuantuMCA e QuantuINAA, utilizados nas análises espectrais, determinações químicas e cálculo das incertezas associadas.

O aplicativo QuantuINAA também foi utilizado na determinação dos limites de detecção, contudo, neste caso, levou-se em consideração o critério da Equação 3.1 (ALFASSI, 1994a).

$$N_P \geq 3\sqrt{N_B} \quad (3.1)$$

Onde:

N_P Número de contagens no fotopico característico

N_B Número de contagens da área de base da região de interesse

3.3.5 Controle da qualidade analítica

Para controle da qualidade analítica, foi calculado o valor E_n para os resultados obtidos na análise dos materiais de referência certificados. A determinação do valor E_n leva em consideração os valores das frações de massa obtidos experimentalmente e os valores tabelados nos certificados, utilizando também as respectivas incertezas expandidas (ISO Guide 13.528:2005). São considerados aceitáveis os valores E_n que estão entre -1 e 1 .

Dessa forma, a exatidão dos resultados experimentais foi avaliada calculando-se os valores E_n para todos os elementos químicos de interesse (Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn) nos procedimentos analíticos (cinco lotes analíticos) dos materiais de referência certificados IAEA A-11 (*Milk Powder*), IAEA V-10 (*Hay Powder*) e NIST SRM1549 (*Non-Fat Milk Powder*), considerando-se a Equação 3.2 (ABNT NBR ISO/IEC 17.043:2010).

$$E_n = \frac{x-X}{\sqrt{I_x^2 + I_X^2}} \quad (3.2)$$

Onde:

E_n Número E_n

x Resultado obtido (mg/kg)

X Valor de referência reportado no certificado (mg/kg)

I_x Incerteza expandida do resultado obtido (mg/kg), nível de 95 % de confiança

I_X Incerteza expandida do valor de referência (mg/kg), nível de 95 % de confiança

Na ausência do valor certificado para um determinado elemento químico, serão apresentados os valores de cada uma das cinco irradiações e verificar-se-á se o valor médio está dentro do intervalo de confiança indicado no certificado, quando existirem.

3.3.6 Análises estatísticas

Com relação às análises estatísticas univariadas, fez-se uso de testes paramétricos (ANOVA) e não paramétricos (NPANOVA), mais especificamente o Teste de Tukey na primeira situação e Teste de Kruskal Wallis e U de Mann-Whitney (HUBER; RONCHETTI, 2009) na segunda. O Teste de Kruskal Wallis foi empregado nas comparações das médias onde existiam três tratamentos (tipos de leite), ao passo que o U de Mann-Whitney foi utilizado nas comparações das médias onde existiam dois tratamentos (designação comercial e grau de enriquecimento). Já nas análises multivariadas, utilizou-se da Análise de Variância Multivariada (MANOVA), a partir da qual se estimaram as correlações residuais, assim como as suas significâncias.

Também aplicou-se Análise de Agrupamento (*Cluster Analysis*) representada pelo dendrograma e Análise de Componentes Principais (PCA), a partir do qual se elaborou o gráfico *Biplot*, que relaciona categorias e variáveis-resposta.

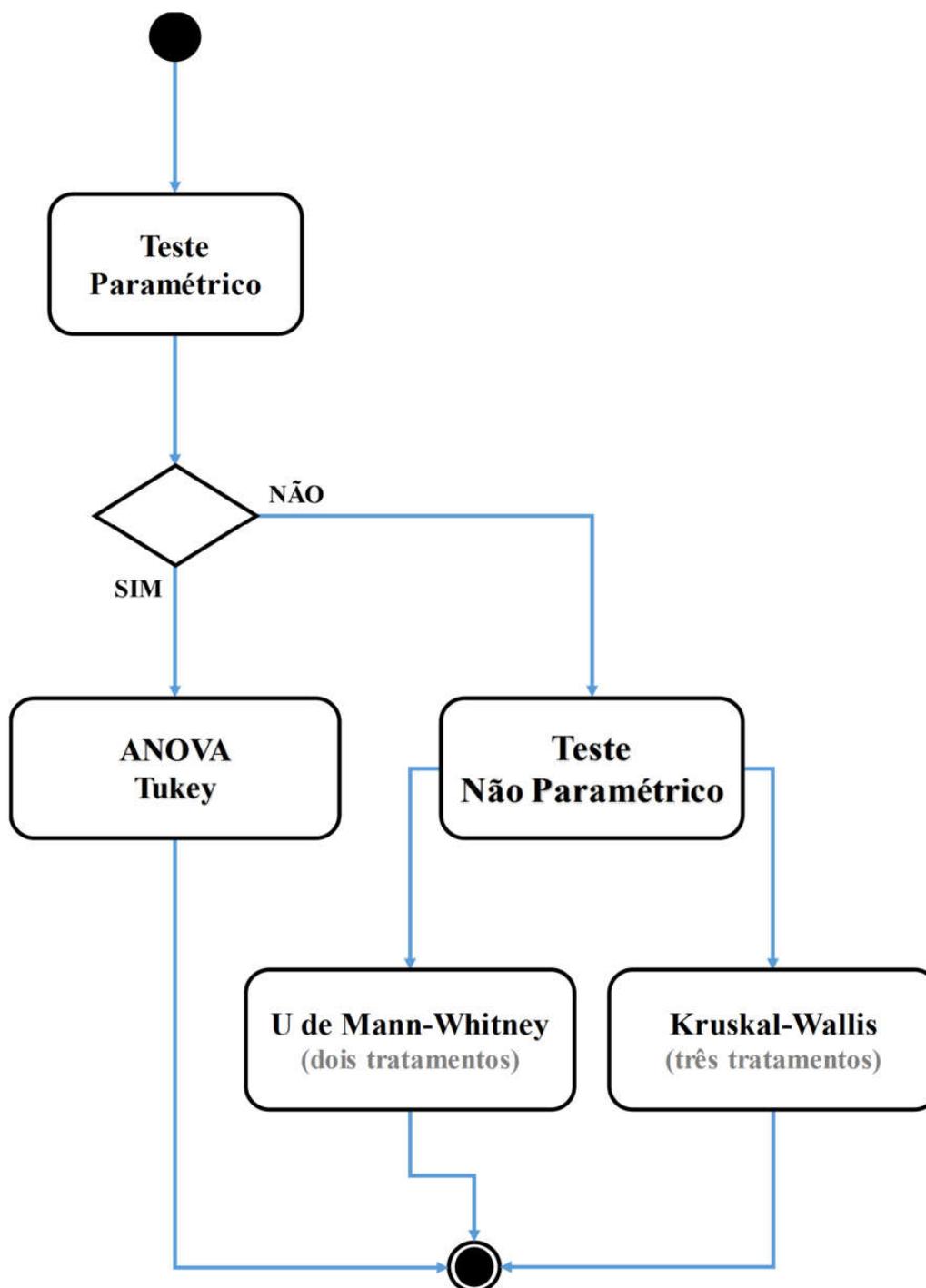


Figura 3.10 - Estratégia para escolha do tipo de teste estatístico empregado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Leite desnatado x leite semidesnatado x leite integral

A hipótese de igualdade da fração de massa média de cada um dos elementos químicos determinados nos leites em pó integral, semidesnatado e desnatado foi rejeitada ($p < 0,05$) para os elementos de importância fisiológica (Ca, K, Fe, Na e Zn). As menores frações de massa médias desses elementos foram observadas para o leite integral (Tabela 4.1 e Figuras 4.1 a 4.4).

Tabela 4.1 – Frações de massa médias (mg/kg; base seca) de cada elemento químico nas amostras de leite desnatado (DES), semidesnatado (SDES) e integral (INT), seguidas de respectivos desvios-padrão, valores de probabilidade (p) e testes estatísticos utilizados.

