



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2015

**Marta Salomé
Arada Martins**

**Desenvolvimento de metodologias alternativas para
quantificação de micronutrientes em produtos de
nutrição infantil**



**Marta Salomé
Arada Martins**

**Desenvolvimento de metodologias alternativas para
quantificação de micronutrientes em produtos de
nutrição infantil**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, especialização em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação do Mestre Hugo Ricardo Viegas Gomes Costa, Responsável de métodos analíticos alternativos da fábrica da Nestlé de Avanca.

o júri

presidente

Prof. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor António de Sousa Barros
investigador associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo
professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus pais e ao meu irmão pelo amor incondicional, pelo apoio incomparável, pela compreensão de sempre e, acima de tudo, por nunca se cansarem de acreditar em mim.

À minha avó Isaura que, apesar de ter adoecido durante a elaboração deste trabalho, nunca se privou de partilhar o seu amor e ternura que me fortalecem e encorajam a dar sempre mais e mais de mim.

Ao meu avô Rogério pelo amor e manifestações de orgulho a cada meta por mim alcançada.

À minha avó Maria pelo amor e carinho de todas as horas e pelos seus conselhos de guerreira.

Às minhas primas Vanessa Almeida e Ana Almeida pelo indispensável apoio em momentos mais críticos desta etapa.

Aos meus amigos, pelo apoio e encorajamento transmitidos ao longo desta jornada. Um agradecimento especial à Mara Pereira, à Andreia Falcão e à Ana Santos com quem partilhei os melhores momentos desta fase da minha vida.

À minha orientadora institucional, Professora Doutora Ivonne Delgadillo pela prontidão com que aceitou coordenar este estágio, pela simpatia e pela análise crítica e científica deste trabalho.

Ao meu orientador na empresa, Mestre Hugo Costa pelo companheirismo, pelo acompanhamento próximo do presente trabalho, pela incansável disponibilidade e pelos ensinamentos preciosos que me transmitiu.

À Dra. Fátima Sodré, por ter proporcionado a realiza o deste estágio, por todo o apoio transmitido e pelo interesse demonstrado na progressão deste trabalho.

Ao Pedro Santos pelo companheirismo e por toda a confiança em mim depositada.

  In s Pinho pelo companheirismo e pelo seu incansável apoio durante todo o meu percurso na Nestlé.

Ao Filipe Silva pelo companheirismo e apoio   minha integra o.

  Fátima Vieira e ao Pedro Reis pelos ensinamentos de "ouro", pelo companheirismo, pelos grandes momentos de boa disposi o e pelo espírito de entreaajuda.

  Andreia Paço e ao Hugo Ferreira pela amizade construída, pelos momentos de boa disposi o e pela compreensão e apoio imprescindíveis durante todo o meu percurso na Nestlé.

A todos os colaboradores do Departamento de Qualidade da Nestlé, pelo companheirismo e por todos os momentos de boa disposi o essenciais   minha integra o.

Ao Ricardo Teixeira pela incansável disponibilidade e apoio prestado em diversas fases do presente trabalho.

A todos os operadores do sector III pela forma calorosa com que me acolheram.

A toda a equipa Nestlé por levarem o lema "Good food, Good life"   letra.

palavras-chave

XRF; FT-NIR; Farinhas infantis; Fortificação; Micronutrientes; Controlo de Qualidade.

resumo

As farinhas infantis, alimentos que se destinam a recém-nascidos e crianças até à idade pré-escolar, devem satisfazer todas as necessidades nutricionais que se verificam durante o período de crescimento e desenvolvimentos físico e mental desta faixa etária. Desta forma, são frequentemente adicionadas pré-misturas de vitaminas e minerais durante a sua produção (fortificação), de maneira a que a quantidade adicionada e a composição do produto final sejam concordantes com a legislação comunitária em vigor. A implementação, na linha de produção, de métodos alternativos de análise “amigos do ambiente” e passíveis de obter resultados rápidos acerca da composição nutricional dos produtos alimentares, mesmo antes destes serem embalados, permite reduções de tempo, custos e um melhor controlo do processo de produção. A espectroscopia FT-NIR e a espectroscopia de XRF são técnicas que permitem a quantificação de micronutrientes e possuem características fundamentais ao controlo rápido de processos.

Neste trabalho foram desenvolvidos modelos de calibração para quantificação de zinco, por espectroscopia de XRF, em três receitas de pré-misturas de vitaminas e minerais. Construíram-se dois modelos de calibração, um com um R^2 de 0,990 e um SEC de 26,624 mg/100g e outro com um R^2 de 0,927 e um SEC de 18,838 mg/100g. Estes resultados indicam que os modelos de calibração construídos são adequados e podem ser usados na determinação rápida do teor de zinco em pré-misturas de vitaminas e minerais. Foram também verificadas as rectas de calibração existentes para quantificação de cálcio e ferro por espectroscopia de XRF e quantificação de vitamina C por espectroscopia FT-NIR para aplicação nas novas receitas de pré-misturas de vitaminas e minerais.

keywords

XRF; FT-NIR; Infant cereals; Fortification; Micronutrients; Quality Control

abstract

Infant cereals, food that are intended to newborn and children up to preschool age should satisfy all the nutritional needs during the growth period and the physical and mental developments of this age group. Thus, pre-mixtures of vitamins and minerals are frequently added during its production (fortification), so that the added quantity and the composition of the final product are consistent with the European community current law. The implementation, in the production line, of "environment friendly" analysis's alternative methods capable of obtaining quick results about the nutritional composition of the food products, even before they are packed, allows time and money reductions and a better control of the production process. The FT-NIR spectroscopy and the XRF spectroscopy are techniques that allow the quantification of micronutrients and possess essential characteristics in the rapid control of processes. In this study, calibration models for zinc quantification in three formulations of vitamins and minerals pre-mixtures by XRF spectroscopy were developed. Two calibration models were built, one with a R^2 of 0.990 and a SEC of 26.624 mg/100g and another one with a R^2 of 0.927 and a SEC of 18.838 mg/100g. These results indicate that the built calibration models are suitable and can be used in the rapid determination of the zinc content in pre-mixtures of vitamins and minerals. It were also confirmed the existing calibration curves for calcium and iron quantification by XRF spectroscopy and for vitamin C quantification by FT-NIR spectroscopy for application in new prescriptions of vitamins and mineral pre-mixtures.

Abreviaturas

DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
DDRs	Doses Diárias Recomendadas
FAAS	Espectrofotometria de absorção atômica com chama
EDXRF	Fluorescência de raios X por dispersão de energia
EFSA	Agência Europeia para a Segurança Alimentar
FT-NIR	Infravermelho próximo com transformada de Fourier
HC	Hormona de crescimento
MCA	Analizador multicanal
NIR	Infravermelho próximo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCC	Ponto Crítico de Controle
Pré-mistura VM	Pré mistura de vitaminas e minerais
R²	Coefficiente de determinação
SEC	Erro padrão de calibração
WDXRF	Fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda
XRF	Fluorescência de raios X

Índice

Capítulo I

Introdução	1
1. A nutrição infantil	3
1.1 Importância de uma alimentação equilibrada na infância	3
1.1.1 O papel dos micronutrientes	5
1.1.1.1 O Ferro	6
1.1.1.2 O Cálcio	7
1.1.1.3 O Zinco	8
1.1.1.4 A Vitamina C	9
1.2 As farinhas infantis	10
2. A empresa	12
3. A garantia da qualidade em produtos de nutrição infantil	13
3.1 Controlo de qualidade no laboratório	14
3.2 Controlo de qualidade na linha de produção	15

Capítulo II

Objectivos	17
-------------------------	-----------

Capítulo III

Revisão da Literatura	21
4. Métodos de análise de referência	23
4.1 Determinação de vitamina C por titulação visual	23
4.2 Espectroscopia de absorção atómica com chama	25
4.2.1 Componentes principais do espectrofotómetro	25
4.2.1.1 Fonte de radiação	26
4.2.1.2 Modulador	26
4.2.1.3 Sistema de atomização	27
4.2.1.4 Monocromador	27
4.2.1.5 Detetor e Amplificador	28
5. Métodos alternativos de análise	28
5.1 Espectroscopia FT-NIR	29
5.1.1 Espectroscopia FT-NIR na determinação de vitamina C	30
5.2 Espectroscopia de XRF	31
5.2.1 O espectrofotómetro de XRF	33
5.2.1.1 Fonte de raios X	34
5.2.1.2 Filtros	34
5.2.1.3 Detetor	35
5.2.3 Espectroscopia de XRF na quantificação de minerais	35
6. Calibração de um método alternativo	36

Capítulo IV

Materiais e métodos	39
7. Amostragem e delineamento experimental	41

7.1	Elaboração das amostras experimentais	42
8.	Métodos de Análise de Referência	43
8.1	Quantificação de cálcio, ferro e zinco	43
8.1.1	Preparação de soluções.....	43
8.1.2	Preparação das amostras	43
8.1.3	Análise das amostras	44
8.2	Quantificação de vitamina C	46
9.	Métodos Alternativos de análise	46
9.1	Quantificação de cálcio, ferro e zinco	46
9.1.1	Condições de operação do equipamento.....	46
9.1.2	Preparação das amostras	47
9.1.3	Análise das amostras	48
9.2	Quantificação de vitamina C	49
10.	Análise estatística dos dados	49

Capítulo V

Resultados e discussão	51
1. Desenvolvimento experimental	53
1.1 Estudo da pressão a utilizar durante a preparação das amostras.....	53
1.2 Curvas de calibração para quantificação de Zinco em pré-misturas VM.....	55
1.2.1 Curva de calibração única para quantificação de Zinco em 3 pré-misturas VM	55
1.2.2 Curva de calibração para quantificação de Zinco em 2 pré-misturas VM.....	58
2. Resultados finais.....	64
2.1 Curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 76 e 98 ..	64
2.2 Curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75	66
2.3 Análise de pré-misturas da linha de produção.....	69
2.4 Análise da repetibilidade.....	75
2.5 Avaliação da qualidade dos resultados obtidos.....	77
3. Trabalhos preliminares e complementares desenvolvidos na empresa	80

Capítulo VI

Conclusões	83
-------------------------	-----------

Capítulo VII

Perspectivas Futuras	87
-----------------------------------	-----------

Capítulo VIII

Referências Bibliográficas	91
---	-----------

ANEXOS

ANEXO A	101
1. Quantificação do teor de cálcio em cereais de pequeno almoço	101
1.1 Curva de calibração única para quantificação de cálcio em 4 produtos diferentes.....	101
1.2. Curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos com cacau .	103
1.3 Curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos sem cacau ..	104