	DES (n = 12)	SDES (n = 6)	INT (n = 54)	Valor p	Teste
Br	49 ± 42	22 ± 16	25 ± 19	0,0659 ^{NS}	Kruskal-Wallis
Ca	15800 ^a ± 4800	12600 ^a ± 1900	9200 ^b ± 180	< 0,001	Kruskal-Wallis
Co	0,020 ^{ab} ± 0,022	0,038 ^a ± 0,042	0,007 ^b ± 0,003	0,0027	Kruskal-Wallis
Cs	0,21 ± 0,17	0,38 ± 0,34	0,18 ± 0,12	0,2678 ^{NS}	Kruskal-Wallis
Fe	41 ± 74	110 ± 150	40 ± 84	0,0899 ^{NS}	Kruskal-Wallis
K	16990 ^a ± 490	15040 ^b ± 150	12500 ^c ± 430	< 0,001	Tukey
Na	5260 ^a ± 250	4890 ^b ± 70	4030 ^c ± 350	< 0,001	Tukey
Rb	23,9 ± 7,4	30,0 ± 6,8	26,2 ± 8,0	0,5507 ^{NS}	Kruskal-Wallis
Zn	45,1 ^a ± 4,0	41,2 ^a ± 4,4	32,2 ^b ± 1,8	< 0,001	Kruskal-Wallis

^{NS} – Não significativo;

Alguma letra em comum indica que as amostras não diferem com 5% de significância ($p < 0,05$).

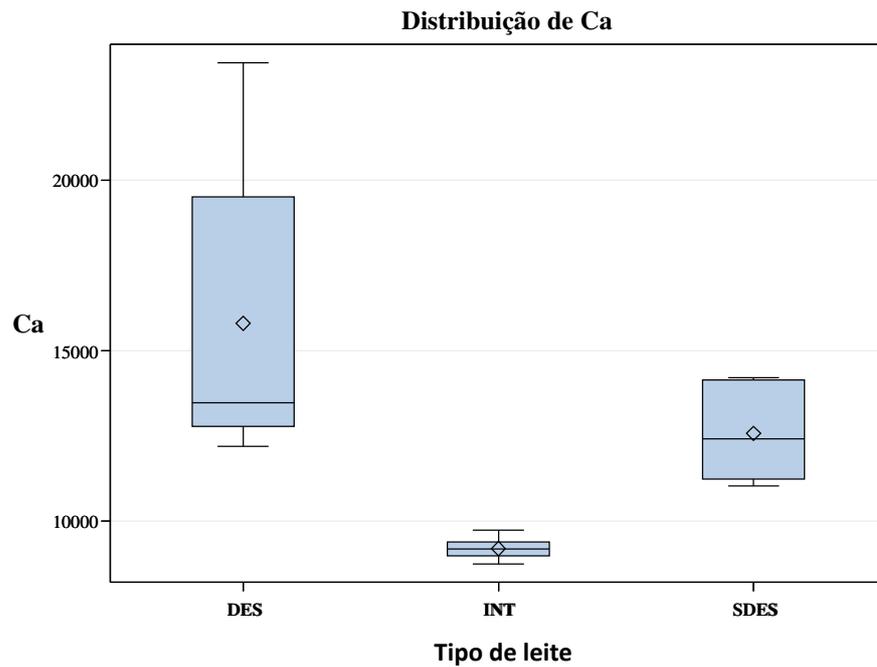


Figura 4.1 - Gráfico de distribuição *Boxplot* para o elemento químico Ca (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado (DES), integral (INT) e semidesnatado (SDES).

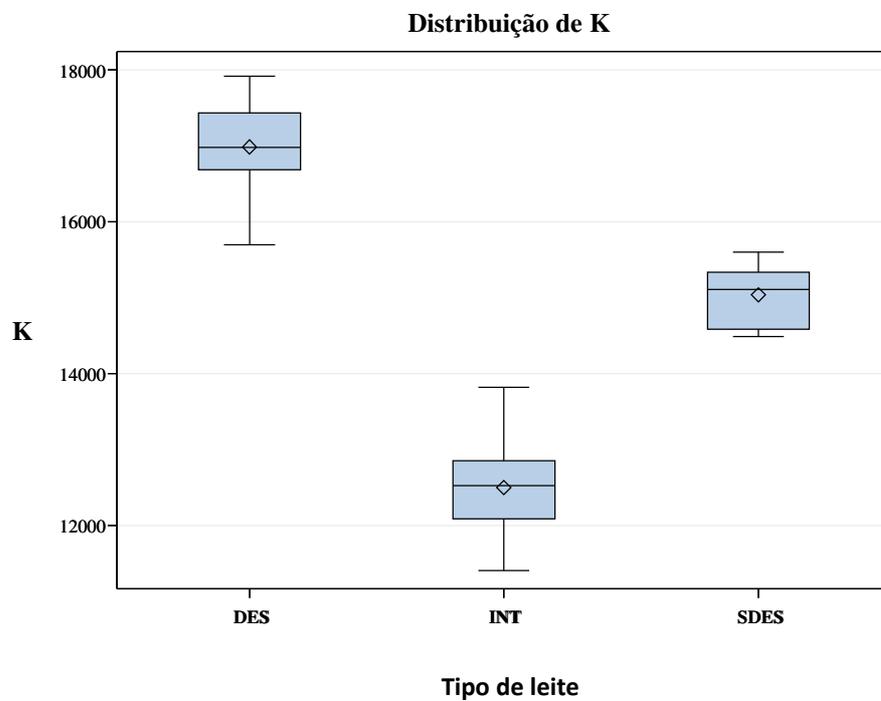


Figura 4.2 - Gráfico de distribuição *Boxplot* para o elemento químico K (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado (DES), integral (INT) e semidesnatado (SDES).

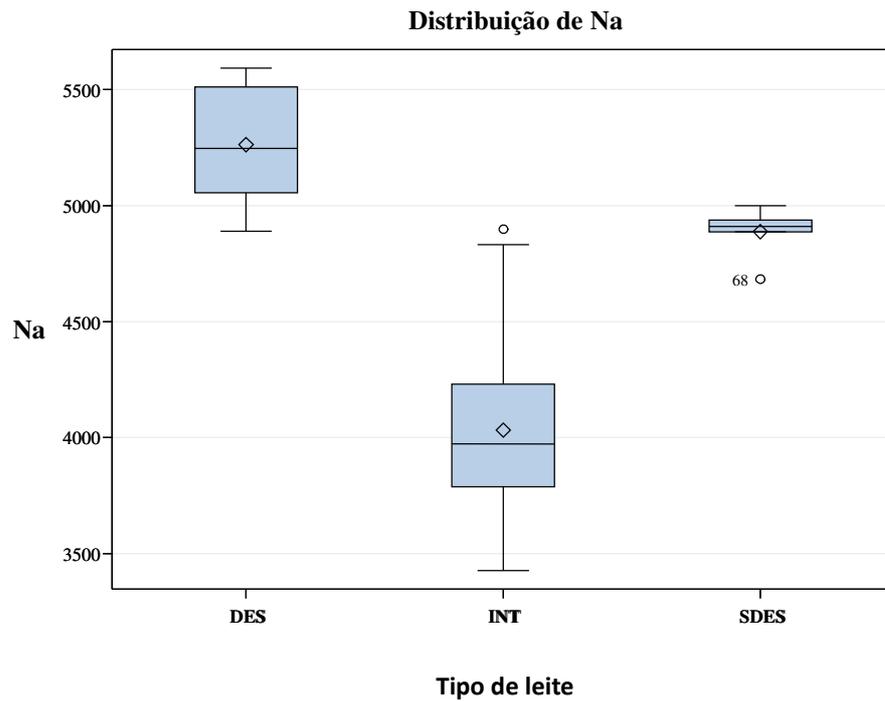


Figura 4.3 - Gráfico de distribuição *Boxplot* para o elemento químico Na (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado (DES), integral (INT) e semidesnatado (SDES).