1.4 Análise de amostras de cereais de pequeno-almoço.....	107
ANEXO B.....	112
ANEXO C	112
ANEXO D	114

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Doses diárias recomendadas para crianças dos 0 aos 3 anos. Adaptado de [7].	4
Tabela 2 - Condições de operação usadas na digestão das amostras.	44
Tabela 3 - Condições de operação do espectrofotômetro de absorção atômica com chama.	45
Tabela 4 - Condições de operação do espectrômetro de XRF para análise de cálcio, ferro e zinco em pré-misturas vitamínicas.	47
Tabela 5 - Influência da pressão utilizada na preparação das amostras da pré-mistura 75 para análise por espectroscopia de XRF.	54
Tabela 6 - Características principais da curva de calibração única para quantificação de zinco em 3 pré-misturas VM.	56
Tabela 7 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM.	58
Tabela 8 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (com amostras experimentais).	60
Tabela 9 - Gamas de concentrações esperadas para as pré-misturas VM 76 e 98.	61
Tabela 10 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (com amostras experimentais de concentrações inferiores ao mínimo e superiores ao máximo das gamas de concentrações esperadas para as pré-misturas VM 76 e 98).	61
Tabela 11 - Análise comparativa entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para as amostras experimentais de concentrações de zinco mais elevadas.	63
Tabela 12 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (sem amostras experimentais de concentrações de zinco mais elevadas).	65
Tabela 13 - Características principais do intervalo de confiança da curva de calibração única para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (sem amostras experimentais de concentrações de zinco mais elevadas).	66
Tabela 14 - Análise comparativa entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para os modelos de calibração único e 75.	67
Tabela 15 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75.	68
Tabela 16 - Gama de concentrações esperada para a pré mistura VM 75.	68
Tabela 17 - Características principais do intervalo de confiança da curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75.	69

Tabela 18 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 98.	70
Tabela 19 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 76.	72
Tabela 20 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 75.	73
Tabela 21 - Resultados de repetibilidade obtidos para a pré-mistura VM 98.....	75
Tabela 22 - Resultados de repetibilidade obtidos para a pré-mistura VM 76.....	76
Tabela 23 - Resultados de repetibilidade obtidos para a pré-mistura VM 75.....	76
Tabela 24 - Ajuste dos modelos de calibração para determinação dos teores de cálcio, ferro e vitamina C em pré-misturas VM da nova receita.	81
Tabela 25 - Gamas de concentrações esperadas e composição dos cereais de pequeno-almoço.....	101
Tabela 26 - Características principais curva de calibração única para quantificação de cálcio em 4 produtos diferentes.	102
Tabela 27 - Características principais curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos com cacau.....	103
Tabela 28 - Características principais curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos sem cacau.....	105
Tabela 29 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para os modelos único e com cacau na quantificação de cálcio a amostras do produto A.	107
Tabela 30 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para os modelos único e com cacau na quantificação de cálcio a amostras do produto B.	109
Tabela 31 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para os modelos único e com cacau na quantificação de cálcio a amostras do produto B.	110
Tabela 32 - Concentrações esperadas vs. obtidas por FAAS para as amostras experimentais das pré-misturas VM 76 e 98.....	112
Tabela 33 - Concentrações esperadas vs. obtidas por FAAS para as amostras experimentais da pré-mistura VM 75.	113
Tabela 34 - Concentrações obtidas por FAAS e previstas por XRF na construção da curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 76 e 98.....	114
Tabela 35 - Concentrações obtidas por FAAS e previstas por XRF na construção da curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75.....	117

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da simplificação do processo de formulação de farinhas infantis.	11
Figura 2 - Esquema geral do processo de produção das farinhas infantis na fábrica da Nestlé de Avanca (adaptado de [42]).	12
Figura 3 - Reação entre o ácido ascórbico e o corante 2,6-diclorofenolindofenol na sua forma oxidada, adaptado de [50].	24
Figura 4 - Esquema geral de um espectrofotómetro de absorção atómica, adaptado de [54].	25
Figura 5 - Lâmpada de cátodo oco, adaptado de [54].	26
Figura 6 - Localização dos raios X no espectro electromagnético, adaptado de [70].	31
Figura 7 - Produção de radiação X, adaptado de [71].	32
Figura 8 - Esquema básico de um espectrómetro de raios X por dispersão de energia, adaptado de [71].	33
Figura 9 - Representação esquemática de um tubo de raios X (adaptado de [71]).	34
Figura 10 - Processo de compressão das amostras. 1 - Cilindro; 2 - Base do cilindro; 3 - Pistão; 4 - Disco metálico.	47
Figura 11 - Equipamento usado na preparação das amostras para análise no espectrómetro de XRF. A - prensa Hidráulica Atlas™ Power Specac, 25 t; B - Conjunto metálico; 1 - Cilindro; 2 - Base do cilindro; 3 - Pistão; 4 - Disco metálico	48
Figura 12 - Curva de calibração única para quantificação de zinco em 3 pré-misturas VM.	56
Figura 13 - Curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM.	59
Figura 14 - Curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (com amostras experimentais).	60
Figura 15 - Curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (com amostras experimentais de concentrações inferiores ao mínimo e superiores ao máximo das gamas de concentrações esperadas para as pré-misturas VM 76 e 98).	62
Figura 16 - Curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (sem amostras experimentais de concentrações de zinco mais elevadas).	65
Figura 17 - Curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75. ...	68
Figura 18 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 98.	71
Figura 19 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 76.	72

Figura 20 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 75.	74
Figura 21 - Representações gráficas da concentração esperada para as amostras experimentais versus concentração obtida por FAAS (esquerda) e XRF (direita) para a pré-mistura VM 76.....	77
Figura 22 - Representações gráficas da concentração esperada para as amostras experimentais versus concentração obtida por FAAS (esquerda) e XRF (direita) para a pré-mistura VM 98.....	78
Figura 23 - Representações gráficas da concentração esperada para as amostras experimentais versus concentração obtida por FAAS (esquerda) e XRF (direita) para a pré-mistura VM 75.....	79
Figura 24 - Curva de calibração única para quantificação de cálcio em 4 produtos diferentes.	102
Figura 25 - Curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos com cacau.	104
Figura 26 - Curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos sem cacau.	105
Figura 27 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na quantificação de cálcio de amostras do produto A através do modelo único (esquerda) e modelo com cacau (direita).....	108
Figura 28 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na quantificação de cálcio de amostras do produto B através do modelo único (esquerda) e modelo com cacau (direita).....	109
Figura 29 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na quantificação de cálcio de amostras do produto D através do modelo único (esquerda) e modelo sem cacau (direita).....	111

Capítulo I

Introdução

Os consumidores estão cada vez mais atentos e exigentes [1], este facto, juntamente com o aumento do controlo em termos de legislação no sector alimentar levou a que as indústrias começassem a controlar melhor os seus produtos antes de saírem para o mercado.

O principal objectivo da garantia de qualidade é controlar a qualidade dos alimentos e o processo que permite obter, no final, um produto com as características esperadas. Este controlo merece especial atenção se estivermos a falar de alimentos cujos destinatários são recém-nascidos e crianças.

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Garantia de Qualidade da fábrica da Nestlé sediada em Avanca, concelho de Estarreja.

1. A nutrição infantil

A dieta seguida pela criança na primeira fase do ciclo de vida tem um papel preponderante para o seu desenvolvimento futuro. Estudos revelam que as crianças desnutridas têm uma capacidade intelectual reduzida, o que dificulta a evolução dos seus potenciais produtivos como adultos. Para além disso, a desnutrição é a causa de 3,5 milhões de mortes anualmente [2, 3].

De forma a evitar este problema é fundamental que, logo após o nascimento, a criança seja sujeita a uma dieta alimentar rica e equilibrada.

1.1 Importância de uma alimentação equilibrada na infância

Os primeiros dois anos de vida representam uma fase de especial importância para um desenvolvimento físico e mental de sucesso de uma criança, uma vez que, é neste período de tempo que se verificam elevadas taxas de crescimentos somático e neural. Alguns estudos comprovaram que os lactentes entre os quatro e os seis meses de idade duplicam os seus pesos e triplicam e quadriplicam ao fim de um ano e dois anos, respectivamente [4]. Relativamente à altura, verifica-se que há um aumento de 50% ao longo do primeiro ano de vida. Também o crescimento neural tem uma grande expressão durante os primeiros dois anos de idade dando-se, durante este intervalo, um aumento de 75% do perímetro cefálico [5].

Esta elevada taxa de crescimento ocorre durante o início do ciclo de vida dos lactentes (crianças com menos de doze meses de idade) e prolonga-se até aos três anos de idade. Este grupo também possui elevadas taxas metabólicas que estão associadas a grandes quantidades de energia despendidas nas suas diversas atividades [6]. Neste contexto, é primordial que as crianças sigam uma dieta estritamente rigorosa e equilibrada de forma a satisfazer todas as necessidades nutricionais, assegurando-se, assim um crescimento físico, mental e cognitivo adequados.

Em suma, no momento da escolha da dieta a seguir pela criança é imprescindível fazer-se um balanço nutricional prévio para verificar se os alimentos a ingerir estão na proporção adequada e se contêm a quantidade de calorias e nutrientes (proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas e minerais) essenciais a um completo desenvolvimento da mesma.

Tabela 1 - Doses diárias recomendadas para crianças dos 0 aos 3 anos. Adaptado de [7].

Nutriente	Faixa Etária		
	0 a 6 meses	7 a 12 meses	1 a 3 anos
Energia (kcal/kg/dia)	108	98	95
Proteína (g/dia)	13	14	16
Cálcio (mg)	210	270	500
Fósforo (mg)	100	275	460
Magnésio (mg)	30	75	80
Vitamina D (µg)	5	5	5
Flúor (mg)	0,01	0,50	0,70
Timina (mg)	0,20	0,30	0,50
Riboflavina (mg)	0,30	0,40	0,50
Niacina (mg)	2	4	6
Vitamina B6 (mg)	0,10	0,30	0,50
Folato (mcg)	65	80	150
Vitamina B12 (mcg)	0,40	0,50	0,90
Ac Pantoténico (mg)	1,70	1,80	2
Biotina (µg)	5	6	8
Colina (mg)	125	150	200
Vitamina C (mg)	40	50	15
Vitamina E (mg)	4	6	6
Selénio (µg)	15	20	20
Vitamina A (µg RE)	400	500	300
Vitamina K (µg)	2	2,50	30
Ferro (mg)	0,27	11	7
Iodo (µg)	110	130	90
Zinco (mg)	2	3	3

As Doses Diárias Recomendadas (DDRs) foram definidas pelo *Food and Nutrition Board, Institute of Medicine* e correspondem a valores de referência para a ingestão saudável de nutrientes durante as várias fases do ciclo de vida [6]. As DDRs para crianças até aos três anos de idade estão representadas na tabela 1.

Durante a fase inicial da infância estas grandes necessidades nutricionais podem ser facilmente suprimidas através do consumo de leite materno e pela ingestão de farinhas de cereais enriquecidas em micronutrientes (vitaminas e minerais).

1.1.1 O papel dos micronutrientes

Os micronutrientes (vitaminas e minerais) são elementos essenciais ao bom desenvolvimento do ser humano, merecendo especial importância no início do ciclo de vida, onde se verificam elevadas taxas de crescimento [8]. As vitaminas e os minerais desempenham funções biológicas importantes no organismo, das quais se destacam: a mineralização óssea, a proteção de células e lípidos nas membranas biológicas e a regulação de reações enzimáticas [8]. A sua baixa ingestão ou redução da biodisponibilidade pode levar a deficiências, induzindo uma diminuição das funções corporais [8]. Por outro lado, quando ingeridos em concentrações superiores às necessárias para realizar as funções biológicas, podem provocar toxicidade [9].

A Agência Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) é o órgão responsável pelas recomendações em micronutrientes na Europa [10]. De todos os micronutrientes, esta rede europeia considera como fundamentais o ferro, o ácido fólico e a vitamina D [10]. No entanto, existem outros micronutrientes que, por terem funções muito importantes no desenvolvimento do recém-nascido, merecem especial destaque, entre eles o cálcio, o zinco e a vitamina C [6, 10].

1.1.1.1 O Ferro

O ferro está presente, no organismo humano, entre 4 a 5 g em adultos de peso igual a 70 kg [11]. Este elemento encontra-se presente, principalmente, no sangue e no tecido muscular. No sangue, pode ser encontrado nas moléculas de hemoglobina, onde é responsável pelo transporte de oxigénio dos pulmões para as células. No tecido muscular, está presente nas moléculas de mioglobina desempenhando funções importantes no metabolismo aeróbico [12, 13]. O metal pode também ser encontrado num vasto número de enzimas como: peroxidases, catalases, hidrolases e flavinas [12].

A exigência nutricional de ferro depende da idade e do sexo do indivíduo [12].

Segundo o Dec. Lei n.º 53/2008 de 25 de Março, o valor de referência de ferro para a rotulagem nutricional dos alimentos destinados a lactentes e crianças de pouca idade (crianças com idade compreendida entre 1 e 3 anos) é de 6 mg/100g de produto [14].

Duas formas de ferro podem ser encontradas nos alimentos: heme e não-heme. A forma heme existe, maioritariamente, na carne e no peixe e a não-heme nos cereais, frutas, vegetais e derivados do leite [13].

A deficiência em ferro é a desordem nutricional mais comum do mundo e acontece tanto nos países em desenvolvimento como nos países desenvolvidos [15]. A maior consequência da prevalência de concentrações reduzidas de ferro no organismo é a anemia [15]. O défice deste mineral nas crianças está também associado a outros sintomas como distúrbios de comportamento, diminuição da capacidade cognitiva, limitação da capacidade de aprendizagem e falta de atenção [16, 17].

A fortificação de alimentos é a solução mais vantajosa para a prevenção da deficiência em ferro [18]. No entanto, a fortificação deve ter em consideração aspectos sociais e de saúde, uma vez que a ingestão de ferro em excesso pode trazer graves consequências para o organismo. Alguns efeitos adversos são o aumento da probabilidade de desenvolvimento de cancro e do risco cardiovascular [19].

Diferentes formas de ferro podem ser usadas na fortificação de diversos produtos alimentares [19]. Estas formas podem ser agrupadas em quatro categorias principais: solúveis em água (como por exemplo o sulfato ferroso e o lactato ferroso); pouco solúveis em água mas solúveis em ácidos diluídos como o suco gástrico (fumarato de ferro); insolúveis em água e pouco solúveis em ácidos diluídos, como o pirofosfato de ferro e compostos protegidos (hemoglobina e EDTA de sódio férrico) [18].

O fumarato de ferro por ser bem absorvido e ter uma biodisponibilidade relativa alta é, frequentemente, usado na fortificação de farinhas infantis. No entanto, em produtos em que haja possibilidade de haver mudanças organolépticas, o pirofosfato de ferro apesar de apresentar biodisponibilidade menor tem mostrado resultados positivos [18].

1.1.1.2 O Cálcio

A quantidade total de cálcio presente no organismo humano de adultos é de cerca de 1500 g. O cálcio é um micronutriente essencial por estar envolvido em muitos processos biológicos, entre eles: formação e desenvolvimento do sistema ósseo, contração muscular e atividade das células cerebrais, mais concretamente na transmissão dos impulsos nervosos e no crescimento celular [10, 12]. A principal fonte de cálcio, na alimentação, é o leite e seus derivados, seguido das frutas, vegetais, cereais, carne, peixe e ovos [12]. O fornecimento adequado de cálcio é vital na fase inicial do ciclo de vida, durante a qual se verifica o crescimento do esqueleto [20].

Segundo o Dec. Lei n.º 53/2008 de 25 de Março, o valor de referência de cálcio para a rotulagem nutricional dos alimentos destinados a lactentes e crianças de pouca idade é de 400 mg/100g de produto [14].

A deficiência em cálcio é rara e apenas acontece em crianças que não ingerem leite ou produtos lácteos [20]. O baixo consumo de cálcio pelas crianças pode resultar em raquitismo e atraso de crescimento [21]. Por outro lado, o consumo em excesso de cálcio pode causar calcificações metásticas da córnea, rins e vasos sanguíneos. A hipercalcemia (concentração elevada de cálcio no

sangue) tem como sintomas principais sede, confusão mental, irritabilidade, perda de apetite, fadiga e fraqueza [22].

As formas de cálcio mais empregadas na fortificação de alimentos são o carbonato de cálcio, o acetato de cálcio e o monofosfato de cálcio [23]. O carbonato de cálcio é bem absorvido sendo, por isso, recomendado para o uso em fórmulas de nutrição infantil [24].

1.1.1.3 O Zinco

O zinco está presente em todos os órgãos, tecidos, fluidos e secreções do organismo num total de 2 a 4 g [11, 25]. Este mineral é um componente essencial de um vasto número de enzimas estando, por isso, envolvido em diversos processos metabólicos incluindo a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos [20]. Para além disso, o zinco tem um papel fundamental no crescimento e diferenciação celulares, em particular nos tecidos que tenham uma rápida diferenciação como é o caso dos tecidos do sistemas imunitário e gastrointestinal [22].

Boas fontes de zinco são a carne vermelha, o marisco, o leite e seus derivados e o arroz [20]. Grãos de cereais não refinados e legumes são ricos em fitatos, que reduzem a absorção de zinco. A absorção deste mineral pode também ser limitada pela ingestão de fosfatos, cálcio e grandes quantidades de ferro não heme [20].

Segundo o Dec. Lei n.º 53/2008 de 25 de Março, o valor de referência de zinco para a rotulagem nutricional dos alimentos destinados a lactentes e crianças de pouca idade é de 4 mg/100g de produto [14].

A deficiência em zinco afeta o metabolismo da hormona de crescimento (HC), podendo retardar o crescimento nas crianças [22, 26-28]. Outras manifestações possíveis são: dermatite, diarreia, distúrbios mentais, falta de apetite, alteração do paladar e sistema imunitário debilitado [20, 22, 29, 30]. Por outro lado, uma ingestão excessiva de zinco pode provocar sintomas como náuseas, vômitos, diarreia e febre. A longo prazo, a ingestão de quantidades

inadequadas de zinco pode interferir com o metabolismo de outros minerais, principalmente com o do cobre [31].

Na fortificação de alimentos com zinco estão disponíveis diversos sais, no entanto, devido ao baixo custo, os compostos mais frequentemente usados para este fim são o óxido de zinco e o sulfato de zinco [32].

1.1.1.4 A Vitamina C

A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel que desempenha funções importantes ao nível do metabolismo proteico, da biossíntese de moléculas e de alguns transmissores e ainda atua como um poderoso antioxidante [6, 33]. Na biossíntese de moléculas destacam-se o colagénio e a L-carnitina, responsável por transportar cadeias longas de ácidos gordos para as mitocôndrias [34]. Este composto é também necessário no transporte eficaz do ferro não heme, na redução de intermediários do ácido fólico e no metabolismo da hormona do stress (cortisol) [34].

As melhores fontes de vitamina C são as frutas e os vegetais, em particular os espinafres, os tomates, as batatas, os brócolos, as laranjas e outros citrinos [20]. O conteúdo em vitamina C é fortemente dependente de vários factores, entre eles: o calor, a luz e o oxigénio [20].

Segundo o Dec. Lei n.º 53/2008 de 25 de Março, o valor de referência de vitamina C para a rotulagem nutricional dos alimentos destinados a lactentes e crianças de pouca idade é de 25 mg/100g de produto [14].

A deficiência em vitamina C provoca sintomas como fraqueza, fadiga e gengivas inflamadas [20]. Por outro lado, quando ingerida em excesso apresenta toxicidade baixa, sendo o excesso de vitamina excretado pela urina [20].

A fortificação de vitamina C pode ter vários propósitos, entre eles a melhoria da estabilidade de outros micronutrientes adicionados, como por exemplo a vitamina A, ou ainda o aumento da absorção de ferro [22].

1.2 As farinhas infantis

O leite humano é o melhor alimento que, nos primeiros meses de vida, um recém-nascido pode receber. Além de diversas vantagens nutricionais e metabólicas, o leite materno desempenha funções importantes a nível psicológico e na saúde do lactente [35]. A composição do leite humano atende às necessidades nutricionais do recém-nascido propiciando uma perfeita adaptação da criança na vida pós-natal e adequado crescimento [36]. Todas estas vantagens levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a recomendar o seu consumo exclusivo durante os primeiros seis meses de vida dos recém-nascidos [37]. No entanto, a partir desta idade as necessidades nutricionais começam a ser cada vez mais exigentes e o leite materno torna-se insuficiente no fornecimento de toda a energia, proteínas e micronutrientes essenciais a um crescimento saudável da criança [10, 38]. Nesta fase, deve então ser iniciado o processo de diversificação alimentar de forma a que as exigências nutricionais do lactente sejam supridas e a possibilitar a transição entre a alimentação láctea exclusiva e a alimentação familiar [10]. A diversificação alimentar é, muitas vezes, iniciada com a introdução de farinhas infantis na dieta do lactente [10].

As farinhas infantis são alimentos produzidos industrialmente que se destinam ao consumo infantil e, devido à sua complexa composição, podem funcionar como complementos do leite humano [39]. São nutricionalmente ricas e contêm na sua composição macro e micronutrientes, entre os macronutrientes incluem-se proteínas, lípidos e hidratos de carbono e nos micronutrientes vitaminas e minerais [39].

Contudo, durante o processamento destes produtos, muitos destes nutrientes são perdidos, por serem sujeitos a certas condições de pH, oxigénio, humidade, luz e calor tornando-se, assim necessário proceder à sua reposição [40, 41]. Durante a fase de produção são, adicionadas pré-misturas de vitaminas e minerais de modo a, por um lado restaurar os nutrientes perdidos e, por outro lado, garantir que o nível de nutrientes está dentro dos limites estipulados pela legislação em vigor.

Todas as farinhas infantis produzidas na fábrica da Nestlé de Avanca são constituídas por: uma base de formulação idêntica, probióticos e uma pré-mistura

de vitaminas e minerais (pré-mistura VM). As pré-misturas são misturas compostas por carbonato de cálcio, um complexo de vitaminas e minerais, fumarato de ferro ou pirofosfato de ferro e aroma de baunilha.

Num passado recente, catorze receitas de pré-misturas eram usadas na formulação de catorze farinhas infantis diferentes. Com o objetivo de simplificar o processo, as catorze farinhas infantis produzidas na fábrica foram agrupadas, segundo a sua composição, em 3 grupos principais: farinhas infantis não-lácteas, farinhas infantis lácteas com banana e farinhas infantis lácteas sem banana, sendo que cada grupo está associado a uma determinada receita de pré-mistura VM.

Atualmente, existem assim apenas três receitas de pré-misturas VM diferentes (75, 76 e 98), sendo que cada uma delas é usada na formulação de um grupo de produtos com matriz semelhante (Figura 1).