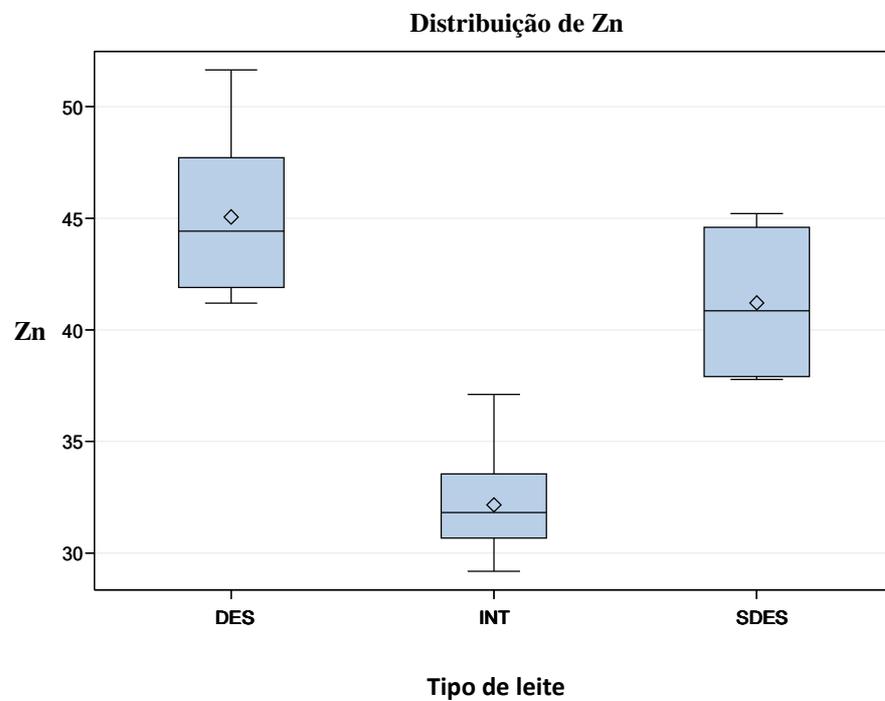


Figura 4.4 - Gráfico de distribuição *Boxplot* para o elemento químico Zn (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado (DES), integral (INT) e semidesnatado (SDES).

Para o elemento Fe, percebe-se uma tendência similar, sendo que os leites em pó integral e desnatado apresentaram as menores frações de massa médias. Na Figura 4.5, observa-se a presença de *outliers* para leite em pó integral e desnatado, por haver leites enriquecidos com Fe.

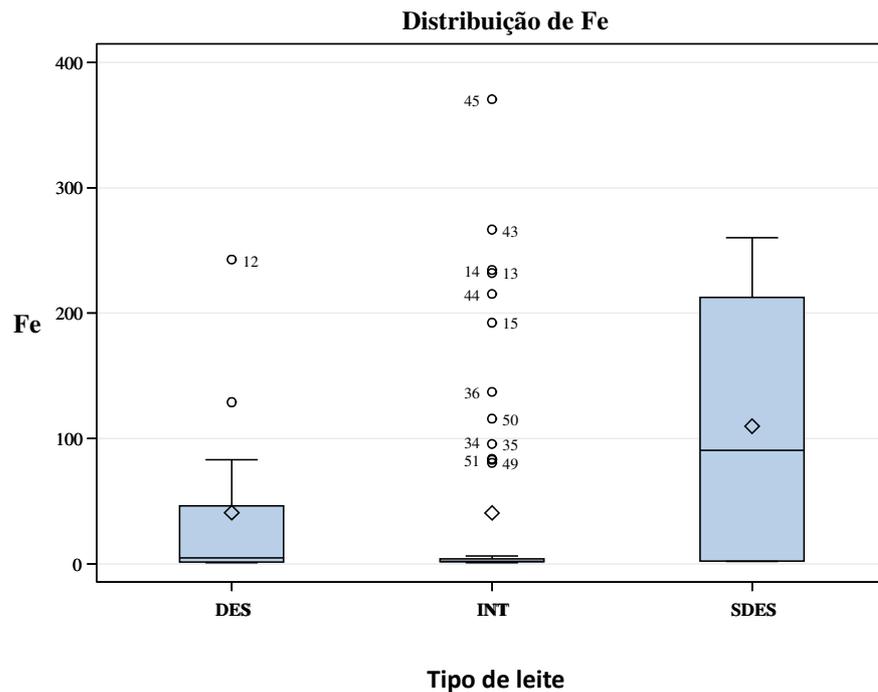


Figura 4.5 - Gráfico de distribuição *Boxplot* para o elemento químico Fe (mg/kg; base seca), considerando leite em pó desnatado (DES), integral (INT) e semidesnatado (SDES).

4.2 Leite em pó não-instantâneo x leite em pó instantâneo

A hipótese de igualdade de leites em pó não-instantâneos e instantâneos não foi rejeitada para a maioria dos elementos (Tabela 4.2). Existe diferença significativa somente para Zn, porém, esta diferença das frações de massa médias é pequena (não-instantâneo 32,7^a mg/kg e instantâneo 31,5^b mg/kg) (Figura 4.6).

Tabela 4.2 – Frações de massa médias (mg/kg; base seca) para cada elemento químico nas amostras de leite não-instantâneo (NINST) e instantâneo (INST), seguidas dos respectivos desvios-padrão, valores de probabilidade (p) e testes estatísticos utilizados.

	NINST (n=30)	INST (n=24)	Valor p	Teste
Br	25 ± 22	26 ± 17	0,1845 ^{NS}	U de Mann-Whitney
Ca	9240 ± 170	9150 ± 190	0,1726 ^{NS}	Tukey
Co	0,0062 ± 0,0025	0,0072 ± 0,0026	0,1859 ^{NS}	Tukey
Cs	0,18 ± 0,14	0,16 ± 0,09	0,9518 ^{NS}	U de Mann-Whitney
Fe	34 ± 73	49 ± 100	0,5059 ^{NS}	U de Mann-Whitney
K	12430 ± 440	12600 ± 420	0,2837 ^{NS}	Tukey
Na	4030 ± 420	4030 ± 260	0,3638 ^{NS}	U de Mann-Whitney
Rb	27,6 ± 8,7	24,3 ± 7,1	0,0562 ^{NS}	U de Mann-Whitney
Zn	32,7 ^a ± 2,1	31,5 ^b ± 0,9	0,0384	U de Mann-Whitney

^{NS} – Não significativo;

Alguma letra em comum linha indica que as amostras não diferem com 5% de significância ($p < 0,05$).

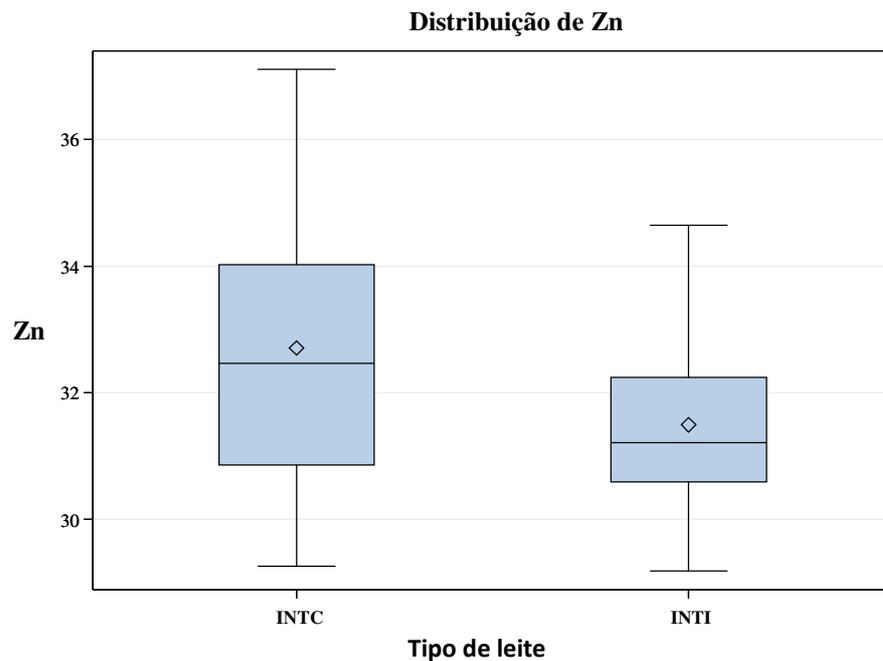


Figura 4.6 - Gráfico de distribuição *Boxplot* para o elemento químico Zn (mg/kg; base seca), considerando o método de processamento não instantâneo (INTC) e instantâneo (INTI) para o leite em pó integral.

4.3 Leite em pó enriquecido x leite em pó não-enriquecido

4.3.1 Leite em pó enriquecido com Fe x leite em pó não-enriquecido

A hipótese de igualdade do elemento Fe entre frações de massa médias de leites em pó enriquecidos com Fe e leite em pó não-enriquecidos foi rejeitada ($p < 0,001$). A média aritmética dos leites enriquecidos com Fe foi 167,7 mg/kg ($n = 15$), enquanto dos leites não-enriquecidos foi 13,6 mg/kg ($n = 57$).

4.3.2 Leite em pó enriquecido com Ca x leite em pó não-enriquecido

A hipótese de igualdade do elemento Ca entre as frações de massa médias de leites em pó enriquecidos com Ca e leites em pó não-enriquecidos foi rejeitada ($p < 0,001$). A média aritmética dos leites enriquecidos com Ca foi 22.822 mg/kg ($n = 3$), enquanto dos leites não-enriquecidos foi 10.049 mg/kg ($n = 69$).

4.4 Análises multivariadas

Nos itens anteriores (4.1, 4.2, 4.3), foram investigados e discutidos pormenorizadamente os elementos químicos, individualmente. De maneira sucinta, verificou-se que Ca, Co, K, Na e Zn foram decisivos na diferenciação dos três tipos de leite (desnatado, semidesnatado e integral). Zinco possibilitou a diferenciação do leite integral não-instantâneo e instantâneo, enquanto Fe, Na e Rb possibilitaram a diferenciação dos leites com aditivos (enriquecido e não-enriquecido). Neste item, serão discutidos os resultados de forma mais abrangente, considerando simultaneamente todas as observações das variáveis da resposta (nove).

4.4.1 Matriz de correlação

Utilizando todas as variáveis quantificadas para todas as amostras analisadas, estruturou-se uma matriz de correlação residual, um subproduto da MANOVA (Tabela 4.3). Para avaliar os coeficientes (coeficientes de *Pearson - r*), tomou-se como referência a nomenclatura da Tabela 4.4. As correlações significativas foram dispostas na Tabela 4.5.

Tabela 4.3 - Matriz de correlação residual para os elementos químicos determinados nas amostras de leite e nível de significância.

	Br	Ca	Co	Cs	Fe	K	Na	Rb	Zn
Br	1,000000 0,0009	-0,388900 0,0009	- 0,476230 < 0,0001	-0,338057 0,0042	- 0,388620 0,0009	0,480481 < 0,0001	- 0,418563 0,0003	- 0,468796 < 0,0001	- 0,559178 < 0,0001
Ca	- 0,388900 0,0009	1,000000	0,243157 0,0425	- 0,048513 0,6900	0,039676 0,7443	- 0,213012 0,0766	0,033796 0,7812	0,127773 0,2918	0,109476 0,3670
Co	- 0,476230 < 0,0001	0,243157 0,0425	1,000000	- 0,252825 0,0347	0,550962 < 0,0001	- 0,204784 0,0890	0,130334 0,2822	0,047632 0,6954	0,588302 < 0,0001
Cs	- 0,338057 0,0042	-0,048513 0,6900	-0,252825 0,0347	1,000000	0,009787 0,9359	- 0,234115 0,0511	0,143463 0,2361	0,520954 < 0,0001	- 0,075741 0,5332
Fe	- 0,388620 0,0009	0,039676 0,7443	0,550962 < 0,0001	0,009787 0,9359	1,000000	- 0,316380 0,0076	0,058945 0,6279	0,087745 0,4701	0,341035 0,0039
K	0,480481 < 0,0001	-0,213012 0,0766	-0,204784 0,0890	- 0,234115 0,0511	- 0,316380 0,0076	1,000000	- 0,191452 0,1124	- 0,140226 0,2469	- 0,154573 0,2014
Na	- 0,418563 0,0003	0,033796 0,7812	0,130334 0,2822	0,143463 0,2361	0,058945 0,6279	- 0,191452 0,1124	1,000000	0,480587 < 0,0001	0,121710 0,3155
Rb	- 0,468796 < 0,0001	0,127773 0,2918	0,047632 0,6954	0,520954 < 0,0001	0,087745 0,4701	- 0,140226 0,2469	0,480587 < 0,0001	1,000000	0,228546 0,0570
Zn	- 0,559178 < 0,0001	0,109476 0,3670	0,588302 < 0,0001	- 0,075741 0,5332	0,341035 0,0039	- 0,154573 0,2014	0,121710 0,3155	0,228546 0,0570	1,000000

Tabela 4.4 - Nomenclatura das correlações (coeficiente de Pearson - r), variando de perfeita positiva a perfeita negativa, proposta por Santos (2007).

Coeficiente	Nomenclatura	Coeficiente	Nomenclatura
$r = 1$	Perfeita positiva	$r = 0$	Nula
$0,8 \leq r < 1$	Forte positiva	$-0,1 < r < 0$	Ínfima negativa
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada positiva	$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca positiva	$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa
$0 < r < 0,1$	Ínfima positiva	$-1 < r \leq -0,8$	Forte negativa
$r = 0$	Nula	$r = -1$	Perfeita negativa

Na Tabela 4.5, observa-se que a maior parte das correlações estatisticamente significativas ($p < 0,1$) foram fracas negativas ou fracas positivas. Os maiores coeficientes, em valor absoluto, aconteceram para Br x Zn; Co x Zn; Co x Fe; Cs x Rb (moderadas positivas) e Br x Zn (moderada negativa).

Tabela 4.5 - Classificação das correlações estatisticamente significativas.

Coefficiente	Nomenclatura	Elementos correlacionados ($p < 0,1$)
$r = 1$	Perfeita positiva	∅
$0,8 \leq r < 1$	Forte positiva	∅
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderada positiva	Br x Zn; Co x Zn; Co x Fe; Cs x Rb
$0,1 \leq r < 0,5$	Fraca positiva	Br x K; Ca x Co; Fe x Zn; Na x Rb; Rb x Zn
$0 < r < 0,1$	Ínfima positiva	∅
$r = 0$	Nula	∅
$-0,1 < r < 0$	Ínfima negativa	∅
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fraca negativa	Br x Ca; Br x Co; Br x Cs; Br x Fe; Br x Na; Br x Rb; Co x Cs; Cs x K; Fe x K;
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderada negativa	Br x Zn
$-1 < r \leq -0,8$	Forte negativa	∅
$r = -1$	Perfeita negativa	∅

4.4.2 Análise de agrupamento

A primeira forma de análise multivariada com apelo visual empregada foi a análise de agrupamento, representada pelo dendrograma da Figura 4.7.

Percebe-se que houve agrupamento de todas as amostras de leite integral. Por outro lado, os leites com menores quantidades de gordura (desnatado e semidesnatado) não se agruparam totalmente, possivelmente devido à composição química da amostra DES-01, enriquecida com Ca.