Passado		Presente		
Produto	Pré-mistura VM	Produto	Grupo	Pré-mistura VM
Láctea Simples	Láctea Simples	Láctea Simples	Farinhas lácteas sem banana	98
Date Pieces	Date Pieces	Date Pieces		
Wheat Date	Wheat Date	Wheat Date		
Pêra	Pêra	Pêra		
Maçã	Maçã	Maçã		
Frutos A	Frutos A	Frutos A	Farinhas lácteas com banana	75
Frutos Peças	Frutos Peças	Frutos Peças		
Láctea c/ Frutos	Láctea c/ Frutos	Láctea c/ Frutos		
Banana Laranja	Banana Laranja	Banana Laranja		
Banana	Banana	Banana	Farinhas não-lácteas	76
Mel	Mel	Mel		
Multifrutas	Multifrutas	Multifrutas		
Cacau	Cacau	Cacau		
Via Láctea	Via Láctea	Via Láctea		

Figura 1 - Representação esquemática da simplificação do processo de formulação de farinhas infantis.

Na preparação das pré-misturas, todos os ingredientes anteriormente referidos são pesados pelos operadores de linha numa balança, colocados num recipiente específico (tote) e misturados obedecendo a condições especificadas

na receita mestre. Esta etapa é um Ponto Crítico de Controlo (PCC) uma vez que existe perigo de sobredoseamento de vitaminas e minerais no produto final. Após a preparação da mistura, é retirada uma amostra para quantificação da concentração de alguns micronutrientes.

Se todos os parâmetros analisados estiverem dentro dos limites de especificação, a mistura é introduzida na linha de Dry-Mix, sendo adicionada progressivamente e controlada através de um doseador contínuo por perda de massa.

Simultaneamente à adição da pré-mistura VM são também doseadas quantidades determinadas de probióticos e base de produto. As bases de produto são produtos intermédios compostos por misturas de farinhas de cereais hidrolisados enzimaticamente por α e β amilases que, após a adição a seco de outros ingredientes, como o leite em pó, frutas desidratadas, probióticos e pré-misturas VM dão origem a produtos terminados (Figura 2).

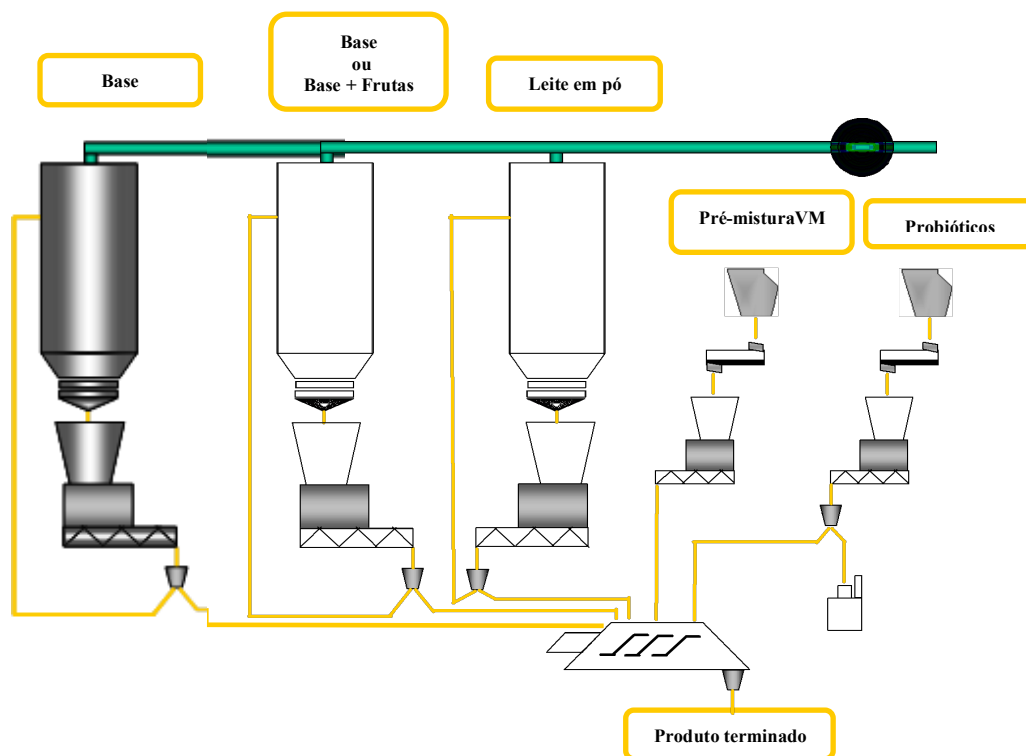


Figura 2 - Esquema geral do processo de produção das farinhas infantis na fábrica da Nestlé de Avanca (adaptado de [42]).

2. A empresa

A história da Nestlé começou na Suíça, quando em 1866 o farmacêutico alemão Henri Nestlé, preocupado com os elevados índices de mortalidade infantil, desenvolveu e lançou um produto especial para crianças. O produto a que designou por “farinha láctea” resultava de uma combinação entre leite de vaca, farinha e açúcar e reunia todos os nutrientes essenciais a uma alimentação saudável nos primeiros meses de vida.

Em 1905, a Nestlé iniciou a sua internacionalização ao instalar novas unidades fabris e ao adquirir ou juntar-se a empresas locais em diversos países. Impulsionado pela grave desnutrição infantil que se vivia em toda a Europa no início do século dezanove, o Professor Egas Moniz criou em Avanca, no ano de 1923, a “Sociedade de Produtos Lácteos, Lda” que mais tarde viria a ser o “coração” da Nestlé em Portugal. Desde então, a empresa tem conquistado a confiança dos consumidores, ao desenvolver produtos de alta qualidade e passíveis de ser consumidos durante todo o ciclo de vida.

A fábrica de Avanca produz, atualmente, farinhas infantis, cereais para toda a família, cereais de pequeno-almoço, bebidas solúveis, leite aglomerado em pó, natas refrigeradas e produtos para restauração.

Um dos princípios corporativos da empresa é a garantia da qualidade e segurança de todos os seus produtos: “o nome Nestlé representa em todo o mundo uma promessa ao consumidor de que os produtos são seguros e de elevada qualidade” [43].

3. A garantia da qualidade em produtos de nutrição infantil

Nos últimos tempos, tem-se assistido a um aumento das exigências dos consumidores na hora da compra de um novo produto alimentar. Conscientes que a alimentação desempenha um papel crucial na prevenção de diversas doenças, os consumidores procuram, no momento da escolha, não só por produtos seguros do ponto de vista alimentar como de elevada qualidade. Esta preocupação crescente com a saúde e a alimentação, bem como, a entrada do novo regulamento da rotulagem, Reg. nº 1169/2011 de 25 de Outubro de 2011,

aumentaram a necessidade das indústrias alimentares controlarem melhor os produtos que saem para o mercado [44].

A qualidade de um produto é, segundo *Multon e Davenas (1994)*, “a aptidão de um produto para bem nutrir”. Um alimento de elevada qualidade deve não só fornecer, em condições de segurança, a energia e nutrientes necessários a um bom funcionamento do organismo, como ser equilibrado do ponto de vista nutricional [45].

Como foi mencionado anteriormente, um dos princípios corporativos empresariais da Nestlé é precisamente a garantia da qualidade e segurança de todos os seus produtos. Assim, o controlo de qualidade é visto, nesta empresa, como a chave para o sucesso sendo, por isso, realizado em diversas fases do ciclo de produção, entre elas, na receção das matérias-primas, no decorrer do processo de fabrico e no produto terminado.

3.1 Controlo de qualidade no laboratório

O Departamento de Garantia de Qualidade, nomeadamente o laboratório físico-químico efetua diariamente diversos tipos de análises a produtos terminados, matérias-primas e produtos intermédios. São feitas análises para verificar o conteúdo em matéria gorda, proteínas, açúcares totais e em micronutrientes como o ácido ascórbico (vitamina C), riboflavina (vitamina B2) e minerais (cálcio, ferro, zinco, sódio e potássio). Para além disto, são ainda determinados os teores em humidade numa vasta gama de produtos, de cafeína em cafés solúveis e investigada a presença de micotoxinas (deoxinivalenol e aflatoxinas) em farinhas.

A realização sistemática destas análises permite averiguar se todos os nutrientes presentes, nos vários tipos de produtos, se encontram dentro do intervalo de concentração desejado, ou seja, se os valores obtidos nas amostras analisadas se encontram dentro dos parâmetros definidos legalmente. Desta forma, é assegurada a conformidade do produto com o estabelecido no respectivo rótulo.

No caso específico das pré-misturas VM (produtos intermédios utilizados neste trabalho), são realizadas, à entrada na fábrica das matérias-primas usadas nas suas formulações, determinações de cálcio, ferro, zinco e vitamina C pelos métodos de referência.

Muitas destas análises envolvem metodologias analíticas complexas, levando horas a obter resultados. A implementação na linha de produção de metodologias analíticas alternativas capazes de responder de forma rápida e precisa permite, deste modo, diminuir o tempo de análise e controlar melhor o processo de produção.

3.2 Controlo de qualidade na linha de produção

Como foi referido anteriormente, o controlo de qualidade realizado no laboratório envolve, quase sempre, metodologias complexas e muito demoradas. Ainda que um método laboratorial seja passível de fornecer um resultado dentro algumas horas após a recolha de uma amostra da linha de produção, toneladas de produto podem já ter sido produzidas/embaladas. Na eventualidade de um produto terminado enviado para o laboratório se encontrar fora das suas especificações é necessário proceder ao reprocessamento de todo o lote fabricado ou parte dele. Este cenário, numa empresa, apresenta-se como desfavorável, acarretando custos adicionais e atrasos no tempo de liberação dos seus produtos. Liberação é, de forma resumida, a autorização para colocar um dado produto no mercado por Garantia de Qualidade.

É também importante realçar, que o facto de uma amostra analisada de produto terminado de cada lote se encontrar dentro dos parâmetros aceitáveis não implica que toda a restante produção satisfaça essa condição [46]. Desta forma, é essencial que, para além do controlo de qualidade em produtos terminados se realizem, em plena linha de produção, análises rápidas a produtos intermédios. Esta prática permite controlar melhor o processo de produção, alertar e reagir mais rapidamente quando o processo está fora de controlo garantindo assim a conformidade dos produtos finais e prevenindo, de forma precoce, o reprocessamento de grandes quantidades de produto. No entanto este controlo

não poderia ser feito, pelas razões apresentadas anteriormente, recorrendo a metodologias de referência, tornando-se assim indispensável o desenvolvimento de metodologias alternativas passíveis de fornecer resultados em tempo reduzido.

A Nestlé não podia deixar de estar na vanguarda, sendo que alguns parâmetros físico-químicos de produtos terminados e produtos intermédios já são, hoje, avaliados por metodologias alternativas nas linhas de produção. De entre as análises realizadas, destacam-se a determinação do teor de humidade, matéria gorda, proteínas e açúcares em produtos terminados e matéria gorda em bases de produto. As tecnologias usadas têm sido alvo de grande sucesso, gerando resultados precisos em apenas alguns minutos, no entanto ainda são necessárias alcançar novas metas.

É pretendido que estas metodologias venham também a ser capazes de determinar, quase de forma instantânea, as concentrações de vários micronutrientes (cálcio, ferro, zinco e vitamina C) em pré-misturas VM incorporadas em produtos de nutrição infantil.

Capítulo II

Objetivos

O presente trabalho resulta de um protocolo de cooperação entre a Universidade de Aveiro e a Unidade de fabricação da Nestlé Portugal, sediada em Avanca.

O objectivo principal deste estágio em ambiente empresarial é:

- Desenvolver um modelo de calibração para quantificar o teor de zinco em três pré-misturas VM de produtos de nutrição infantil através de espectroscopia de fluorescência de raios X (XRF).

Como objectivos secundários pretende-se:

- Ajustar curvas de calibração no espectrómetro de XRF para determinação do teor de cálcio e ferro para as novas receitas de pré-misturas VM;

- Ajustar curvas de calibração no espectrómetro de Infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) para determinação do teor de vitamina C para novas receitas de pré-misturas VM.

Capítulo III

Revisão da Literatura

4. Métodos de análise de referência

Várias técnicas analíticas estão disponíveis para a determinação de micronutrientes e, a seleção da mais adequada é a chave para alcançar, resultados precisos e confiáveis. A seleção adequada requer uma compreensão básica de cada técnica, uma vez cada uma tem pontos fortes e limitações individuais.

A metodologia analítica de referência utilizada pela Nestlé para a quantificação de cálcio, ferro e zinco é a espectrofotometria de absorção atômica (FAAS) e para a quantificação de vitamina C é a titulação com DCPIP. Os dois próximos subcapítulos resumem os princípios teóricos de cada um dos métodos.

4.1 Determinação de vitamina C por titulação com DCPIP

O ácido ascórbico, mais vulgarmente conhecido por vitamina C, é um suplemento alimentar de elevada importância devido principalmente às suas propriedades antioxidantes [47].

A quantificação de vitamina C baseia-se, essencialmente na capacidade redutora que esta substância apresenta em contacto com outros compostos orgânicos [48]. Um dos métodos mais bem conhecidos que se fundamenta nesta característica é a titulação de ácido ascórbico com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), desenvolvido por Tillmans em 1936 [49].

A titulação é uma ferramenta analítica que consiste na utilização e medição do volume de uma solução padrão de concentração rigorosamente conhecida para determinar a concentração de um analito de interesse. Durante a titulação de ácido ascórbico com DCPIP, de acordo com documentação interna da Nestlé, o ácido ascórbico é previamente extraído sob a ação do ácido metafosfórico, de forma a evitar a sua auto-oxidação [50]. Em meio ácido, o ácido ascórbico reduz estequiometricamente o DCPIP, havendo alteração da sua cor inicial azul púrpura (forma oxidada) para incolor (forma reduzida). Durante esta reação, o ácido ascórbico é também oxidado a ácido dehidroascórbico [51].

O ponto de viragem da titulação pode ser detetado pela mudança de coloração da solução de incolor a rosa, conferida pelo excesso do indicador (DCPIP) não reduzido [51].

A quantidade de DCPIP gasta no decorrer da titulação é depois usada para calcular a concentração de ácido ascórbico presente em solução. A reação acima descrita encontra-se representada na figura que se segue.

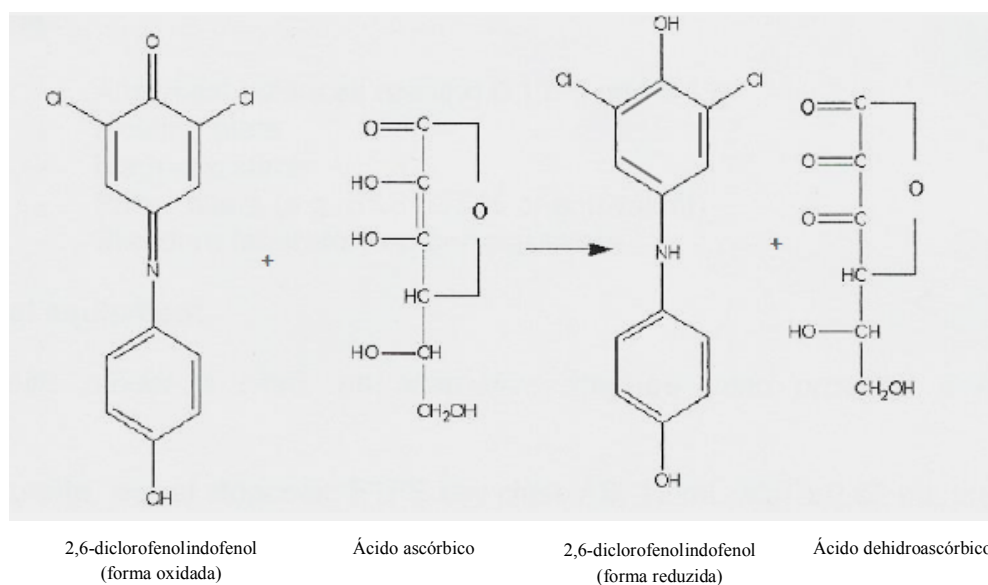


Figura 3 - Reação entre o ácido ascórbico e o corante 2,6-diclorofenolindofenol na sua forma oxidada, adaptado de [50].

A metodologia apresentada é usada diariamente na Nestlé para a determinação de vitamina C numa vasta gama de produtos. No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens: é uma metodologia bastante demorada que implica uma preparação complexa das amostras e a análise de soluções de coloração forte pode dificultar a detecção do ponto de viragem.

Apesar das suas desvantagens, este método é rotineiramente aplicado em todo o mundo na quantificação de vitamina C em vários produtos alimentares devido à sua simplicidade e baixo custo.

4.2 Espectrofotometria de absorção atômica com chama

A FAAS é, nos dias de hoje, uma das ferramentas mais importantes da química analítica. É uma técnica muito sensível que permite determinar o teor de vários minerais numa grande variedade de amostras. Se falarmos em minerais específicos como o cálcio, ferro e zinco os limites de detecção são 1 ng/mL para o cálcio e zinco, e 6 ng/mL para o ferro [52]. Esta técnica baseia-se na medição da absorção de energia pelos átomos.

Nesta metodologia as amostras são aspiradas para uma chama e atomizadas. De seguida, um feixe de radiação com um comprimento de onda adequado proveniente da lâmpada específica do elemento a medir atravessa os átomos que, ao absorverem essa energia transitam para um estado excitado [53, 54]. A percentagem de luz absorvida pelos átomos é proporcional à concentração do elemento a analisar, num determinado intervalo de concentrações [55]. A relação entre a percentagem de luz absorvida e a concentração de analitos presentes em padrões conhecidos é assim usada para determinar concentrações de minerais em amostras desconhecidas por medição da percentagem de luz que absorvem.

4.2.1 Componentes principais do espectrofotómetro

Os componentes fundamentais de um espectrofotómetro de absorção atômica compreendem: uma fonte de radiação, um modulador, um sistema de atomização, um monocromador, um detector e um amplificador (figura 4).

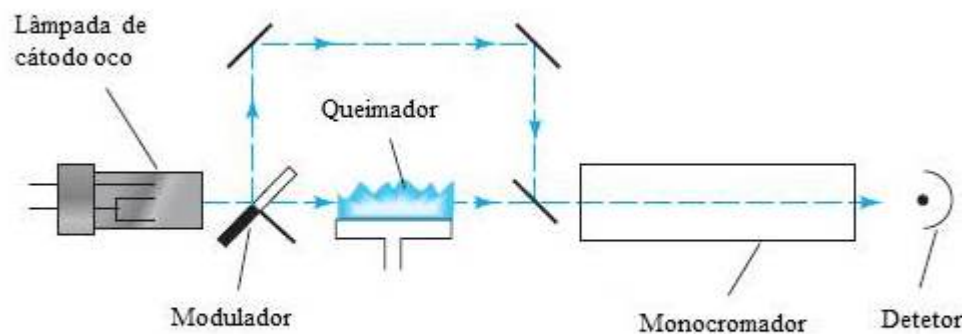


Figura 4 - Esquema geral de um espectrofotómetro de absorção atômica, adaptado de [54].

4.2.1.1 Fonte de radiação

A principal função deste componente é emitir radiação de comprimento de onda específico do elemento a analisar.

A fonte de radiação mais usada em FAAS é a lâmpada de cátodo oco (Figura 5). Esta lâmpada é constituída por um ânodo de tungsténio e um cátodo cilíndrico feito ou coberto com o elemento a analisar. O cátodo encontra-se selado a um tubo de vidro que contém no seu interior um gás inerte a uma pressão de 1 a 5 torr [54]. Quando é aplicada uma corrente eléctrica, o gás inerte ioniza e os respectivos iões são atraídos para o cátodo. Os iões de gás inerte ao bombardearem o cátodo excitam os iões metálicos que o compõem. Ao retornarem ao estado fundamental, os átomos emitem fotões com energia na mesma gama de luz absorvida pelos átomos do elemento a analisar [53].

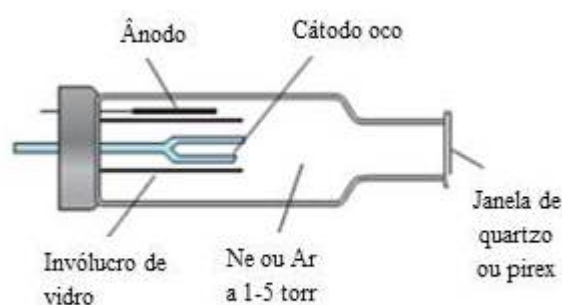


Figura 5 - Lâmpada de cátodo oco, adaptado de [54].

4.2.1.2 Modulador

Para além da radiação emitida pela lâmpada, a chama também emite radiação eletromagnética com o mesmo comprimento de onda a analisar. Uma vez que apenas a radiação proveniente da lâmpada interessa que seja absorvida pela amostra, torna-se necessário eliminar esta interferência. Para isso, recorre-se à modulação da radiação emitida pela lâmpada por interrupção do feixe, fazendo com que a radiação procedente da lâmpada atinja o detetor na forma de um sinal alternado. Os sinais alternados da lâmpada de cátodo oco e contínuo da

chama são convertidos em corrente eléctrica e, de seguida, um sistema electrónico elimina o sinal não modulado produzido pela chama. O sinal alternado é dirigido para um amplificador e, por fim para um dispositivo de leitura onde é lido [54].

4.2.1.3 Sistema de atomização

Para se dar a absorção atómica, é necessário que, numa primeira fase, a amostra a analisar seja atomizada, ou seja, que se produzam átomos livres no estado fundamental do elemento de interesse [56]. Este processo ocorre no sistema de atomização que é composto por um nebulizador, uma câmara de nebulização e um queimador [54].

A amostra em solução é aspirada através de um tubo capilar e convertida num aerossol no nebulizador. Depois disto, a amostra segue para a câmara de nebulização onde é misturada com o gás oxidante (ar) e o combustível (acetileno) de forma a produzir pequenas gotículas. A mistura anterior dirige-se para o queimador para se dar início ao processo de atomização. Por fim, no queimador as moléculas constituintes da amostra ao passarem por uma chama são dissociadas em átomos [56].

4.2.1.4 Monocromador

A principal função do monocromador é garantir que apenas a radiação de comprimento de onda específico do elemento a analisar está a ser medida. [53] O monocromador é, assim responsável por isolar a radiação electromagnética de interesse das outras demais radiações presentes no sistema [55]. Este elemento é constituído por duas fendas, uma de entrada e outra de saída e por um componente de dispersão. A radiação electromagnética entra pela fenda de entrada e dirige-se para o componente de dispersão onde é dispersada em todos os comprimentos de onda que a compõem. De seguida, a fenda de saída isola a radiação de comprimento de onda característico do elemento a determinar, deixando passar apenas esta em detrimento das outras [57].