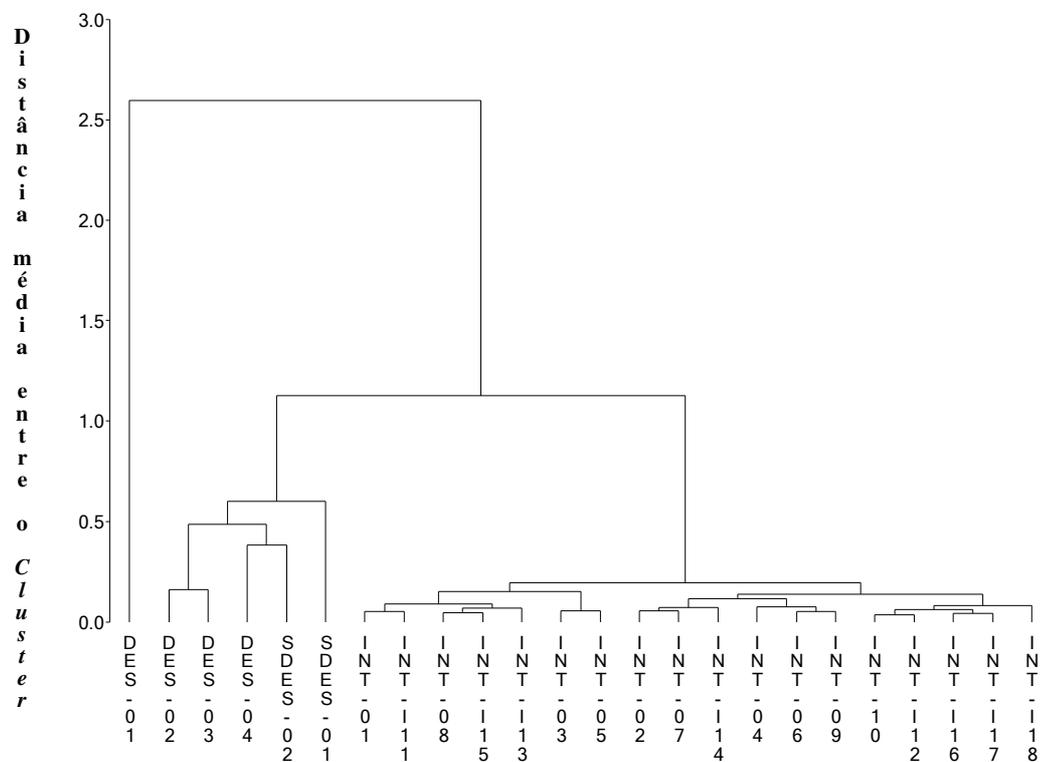


Figura 4.7 - Análise de agrupamento considerando os nove elementos químicos observados (Br, Ca, Co, Cs, Fe, K, Na, Rb e Zn) para os três tipos de leite adquiridos (desnatado, semidesnatado e integral).

4.4.3 Análise de componentes principais

Os elementos que mais discriminaram foram Ca, K, Na e Zn na primeira componente principal, com 42% da informação, e Br, Rb e Zn na segunda componente principal, com 23% da informação.

Foi elaborado um gráfico (*Biplot*) das componentes principais (PCA), estruturado com componentes 1 e 2, e que contemplou 65,84 % da variabilidade dos dados. Para facilitar a visualização, o leite desnatado foi representado pela letra “D”, o leite semidesnatado pela letra “S” e o leite integral pela letra “I” (Figura 4.8).

No quadrante I, encontram-se os leites desnatados, que apresentaram alta fração de massa de Co, Cs, Na e Zn relativamente aos outros tipos de leite.

Nos quadrantes II e III, observa-se que os leites integrais têm relativamente menores frações de massa de Ca, Cs, Co, Fe, K, Na e Zn.

No quadrante IV, estão os leites desnatados com altas frações de massa de Ca, K, Na e Zn.

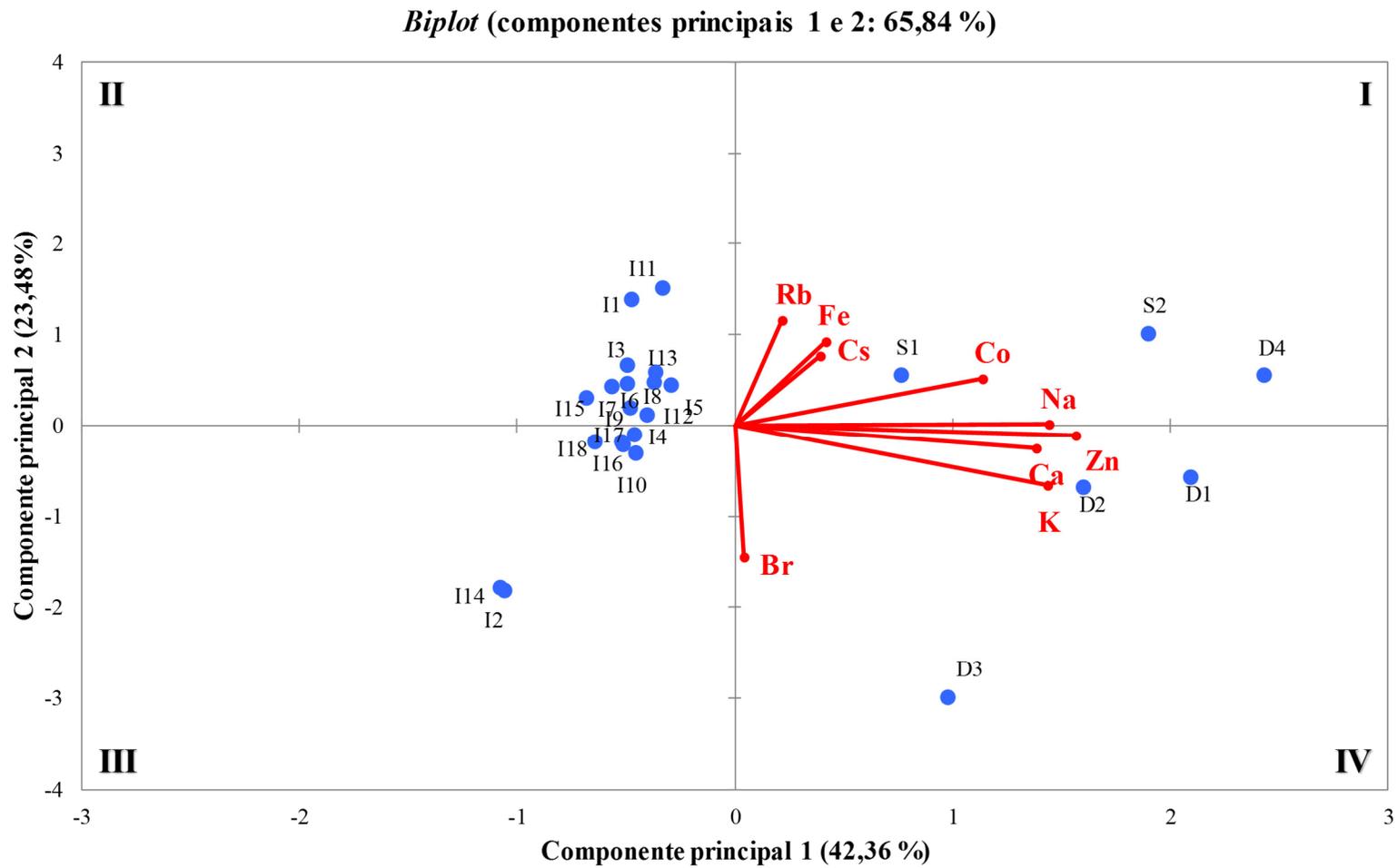


Figura 4.8 - *Biplot* dos componentes principais 1 e 2, representando 65,84 % da variabilidade dos dados.

4.5 Controle da qualidade analítica

4.5.1 IAEA A-11

A Figura 4.9 apresenta o gráfico de controle dos números E_n calculados para os elementos químicos que possuem valores certificados no material IAEA A-11 (*Milk Powder*). Ferro e rubídio mostram valores médios fora dos limites inferior e superior, respectivamente. Entretanto, valores médios obtidos para os materiais de referência IAEA V-10 (*Hay Powder*) e NIST SRM1549 (*Non-Fat Milk Powder*) ficaram dentro dos limites (Figura 4.10 e Figura 4.11).