4.2.1.5 Detetor e Amplificador

A radiação previamente isolada pelo monocromador é frequentemente detetada por um tubo fotomultiplicador (PMT) [53]. A este componente chegam alternadamente dois tipos de sinal: um sinal composto e um sinal simples. O sinal composto resulta das emissões de radiação pela fonte de radiação e pela chama e o sinal simples resulta apenas da emissão de radiação pela chama. Baseado na frequência de modulação é possível eliminar, por subtração, o sinal de interferência da chama [58]. O sinal de interesse, sinal com origem na fonte de radiação é, depois amplificado e processado num processador de sinal [54].

5. Métodos alternativos de análise

A realidade de uma legislação cada vez mais exigente, os custos elevados e os problemas ambientais decorrentes de processos de controlo de qualidade na indústria alimentar levaram ao desenvolvimento de métodos mais sofisticados e passíveis de obter resultados em tempo real.

A espectroscopia FT-NIR e a espectroscopia de XRF são técnicas que possuem características fundamentais ao controlo rápido de processos. Para além de permitirem a análise simultânea de vários componentes de um produto em apenas alguns segundos estas tecnologias apresentam inúmeras vantagens quando comparadas com outras mais tradicionais. De entre as vantagens destacam-se:

- são tecnologias rápidas, fiáveis e que originam resultados precisos;
- exigem pouca ou nenhuma preparação das amostras;
- não consomem reagentes;
- são pouco dispendiosas, sendo apenas necessário investir na compra do equipamento e na sua manutenção;
- são métodos “amigos do ambiente” não gerando resíduos tóxicos durante a sua execução;
- podem ser colocadas na linha de produção e manuseadas por pessoal não qualificado.

Todas estas vantagens levaram a Nestlé a eleger a espectroscopia FT-NIR e a espectroscopia de XRF como métodos alternativos à titulação visual e à FAAS-chama na quantificação de vitamina C e na quantificação de minerais (cálcio, ferro e zinco), respectivamente.

5.1 Espectroscopia FT-NIR

Em 1800, William Herschell realizou uma investigação que tinha como objetivo principal quantificar a energia associada a cada cor do espectro de luz visível. Com este trabalho, Herschel descobriu que existia outro tipo de luz invisível até então desconhecida, a que designou por radiação infravermelha [46]. A radiação infravermelha localiza-se, no espectro electromagnético, entre a gama de comprimentos de onda da luz visível (800 nm) e microondas (100 μm) [59]. Esta região é geralmente dividida em três categorias diferentes: infravermelho próximo (0,8 - 2,5 μm), infravermelho médio (2,5 - 15 μm) e infravermelho longínquo (15 - 100 μm) [59].

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que se baseia nas vibrações dos átomos de uma molécula [60]. A radiação infravermelha, quando incide sob uma amostra, é absorvida pelas suas moléculas constituintes, promovendo a transição do estado electrónico fundamental para níveis vibracionais ou rotacionais. Diferentes tipos de vibrações e rotações moleculares conduzem à absorção de energia de comprimentos de onda e de frequências específicos que lhes vai permitir esta transição [46, 54]. As frequências de energia a que se dão estas vibrações dependem, entre outras razões, das forças das ligações presentes e da massa das moléculas da amostra [46]. Desta forma, cada frequência de vibração pode ser associada a um tipo específico de ligação química e, conseqüentemente, a uma determinada estrutura molecular [46, 60].

Os resultados desta técnica são espectros que evidenciam a fração de energia absorvida pela amostra a diferentes comprimentos de onda.

5.1.1 Espectroscopia FT-NIR na determinação de vitamina C

Nos últimos anos, a espectroscopia FT-NIR tem-se tornado uma técnica bastante popular entre as indústrias, com especial destaque para a indústria alimentar. Esta tecnologia permite, em apenas alguns minutos, fornecer resultados acerca da composição e propriedades de uma vasta gama de produtos alimentares [46]. Humidade, matéria gorda, proteínas e açúcares totais são algumas das análises já efectuadas, com grande sucesso, em farinhas, cereais, café e produtos lácteos usando esta técnica [46, 61].

Ao incidir numa amostra, a radiação de infravermelho próximo pode ser absorvida pelas vibrações fundamentais das ligações químicas O-H, C-H e N-H [61, 62].

O ácido ascórbico (vitamina C) encontra-se frequentemente presente na composição de muitos produtos de nutrição pueril, entre os quais as farinhas infantis. No entanto, muitos dos métodos usados na sua quantificação baseiam-se nas suas propriedades redox [63].

O método de referência usado pela Nestlé é, como referido anteriormente, a titulação visual, no entanto esta metodologia tem demonstrado ser bastante demorosa e susceptível a erros na apresentação final dos resultados. Em contraste, a espectroscopia FT-NIR é rápida, não-destrutiva, não necessita de uma preparação prévia das amostras e não faz uso de reagentes tóxicos apresentando-se, assim, como uma ferramenta interessante do ponto de vista analítico [64].

Blanco, M. *et al.* [63] demonstrou, em 1993, a aplicabilidade e funcionalidade da técnica FT-NIR na determinação do teor de vitamina C em preparados farmacêuticos. Também Yang, H. e Irudayaraj, J. [65] revelaram, em 2002, que era possível quantificar esta vitamina em misturas sólidas e soluções recorrendo à tecnologia FT-NIR. Mais recentemente, um trabalho de Pissard, A. *et al.* [64] mostrou resultados precisos quando foi aplicada esta metodologia na análise do conteúdo de vitamina C em maçãs.

O uso desta tecnologia, na quantificação de ácido ascórbico, fundamenta-se nas vibrações das ligações O-H e C-H, que são os principais componentes estruturais desta molécula [66]. Estas vibrações conduzem à absorção de energia

de comprimentos de onda específicos, sendo a fracção de radiação absorvida proporcional à concentração do componente de interesse a medir. Criando uma curva de calibração robusta (energia absorvida versus concentração do analito) e fazendo uma leitura rápida da amostra no espectrómetro FT-NIR, é possível determinar, com confiança, a concentração de um determinado componente.

5.2 Espectroscopia de XRF

Os raios X, descobertos em 1895 por Wilhelm Röntgen, são emissões energéticas que se localizam no espectro electromagnético entre as radiações gama (γ) e ultravioleta (Figura 6) [67, 68]. Este tipo de radiação caracteriza-se pela produção de ondas electromagnéticas de comprimentos de onda compreendidos entre os 0,01 e os 10,0 nm, correspondendo a uma energia de 0,125 a 125 quilo electrão-volt (KeV) [69].

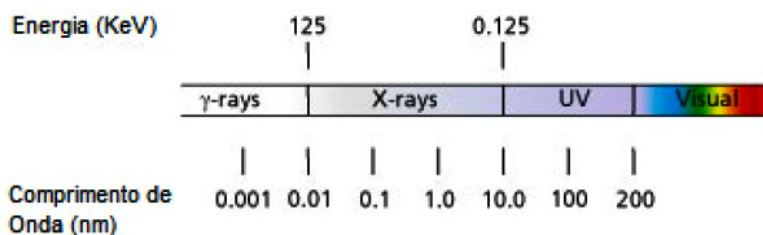


Figura 6 - Localização dos raios X no espectro electromagnético, adaptado de [70].

A espectroscopia de fluorescência de raios X (XRF) é uma ferramenta analítica que se baseia na interação dos raios X com a matéria a fim de extrair informações acerca da sua composição [69].

Os princípios teóricos desta técnica são simples e bem conhecidos. De uma forma geral, uma fonte de raios X ao irradiar uma amostra ioniza, por efeito fotoeléctrico, os níveis internos dos átomos que a constituem. Depois do processo de ionização, dá-se a reorganização do átomo e regresso ao estado fundamental acompanhada de libertação de energia através da emissão de um fóton X. A

libertação de energia resulta da diferença de energia de ligação dos níveis entre os quais se deu a transição [71].

Resumidamente, o processo de XRF pode ser descrito em três passos:

1) Um fóton, proveniente da fonte de raios X, é absorvido por um dos átomos da amostra e ocorre a libertação de um electrão de uma das orbitais que o rodeiam. A libertação do electrão ocorre uma vez que a energia incidente é superior à energia de ligação do electrão ao átomo;

2) A libertação e passagem do electrão para um estado de maior energia, gera um espaço vazio na orbital;

3) Para repor o equilíbrio, ou seja para readquirir a configuração electrónica mais estável, um electrão de uma orbital de energia superior é transferido para esse espaço. Neste processo há libertação de energia sob a forma de raio-X fluorescente (fluorescência) (Figura 7) [23, 71].

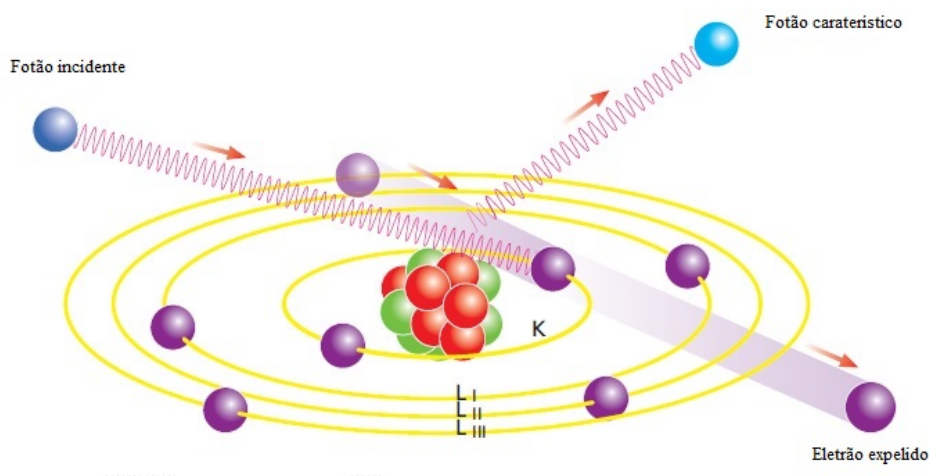


Figura 7 - Produção de radiação-X, adaptado de [71].

Uma vez que a radiação X emitida é característica de cada elemento e a sua intensidade proporcional à concentração do analito de interesse, a análise do espectro obtido possibilita a identificação e quantificação das espécies atômicas presentes numa determinada amostra [71]. Cada elemento possui orbitais electrónicas de energias características. Como mencionado anteriormente, após a retirada de um electrão interno, induzida pela fonte de radiação, é gerado um espaço vazio na orbital. Esse espaço é, de seguida, ocupado por um electrão

proveniente de uma camada electrónica de energia superior. Existe um número limitado de transições possíveis, sendo as mais tradicionais as transições das orbitais M e L para a orbital K e as transições da orbital M para a orbital L [23, 71].

Os raios X produzidos pelas transições da orbital L ($n=2$) para a orbital K ($n=1$) são designadas por raios X K-alfa ($K\alpha$) e os produzidos pelas transições da orbital M ($n=3$) para orbital K ($n=1$) são chamados de raios X K-beta ($K\beta$). As transições para as orbitais L ($n=2$), são designadas por raios X $L\alpha$ e $L\beta$, consoante a transição for originária nas orbitais M ($n=3$) ou N ($n=4$) respectivamente [72].

Existem duas variantes da espectroscopia de XRF: a fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) e a fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) [69]. A metodologia estudada neste trabalho é a EDXRF que, ao contrário da WDXRF permite a análise simultânea de vários elementos na mesma amostra. No entanto esta técnica apresenta uma resolução reduzida comparativamente à WDXRF [73].

5.2.1 O espectrómetro de XRF

Os espectrofotómetros de fluorescência de raios X baseiam-se em três conceitos básicos: uma fonte de raios X, uma amostra e um sistema de detecção (Figura 8). A fonte de raios X tem como principal função irradiar a amostra. De seguida, a radiação proveniente da amostra é medida por um detetor [71].

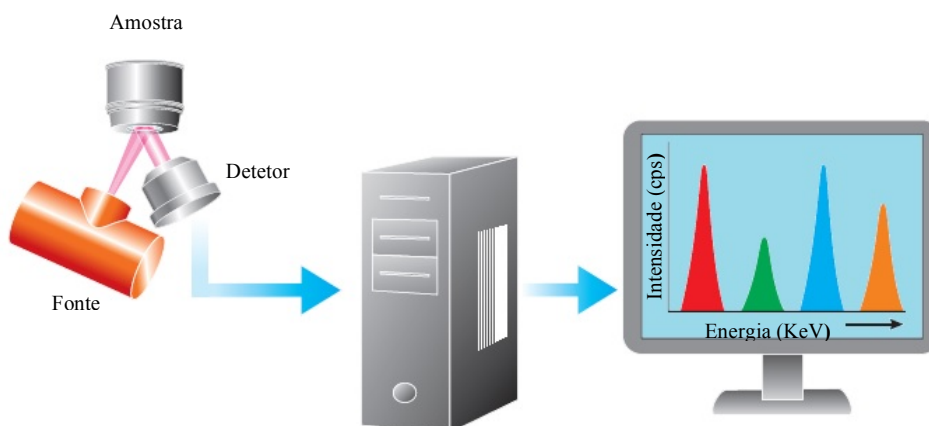


Figura 8 - Esquema básico de um espectrómetro de raios X por dispersão de energia, adaptado de [71].

5.2.1.1 Fonte de raios X

É um tubo de raios X constituído por um filamento e um ânodo que se encontram inseridos numa câmara de vácuo. Uma corrente eléctrica, de alta voltagem, é aplicada sobre o filamento, aquecendo-o e levando à emissão e aceleração de electrões em direcção ao ânodo. Assim que os electrões atingem o ânodo sofrem uma desaceleração, o que leva à emissão dos raios X. Os raios X deixam, depois, o tubo através de uma janela de Berílio, seguindo para a amostra (Figura 9) [71].

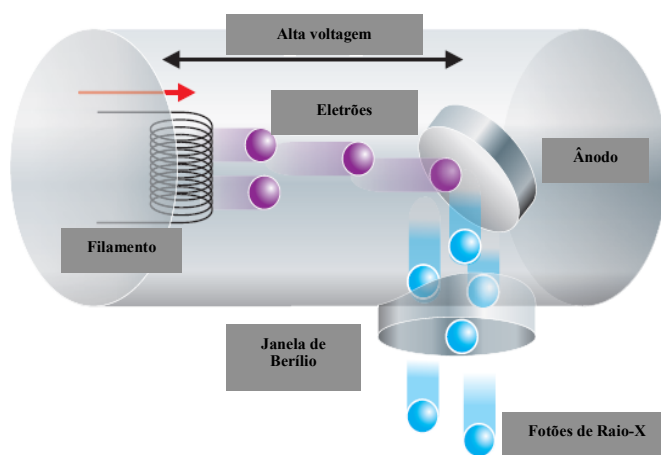


Figura 9 - Representação esquemática de um tubo de raios X (adaptado de [71]).

5.2.1.2 Filtros

Os filtros situam-se no caminho óptico entre a fonte de raios X e a amostra. São responsáveis por diminuir as interferências e o *background* contribuindo, assim, para melhorar a relação sinal-ruído que chega ao detetor [71]. Estes componentes são geralmente de alumínio ou bronze e possuem entre 100 e 1000 μm de espessura [71].

5.2.1.3 Detetor

O detetor é o elemento que permite detetar os raios X fluorescentes emitidos pela amostra. O detetor usado em EDXRF é um detetor de estado sólido. Este componente é constituído por um corpo de silício, germânio ou outro material semiconductor, uma janela de berílio e um prato colector [71].

Os fotões de raios X provenientes da amostra passam através da janela de berílio e atingem o corpo do detetor, levando à formação de pares de electrões. O número de electrões gerado depende da energia dos fotões, sendo que energias de fotões crescentes originam número de electrões crescentes [71]. De seguida, é aplicada uma corrente eléctrica de voltagem elevada com o intuito de atrair os electrões para a parte traseira do detetor e, por consequência, formar pulsos eléctricos. As alturas dos pulsos eléctricos formados são proporcionais ao número de electrões gerados no interior do detetor e à energia dos fotões que incide na janela de berílio [71]. Por fim, os pulsos eléctricos são amplificados e contados por um analisador multicanal (MCA) [71].

A unidade de contagem é então responsável por medir a energia dos fotões de raios X que chegam ao detetor em cada segundo (contagens por segundo-cps) e por convertê-la em picos de intensidade de áreas proporcionais às concentrações dos elementos de interesse na amostra [71].

5.2.3 Espectroscopia de XRF na quantificação de minerais

Entre muitos micronutrientes que compõem as pré-misturas, o ferro, o cálcio e o zinco podem ser usados como marcadores para assegurar a correta adição destas misturas ao produto final. Uma determinação rápida e precisa destes minerais numa fase precoce da produção pode ser um trunfo para a optimização e/ou modificação de parâmetros do processo e garantia do controlo da qualidade [74]. Metodologias como a FAAS são capazes de quantificar, com rigor, estes minerais em pré-misturas e produtos terminados. No entanto, a complexidade da preparação das amostras torna-a uma tecnologia morosa. Pelo contrário, a espectroscopia de XRF permite realizar medições diretamente em amostras

sólidas, não necessitando de qualquer preparação prévia. Para além disso, esta ferramenta analítica possui características que possibilitam a sua aplicação em plena linha de produção [75-77].

Estudos anteriores revelaram resultados muito satisfatórios no uso desta técnica na quantificação de minerais em fórmulas infantis e leites em pó, minimizando o risco do reprocessamento de produto [77, 78].

Uma outra investigação realizada no *Nestlé Research Centre* na Suíça demonstrou que esta tecnologia trata-se de um método rápido e fiável que pode ser usado na determinação das concentrações de ferro, cobre e zinco em pré-misturas de nutrição infantil [41].

A aplicação desta técnica é simples e não exige pessoal qualificado. Contudo, para que as concentrações de minerais de uma amostra retirada da linha de produção sejam rapidamente determinadas é necessário proceder à calibração do espectrómetro de XRF.

6. Calibração de um método alternativo

Uma fase muito importante da implementação de qualquer método analítico é a calibração e padronização do processo [54].

Em química analítica, a calibração é definida como uma operação que estabelece, sob condições específicas, uma relação entre as medições instrumentais e as concentrações do analito de interesse. A primeira etapa de um processo de calibração é a análise de amostras pela metodologia de referência. Estas amostras constituem o conjunto de calibração, pelo que devem ser rigorosamente seleccionadas de forma a se obter uma calibração robusta.

No processo de seleção das amostras do conjunto de calibração, devem ser incluídas amostras representativas da composição e concentração dos produtos que se pretendem analisar. Assim, a calibração deve ser ajustada à gama de concentração do analito que se pretende quantificar e, por outro lado, o mais extensa possível de forma a que, na eventualidade de serem doseadas quantidades incorretas dos elementos de interesse, durante o processo de

fabricação, o instrumento tenha a capacidade de dar uma resposta adequada e fiável [23, 79].

Relativamente ao número de amostras a incorporar na curva de calibração, o que se recomenda a nível das instruções laboratoriais da Nestlé é o uso de 25 a 30 amostras de calibração, analisadas em duplicado.

A segunda fase de um processo de calibração é a construção da curva de calibração. Uma vez analisadas pela metodologia de referência, as amostras de concentrações conhecidas do analito de interesse que se pretendem quantificar são analisadas pelos instrumentos alternativos e, para cada uma delas, é gerado uma intensidade de sinal. As intensidades dos sinais gerados pelo instrumento são geralmente proporcionais à concentração de analito presente o que possibilita a construção de uma curva de calibração, representando os sinais obtidos no eixo do y e as correspondentes concentrações no eixo do x. Estabelecida a equação da recta é possível, por interpolação, quantificar o analito de interesse numa amostra de concentração desconhecida [80].

Capítulo IV

Materiais e métodos

Os métodos abaixo descritos foram adaptados de instruções internas elaboradas pela Nestlé as quais descrevem, de forma detalhada, todos os procedimentos de análise referidos na realização desta dissertação. Perspectivando uma melhor compreensão e leitura do trabalho, serão apresentados, inicialmente a amostragem e o delineamento experimental e, apenas posteriormente, os métodos de análise de referência e os métodos alternativos de análise.

7. Amostragem e delineamento experimental

Para a construção de todas as curvas de calibração foram usadas amostras da linha de produção e, no caso das curvas de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM, para além destas também foram usadas amostras experimentais.

A preparação das amostras experimentais decorreu da necessidade de se aumentarem as gamas de concentrações de forma a, por um lado, melhorar a linearidade dos modelos de calibração e, por outro lado, permitir a detecção de possíveis erros na formulação das pré-misturas na linha de produção. Para além disso, estas amostras também contribuíram para uniformizar a distribuição de pontos ao longo das rectas e, conseqüentemente aumentar a robustez dos modelos de calibração.

Partindo das receitas originais das três pré-misturas VM estudadas neste trabalho (75, 76 e 98), realizou-se uma folha de cálculo capaz de, mediante a introdução do valor que se pretendia obter para a concentração de zinco, fornecer a quantidade exata a pesar de cada componente da receita. De uma forma geral, aquando da preparação de amostras de pré-misturas de concentrações de zinco inferiores às da linha de produção foram diminuídas as quantidades pesadas do elemento ativo (complexo de vitaminas e minerais), respeitando as proporções de todos os restantes ingredientes da receita. Na preparação de amostras de concentrações de zinco superiores às da linha de produção o procedimento seguido foi semelhante, tendo-se diminuído as quantidades pesadas do complexo de vitaminas e minerais e aumentado as quantidades dos restantes componentes.

Assim, após uma análise prévia das curvas de calibração inicialmente geradas com as amostras da linha de produção, fez-se um planeamento das concentrações que se pretendiam obter para as amostras experimentais de maneira a que, todos os valores obedecessem, sempre que possível, a um intervalo regular. Com o intuito de se obterem resultados o mais fidedignos possíveis prepararam-se, para cada concentração delineada duas amostras de pré-mistura.

De seguida, será feita uma descrição mais detalhada do procedimento seguido para a preparação das amostras experimentais.

7.1 Elaboração das amostras experimentais

Na preparação das amostras experimentais, tentou-se reproduzir ao máximo todas as condições verificadas na elaboração das amostras da linha de produção. Assim, dependendo da denominação da pré-mistura (75, 76 ou 98) foram pesadas, para o interior de um misturador metálico, as quantidades necessárias de todos os ingredientes constituintes de cada receita, perfazendo um total de 100 g de amostra. De forma a evitar que os componentes que apresentavam menor proporção na mistura se fixassem às paredes do misturador, aquando da pesagem de todos os componentes, pesaram-se, em primeiro lugar, os componentes que apresentavam proporções maiores na mistura.