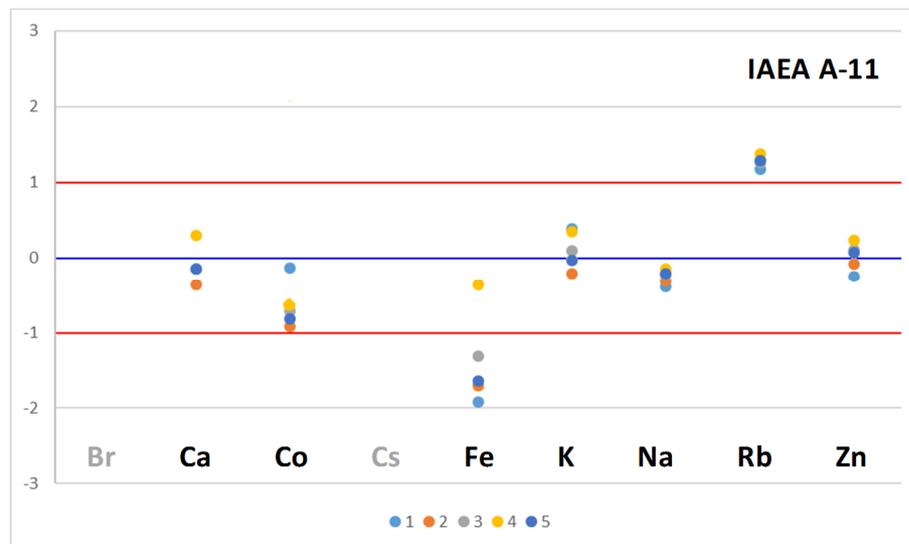


Figura 4.9 - Números E_n calculados a partir das frações de massa dos elementos químicos determinados no material de referência IAEA A-11 (*Milk Powder*), nas cinco irradiações.

Na Tabela 4.6, observam-se os valores das frações de massa dos elementos químicos Br e Cs, determinados nas cinco irradiações que não possuem valores certificados. Os cinco resultados para Br e Cs foram concordantes, com coeficientes de variação de 2 % e 7 %, respectivamente.

Tabela 4.6 - Frações de massa de Br e Cs determinados no material de referência IAEA A-11 (*Milk Powder*) nas cinco irradiações acompanhados das respectivas incertezas expandidas. Valores expressos em mg/kg (base seca).

	1ª irradiação	2ª irradiação	3ª irradiação	4ª irradiação	5ª irradiação
Br	18,5	18,7	18,7	19,2	19,0
<i>Incerteza %</i>	4,4	5,4	4,6	4,8	4,6
Cs	0,071	0,073	0,073	0,084	0,074
<i>Incerteza %</i>	8,0	9,2	8,2	15	8,8

4.5.2 IAEA V-10

O gráfico de controle para o material de referência IAEA V-10 (*Hay Powder*) encontra-se na Figura 4.10. Todos os valores de E_n estão dentro dos limites (-1 e 1), com exceção de um valor para Fe. Ainda assim, o valor médio para Fe, considerando os cinco lotes analíticos, também está dentro dos limites.

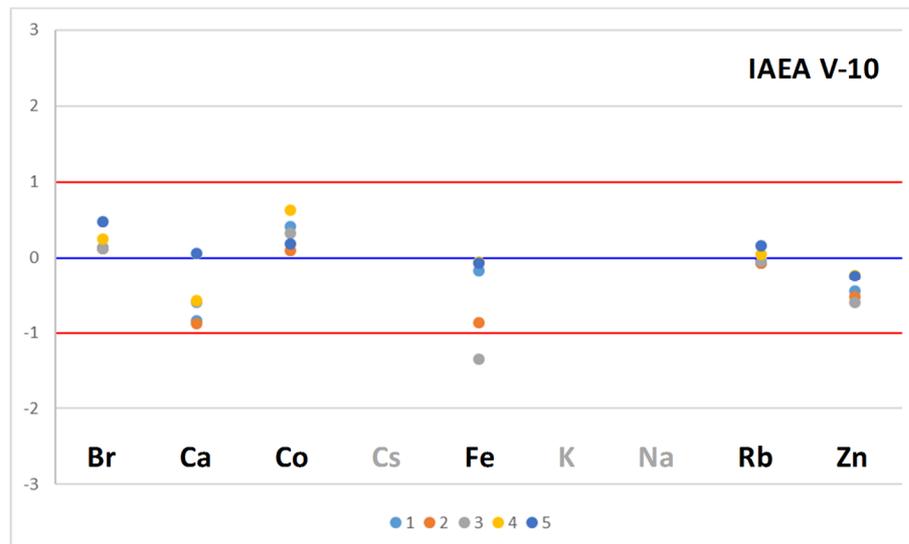


Figura 4.10 - Números E_n calculados a partir das frações de massa dos elementos químicos determinados no material de referência IAEA V-10 (*Hay Powder*), nas cinco irradiações.

Os elementos Cs, K e Na não possuem valores certificados nesse material, apenas valores de referência. Os resultados obtidos no presente trabalho estão compreendidos dentro dos intervalos de confiança contidos no certificado, ou seja, o valor médio de Cs ($n = 5$; 0,018 mg/kg) está entre 0,016 - 0,019 mg/kg, o valor médio de K ($n = 5$, 21.500 mg/kg) está entre 19.600 - 22.500 mg/kg e o valor médio de Na ($n = 5$; 480 mg/kg) está entre 440 - 570 mg/kg.

Nota-se, também, que houve concordância entre os resultados obtidos nas cinco irradiações, sendo que os coeficientes de variação para Cs, K e Na foram 6 %, 2 % e 2 %, respectivamente (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 - Frações de massa de Cs, K e Na no material de referência IAEA V-10 (*Hay Powder*) determinados nas cinco irradiações, acompanhadas das respectivas incertezas expandidas (%). Valores expressos em mg/kg (base seca).

	1 ^a Irradiação	2 ^a Irradiação	3 ^a Irradiação	4 ^a Irradiação	5 ^a Irradiação
Cs	0,017	0,018	0,018	0,020	0,020
<i>Incerteza %</i>	15	14	13	21	15
K	21.200	21.400	21.000	22.300	21.600
<i>Incerteza %</i>	5,2	4,8	6,8	7,6	5,6
Na	475	471	468	478	492
<i>Incerteza %</i>	3,4	3,2	3,4	4,0	4,8

4.5.3 NIST SRM1549

A Figura 4.11 traz o gráfico de controle para o material de referência NIST SRM1549 (*Non-Fat Milk Powder*). Todos os resultados de Ca, K e Zn estão dentro da faixa de valores admissíveis. Ferro possui um valor superior e um inferior à faixa, porém o E_n médio para esse elemento químico está entre -1 e 1. Da mesma forma, Na tem um valor acima de 1, com o valor médio situando-se dentro da faixa.

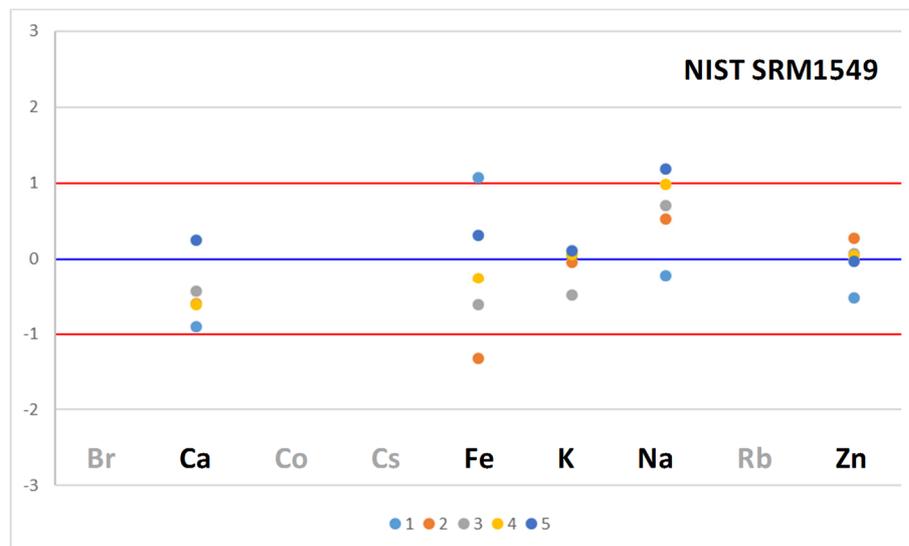


Figura 4.11 - Números E_n calculados a partir das frações de massa dos elementos químicos determinados no material de referência NIST SRM1549 (*Non-Fat Milk Powder*), nas cinco irradiações.

Os resultados das cinco irradiações para os elementos químicos que não possuem valores certificados (Br, Co, Cs e Rb) estão na Tabela 4.8. Nota-se que as frações de massa dos elementos químicos são coerentes entre si, com coeficiente de variação de 3 %, 12 %, 3 % e 3 %, respectivamente, para Br, Co, Cs e Rb. Além disso, os valores médios obtidos para Br e Rb são coerentes com os valores indicativos contidos no certificado, respectivamente, 12 mg/kg e 11 mg/kg.

Tabela 4.8 – Frações de massa de Br, Co, Cs e Rb determinados no material de referência NIST SRM1549 (*Non-Fat Milk Powder*) nas cinco irradiações, acompanhadas das respectivas incertezas expandidas (%). Valores expressos em mg/kg (base seca).

	1 ^a Irradiação	2 ^a Irradiação	3 ^a Irradiação	4 ^a Irradiação	5 ^a Irradiação
<i>Br</i>	12,1	12,8	12,9	12,8	13,0
<i>Incerteza %</i>	15	14	13	21	15
<i>Co</i>	0,0047	0,0038	0,0039	0,0041	0,0051
<i>Incerteza %</i>	15	14	13	21	15
<i>Cs</i>	0,018	0,019	0,018	0,018	0,018
<i>Incerteza %</i>	16	14	21	22	18
<i>Rb</i>	12,3	13,3	13,2	13,1	13,1
<i>Incerteza %</i>	6,0	6,0	5,6	6,0	6,4

5 CONCLUSÕES

A análise por ativação neutrônica instrumental empregada nesse trabalho permitiu a determinação dos elementos químicos essenciais Ca, Fe, K, Na e Zn, além de Br, Co, Cs e Rb nas diferentes amostras de leite em pó dos tipos integral, semidesnatado, desnatado e enriquecido. O uso de materiais de referência certificados corroborou a exatidão e a precisão dos resultados.

Houve diferenças estatísticas entre os tipos de leite em pó (integral, semidesnatado e desnatado) avaliados para os elementos Br, Cs, Fe e Rb. Além disso, os leites em pó não-instantâneos comparados com os instantâneos apresentaram diferença estatística somente para o elemento Zn.

Dentre as 72 amostras de leite em pó estudadas, aquelas enriquecidas com os elementos químicos Ca e Fe diferiram estatisticamente dos leites não-enriquecidos.

De maneira geral, os leites em pó com menores quantidades de gordura (desnatado e semidesnatado) apresentaram maiores quantidades dos elementos químicos determinados.

Pela análise de agrupamento, verificou-se que a distância multivariada entre os leites em pó integrais foi menor, o que indica similaridade. Assim, entende-se como estratégica e viável a seleção deste tipo de leite em pó como candidato para a produção de material de referência certificado.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. R. L. Caracterização físico-química, qualidade, legislação e beneficiamento. Lavras: UFLA/FAEPE, 2011. 142 p.
- ADVANCED MEASUREMENT TECHNOLOGY – ORTEC. Lanthanum Bromide. Scintillation Detectors. Oak Ridge, 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Portaria Nº 29 de 12 de janeiro de 1998. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Disponível em <https://goo.gl/J3ovdQ>. Acesso em: 05 nov. 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Portaria Nº 54 de 12 de novembro de 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 13 nov. 2012, Seção 1, n. 219, p. 122. Disponível em <https://goo.gl/cUXHpK>. Acesso em: 05 nov. 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Relatório da oficina sobre ensaios de proficiências para o controle da qualidade de produtos. Brasília, DF, 2012. Disponível em <http://goo.gl/8FmA1l>. Acesso em: 09 de abr. 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução-RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 ago. 2013. Disponível em <http://goo.gl/oqEs0B>. Acesso em: 01 abr. 2015.
- ALFASSI, Z. B. Chemical analysis by nuclear methods. New York: John Wiley & Sons, 1994a. 556 p.
- ALFASSI, Z. B. Determination of trace elements. Weinheim: Balaban Publishers & VCH, 1994b. 607 p.
- ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos: teoria e prática. 5. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT ISO GUIA 30:2011 – Termos e definições relacionados com materiais de referência, em substituição da ISO Guide 30:1992. Rio de Janeiro, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT ISO GUIA 31:2004 – Materiais de referência - Conteúdo de certificados e rótulos, em substituição da ISO Guide 31:2000. Rio de Janeiro, 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT ISO GUIA 32:2000 – Calibração em química analítica e uso de materiais de referência certificados, em substituição da ISO Guide 32:1997. Rio de Janeiro, 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT ISO GUIA 33:2002 – Utilização de materiais de referência certificados, em substituição da ISO Guide 33:2000. Rio de Janeiro, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT ISO GUIA 34:2012 – Requisitos gerais para a competência de produtores de materiais de referência, em substituição da ISO Guide 34:2009. Rio de Janeiro, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT ISO GUIA 35:2012 – Materiais de referência - Princípios gerais e estatísticos para certificação, em substituição da ISO Guide 35:2006. Rio de Janeiro, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ABNT ISO/IEC 17025: Acreditação de Laboratórios. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: <https://goo.gl/erSrxm>. Acesso em: 10 ago. 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. ISO/IEC 17043: Avaliação da Conformidade – Requisitos gerais para ensaios de proficiência. Rio de Janeiro, 2011.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N. Quantu – design and development of a software package dedicated to k₀-standardized NAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Budapest, v. 257, n. 3, p. 577 582, 2003.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N.; FRANÇA, E. J. A semiempirical approach for the determination of HPGe detector photopeak efficiency aiming at k₀-INAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Budapest, v. 245, n. 1, p. 209 215, 2000.

BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N.; OLIVEIRA, H. Brazilian experience on k₀ standardized neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Budapest, v. 245, n. 1, p. 217 222, 2000.

BOSSU, C. M.; SOUZA, G. B. de; SILVA, P. H. T. da; NOGUEIRA, A. R. de A.; DEL SANTO, V. R. Ensaio de proficiência em laboratórios de nutrição animal para amostras de feno de alfafa e sal mineral candidatas a material de referência. In: *Jornada Científica. 2009, São Carlos. Anais...* São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste e Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.* Disponível em: <http://goo.gl/W5pkl>. Acesso em: 10 maio 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 369, de 29 de 04 de setembro de 1997. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 de setembro de 1997, Seção 1, p. 19699.* Disponível em goo.gl/7cQoMr. Acesso em: 20 maio 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal RIISPOA. Art. 475, Rio de Janeiro, 1952. Disponível em <https://goo.gl/nZ34Ip>. Acesso em: 15 maio 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. *Guia Alimentar Para a População Brasileira: Diretriz 5.* Brasília, DF, 2005. Disponível em <http://goo.gl/CDNthW>. Acesso em: 10 maio 2014.

CAMPOS, L. R.; TREPTOW, R. O.; SOARES, G. J. D. Influência da inertização com nitrogênio na vida de prateleira de leite em pó integral acondicionado em embalagens metalizadas flexíveis. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 2, n. 2, 130-137, 1998. Disponível em: <https://goo.gl/AhgNax>. Acesso em: 27 nov. 2016.

CENTRO INTEGRADO DE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DOS ALIMENTOS – CQUALI - LEITE. Composição química do leite. Brasília, DF, 2008. Disponível em <http://goo.gl/uClth2>. Acesso em: 09 maio 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline*. 3. ed. Washington, DC, 2015. (Note: CLSI code EP28-A3C replaced C28-A3C).

CODE OF REFERENCE MATERIALS - COMAR. *International Database for Certified Reference Materials*. Berlin, 2014. Disponível em <http://www.comar.bam.de>. Acesso em: 04 jun. 2014.

DE CORTE, F. The standardization of standardless NAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Budapest, v. 248, n. 1, p. 13-20, 2001.

DYBCZYNSKI, R. Preparation and use of reference materials for quality assurance in inorganic trace analysis. *Food Additives & Contaminants*, Varsóvia, v. 19, n. 10, p. 928-938, 2002.

EHMANN, W. D.; VANCE, D. E. *Radiochemistry and nuclear methods of analysis*. New York: John Wiley & Sons, 1991. 531 p.

EUROPEAN REFERENCE MATERIALS – ERM. Two new certified milk powder reference materials. Geel, Belgium, 2013. Disponível em <http://goo.gl/Nqg5i3>. Acesso em: 07 maio 2014.

FAO. FAOSTAT. Disponível em <https://goo.gl/5WVyhR>. Acesso em 05 nov. 2016.

FRANÇA, E. J.; FERNANDES, E. A. N.; BACCHI, M. A. Ni-Cr alloy as neutron flux monitor: composition and homogeneity assessment by NAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Budapest, v. 257, n. 1, p. 113-115, 2003.

FRANÇA, N. A. G.; MARTINI, L. A. *Funções plenamente reconhecidas de nutrientes – Cálcio*. 2. ed. São Paulo: ILSI, 2014.

GREENBERG, R. R.; BODE, P.; FERNANDES, E. A. N. Neutron activation analysis: a primary method of measurement. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, London, v. 66, n. 3-4, p. 193-241, 2011.

HERZIG, R.; REHNERT, A.; KORHAMMER, S.; KUMPULAINEN, J.; SCHRAMEL, P.; MUNTAU, H. Certification of a new cabbage reference material for the quality control of trace element determinations with some considerations on moisture. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Amsterdam, v. 21, n. 11, p. 746-761, 2002.

HUBER, P. J.; RONCHETTI, E. M. *Robust statistics*. 2. ed. Hoboken: Wiley, 2009.

INSTITUTE OF MEDICINE – IOM. 2011. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium Food and Nutrition Board. Washington, D.C., 2011. DOI 10.17226/13050.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA – INMETRO, Informação ao Consumidor. Leite em Pó Integral, 1998. Disponível em <http://goo.gl/5Q1e1q>. Acesso em 18 junho 2014.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF. The Economic Importance of Dairying, IDF Factsheet, 2013. Disponível em <https://goo.gl/X6c5qt> . Acesso em 15 nov. 2016.

INTERNATIONAL FARM COMPARISON NETWORK – IFCN. 11th IFCN Supporter Conference. Kiel, 2013.

ISO. ISO Guide 13.528:2005. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons, Geneve, 2005, 107 p.

ISO. ISO/IEC-17043:2010. Conformity assessment-general requirements for Proficiency Testing, 2010.

KAARLS, R.; QUINN, T.J. The Comité Consultatif pour la Quantité de Matière: a brief review of its origin and present activities. Metrologia, Berlin, v. 34, n. 1, p. 1 5, 1997.

LATICINIO.NET. Leite em pó e suas características. Juiz de Fora, 2016. Disponível em goo.gl/TCz2BL. Acesso em: 15 set. 2015.

METTLER-TOLEDO AG, Laboratory & Weighing Technologies. Métodos de aplicação HB43-S, p. 09, 2008.

MILLER, W. G. The role of proficiency testing in achieving standardization and harmonization between laboratories. Clinical Biochemistry, Amsterdam, v. 42, n. 4 5, p. 232-235, 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY – NIST. Material Measurement Laboratory, Standard Reference Materials. SRM Order Request System. Disponível em: <https://goo.gl/hRVLGu>. Acesso em: 09 dez. 2016.

OLIVEIRA, M. N. Tecnologia de produtos funcionais. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

PARRY, S. J. Activation spectrometry in chemical analysis. New York: John Wiley & Sons, 1991. 234 p.

PASCHOAL, V.; MARQUES, N.; SANT’ANNA, V. Nutrição clínica funcional: suplementação nutricional. São Paulo: Valéria Paschoal Editora, 2015. v. 2.

PERRONE, Í. T.; OLIVEIRA, L. N.; FARIA, L. M. G. C. Aspectos tecnológicos da produção do leite em pó instantâneo. Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes, Juiz de Fora, v. 63, n. 361, p. 35-37, 2008.

PHILIPPI, S. T. Pirâmide dos alimentos – Fundamentos básicos da nutrição. 2a. ed. rev. Barueri: Editora Malone, 2014.

POLO, M.; KOMROFF, M. The travel of Marco Polo. New York: W. W. Norton & Company, 2003. 480 p.

PROGRAMA DE ACREDITAÇÃO PARA LABORATÓRIOS CLÍNICOS – PALC. Disponível em <http://goo.gl/oLP7Ha>. Acesso em 05 dez 2014.

REJ, R. Accurate enzyme-activity measurements – 2 decades of development in the commutability of enzyme quality-control materials. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, Lawrence, v. 117, n. 4, p. 352-364, 1993.

RICHTER, W. Comparability and recognition of chemical measurement results - an international goal. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, Berlin, v. 365, n. 7, p. 569-573, 1999.

RICOS, C. JUVANY, R. JIMÉNEZ, PERICH, C. Procedure for studying commutability validated by biological variation. *Clinica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 268, n. 1-2, p. 73-83, 1997.

SANTOS, C. *Estatística Descritiva - Manual de autoaprendizagem*, Lisboa: Edições Sílabo, 2007. 261 p.

SANTOS, L. G. C. *Confiabilidade metrológica da determinação de elementos tóxicos e essenciais em leite bovino de raças exploradas no Brasil*. 2009. 124p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SANTOS, L. G. C. *Supressão Compton na análise por ativação neutrônica instrumental de produtos agrícolas destinados à alimentação humana*. 2004. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SANTOS, M. V. *Qualidade do leite ao redor do mundo*. MilkPoint, Piracicaba, 24 nov. 2000. Disponível em: <https://goo.gl/2Wlwmy>. Acesso em 15 nov. 2016.

SAS INSTITUTE – *SAS/STAT 9.3 User's Guide*. Cary, NC, 2011.

SILVA, P. H. F. *Leite, aspectos de composição e propriedades*. *Química Nova na Escola*, São Paulo, n. 6, nov. 1997. Disponível em http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc_06/quimsoc.pdf. Acesso em: 23 set. 2015.

TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT - EAG DG RTD. *Metrology in chemistry*. Disponível em <http://goo.gl/6uQobH>. Acesso em: 03 maio 2014.

TOMBINI, H.; DALLACOSTA, M.C.; BLEIL, R. A. T.; ROMAN, J. A. Consumo de leite de vaca e derivados entre agricultores da região oeste do Paraná. *Alimentação e Nutrição*, Araraquara, v. 23, n. 2, p. 267-274, 2012.

USDA. Foreign Agricultural Service. *Dairy: World Markets in Trade*. Washington, DC, 2016. Disponível em <https://goo.gl/eNV7VW>. Acesso em: 28 out. 2016.

VENTURINI, K. S., SARCINELLI, M. F., SILVA, L. C. *Processamento do Leite*. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. *Boletim Técnico - PIE-UFES:02207*, 2007. Disponível em <https://goo.gl/O2BzmW>. Acesso em 15 nov. 2016.

VIDAL, A. G. V.; SANTOS, L. G. C.; BACCHI, M. A.; FERNANDES, E. A. N.; SANTOS, S. S. N. S. C. Otimização da deconvolução espectral para a determinação de Zn em folhas de plantas utilizando análise por ativação neutrônica. In: SIMPÓSIO DOS PÓS-GRADUANDOS DO CENA/USP, 8., 2015, Piracicaba. Ciência e sociedade: Interações, impactos e desafios; resumos. Piracicaba: CENA/USP, 2015. p. 56.

VOCABULÁRIO INTERNACIONAL DE METROLOGIA – VIM. Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. 1. ed. Rio de Janeiro: INMETRO, 2012. 52 p.

ZHU, K.; PRINCE, R. L. Calcium and bone. *Clinical Biochemistry*, Amsterdam, v. 45, n. 12, p. 936-942, 2012.