Após a pesagem, as amostras foram misturadas usando um homogeneizador *Retsch Grindomix GM200* durante 60 s a 5000 rpm. Depois de devidamente misturadas, as amostras foram transferidas para saquetas metálicas que foram soldadas termicamente e mantidas à temperatura ambiente até se proceder às respectivas análises.

8. Métodos de Análise de Referência

8.1 Quantificação de cálcio, ferro e zinco

A metodologia analítica de referência da Nestlé usada na quantificação de cálcio, ferro e zinco é a FAAS. De seguida, irá ser apresentado todo o procedimento realizado na análise de amostras por esta metodologia.

8.1.1 Preparação de soluções

Para ser possível a aplicação desta metodologia, foi necessário proceder à preparação de algumas soluções, entre as quais:

- solução de lantânio (5% (v/v));
- soluções mãe de cálcio (100 µg/mL), ferro (100 µg/mL) e zinco (20 µg/mL);
- soluções de calibração de cálcio e ferro (entre 0 e 5 µg/mL);
- soluções de calibração de zinco (entre 0 e 2,5 µg/mL).

A preparação das soluções de calibração de cada elemento foi realizada através de diluições sucessivas das respectivas soluções mãe com água ultrapura (18,2 MΩ.cm) e 10 mL de ácido nítrico concentrado 65% (v/v) até perfazer um volume final de 100 mL.

8.1.2 Preparação das amostras

Após terem sido preparadas as soluções acima referidas, iniciou-se a etapa de preparação das amostras. Esta etapa consiste na hidrólise ácida das amostras com ácido nítrico. Em vasos de tetrafluormetaxil pesou-se, em duplicado, 0,500 g de amostra de pré-mistura e transferiu-se para cada vaso 5 mL de ácido nítrico 65% (v/v) e 0,5 mL de peróxido de hidrogénio 30% (v/v).

De seguida procedeu-se à digestão ácida das amostras com o equipamento de micro-ondas MLS-1200, durante 23 min. As condições de operação do programa selecionado para a digestão das amostras estão representadas na tabela 2.

Relativamente à preparação das amostras de cereais de pequeno- almoço para análise de cálcio por FAAS o procedimento foi idêntico, no entanto pesou-se 1,000 grama de amostra e, imediatamente antes da pesagem procedeu-se à moagem das amostras no moinho *Retsch Grindomix GM200*.

Tabela 2 - Condições de operação usadas na digestão das amostras.

Etapa	Potência das Micro-ondas (W)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	700	180	12
2	700	180	10
3	0	50	1

Após a digestão, os vasos de tetrafluormetaxil foram colocados em repouso durante cerca de 30 min, antes de serem abertos. De seguida, o conteúdo dos vasos foi transferido para balões volumétricos e diluído com água ultrapura (18,2 MΩ.cm) até perfazer um volume final de 50 mL. Para que as concentrações finais das amostras a analisar se encontrassem entre as concentrações mínimas e máximas das soluções de calibração preparadas para cada elemento, procedeu-se à diluição das amostras com água ultrapura (18,2 MΩ.cm) até um volume final de 100 mL, considerando como volume inicial, os 50 mL anteriormente preparados. Na preparação das amostras para a análise de cálcio, para além de água ultrapura foram também adicionados 5 mL de solução de lantânio 5% (v/v). Os fatores de diluição usados variaram consoante as concentrações esperadas para o elemento a analisar nas amostras.

8.1.3 Análise das amostras

Finalizada a etapa anterior, preparou-se o espectrofotómetro para a análise das amostras. Para cada elemento: otimizaram-se a posição do queimador, a taxa de fluxo de gás e a taxa de fluxo do nebulizador, selecionou-se a lâmpada de cátodo oco correspondente, ajustou-se o comprimento de onda da lâmpada

selecionada e, quando necessário, ligou-se o ruído de fundo (*background*). Na tabela seguinte estão representadas as condições do espectrofotômetro usadas para a análise de cada elemento.

Tabela 3 - Condições de operação do espectrofotômetro de absorção atômica com chama.

Elemento	Condições da Chama	Comprimento de onda (nm)	Background
Cálcio	Ar/acetileno (oxidante)	422,7	Desligado
Ferro	Ar/acetileno (oxidante)	248,3	Ligado
Zinco	Ar/acetileno (oxidante)	213,9	Ligado

Após terem sido estabelecidas todas as condições de análise, a lâmpada do elemento a medir e a chama foram ligadas e, após cerca de 35 min construíram-se as curvas de calibração, representando no eixo das abcissas a concentração dos padrões em µg/mL e no eixo das ordenadas as respectivas absorvâncias. O instrumento efectua três medidas para cada amostra e fornece o valor médio o qual foi registado.

As concentrações das amostras em mg/100g foram calculadas com base na seguinte expressão:

$$\text{Concentração} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{[(C \times D) - B] \times V}{M \times 10}$$

Sendo,

- B – Concentração do branco, em µg/mL;
- C – Concentração do analito obtida, em µg/mL;
- D – Fator de diluição;
- V – Volume da solução inicial, em mL;
- M – Massa da amostra, em g;
- 10 – Fator de conversão de µg/mL para mg/100g.

8.2 Quantificação de vitamina C

A metodologia analítica de referência da Nestlé usada na quantificação de vitamina C é a titulação com DCPIP. A determinação do conteúdo em vitamina C de pré-misturas VM foi, assim, baseada no procedimento experimental detalhadamente descrito na respectiva instrução interna.

9. Métodos Alternativos de análise

9.1 Quantificação de cálcio, ferro e zinco

A metodologia alternativa da Nestlé usada na quantificação de cálcio, ferro e zinco é a espectroscopia de XRF.

O procedimento descrito de seguida foi baseado nas recomendações de uma instrução interna da Nestlé.

9.1.1 Condições de operação do equipamento

Antes de se ter iniciado a análise de amostras no espectrómetro de XRF foram definidas as condições de operação do instrumento: código do canal, nome da condição, voltagem, corrente, filtro, meio e tempo de análise.

O nome da condição define o intervalo de elementos da tabela periódica que foram alvo de análise e, uma vez que a potência é igual ao produto entre a corrente (μA) e a voltagem (kV), a alteração destes dois últimos parâmetros definiu a potência a que o instrumento operou. As escolhas do filtro e do meio definiram, respectivamente o tipo de filtro e o gás usados durante a medição das amostras. Normalmente as análises são realizadas com ar, no entanto o hélio pode ser usado na análise de elementos com baixo peso atómico. O tempo de análise definiu a duração, em segundos, de cada análise. Na tabela seguinte encontram-se representadas as condições de operação implementadas para a análise de cálcio, ferro e zinco no espectrómetro de XRF.

Tabela 4 - Condições de operação do espectrômetro de XRF para análise de cálcio, ferro e zinco em pré-misturas vitamínicas.

Elemento	Código do canal	Nome da condição	Voltagem (kV)	Corrente (μA)	Filtro	Meio	Tempo de análise (s)
Cálcio	Ca	<K-Zn>	20.00	250	Alumínio	Ar	120
Ferro	Fe						
Zinco	Zn						

9.1.2 Preparação das amostras

A preparação das amostras para análise no espectrômetro de XRF foi rápida e simples. Pesou-se $8,00 \pm 0,1\text{g}$ de amostra em pó para um conjunto metálico (figura 10) composto por um cilindro, uma base de cilindro, um pistão e um disco metálico e, depois de devidamente montado, colocou-se o mesmo na prensa *Hidráulica Atlas™ Power Specac*, 25 toneladas (t) (figura 11).

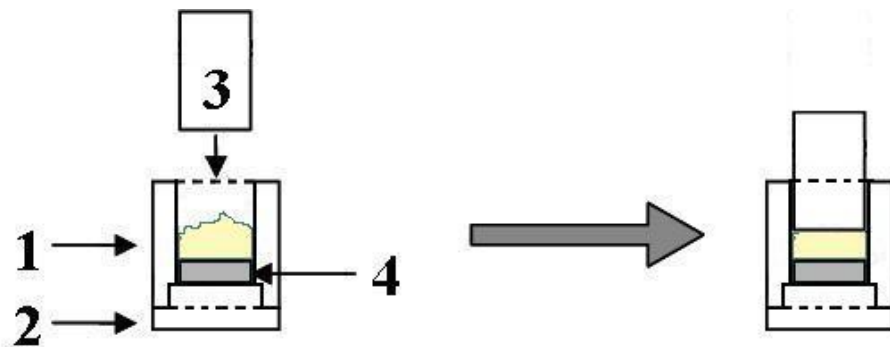


Figura 10 - Processo de compressão das amostras. 1 - Cilindro; 2 - Base do cilindro; 3 - Pistão; 4 - Disco metálico.

Regulada a pressão, as amostras em pó foram pressionadas em pastilhas compactas de 40 mm de diâmetro. Para as pré-misturas 98 e 76 foi aplicada uma pressão de 13 t enquanto que na pré-mistura 75 aplicou-se uma pressão de 3 t.

Na preparação das amostras dos cereais de pequeno almoço usou-se uma pressão de 10 t. O tempo de compressão para todos os produtos foi de um minuto. Todas as análises foram feitas em duplicado (duas pastilhas por amostra). Nenhum tratamento especial ou de secagem foi realizado nas amostras antes destas terem sido sujeitas à compressão.



Figura 11 - Equipamento usado na preparação das amostras para análise no espectrómetro de XRF. A - prensa Hidráulica Atlas™ Power Specac, 25 t; B - Conjunto metálico; 1 - Cilindro; 2 - Base do cilindro; 3 - Pistão; 4 - Disco metálico

9.1.3 Análise das amostras

A análise das amostras foi realizada pelo equipamento EDXRF *Minipal 4* da *PANalytical*. A cada amostra fez-se corresponder uma descrição e o valor médio de referência determinado por FAAS. Após a leitura das amostras, o instrumento forneceu uma resposta. Através do software *Minipal/Minimate* foram gerados

relatórios que tabelavam as concentrações de referência das amostras, as respostas instrumentais em contagens por segundo (cps) e as concentrações previstas pelo espectrómetro de XRF.

9.2 Quantificação de vitamina C

A quantificação de vitamina C em pré-misturas VM foi realizada pelo equipamento MPA (FT-NIR) da Bruker. A análise deste tipo de amostras foi efectuada em frascos de vidro de 22 mm de diâmetro. Depois de se ter preenchido cerca de $\frac{3}{4}$ de um frasco de vidro com a respectiva amostra, colocou-se o mesmo na posição de leitura do equipamento e procedeu-se à sua análise.

Todas as análises foram realizadas em duplicado.

10. Análise estatística dos dados

Após terem sido determinadas as concentrações de zinco de todas as amostras de pré-misturas VM em ambos os equipamentos (espectrofotómetro de FAAS e espectrómetro de XRF) foi avaliada, com recurso à estatística, a performance do método alternativo desenvolvido. Como resultado da análise das amostras, o software *Minipa/Minimate* do espectrómetro de XRF disponibilizou um relatório final, onde foram apresentados os valores médios de referência, os valores previstos pelo modelo criado pelo programa bem como as respectivas diferenças entre eles. Estes resultados foram tratados estatisticamente e foi realizada uma análise por regressão linear pela ferramenta estatística *Q-Stat*, propriedade da Nestlé. Aquando do tratamento estatístico, o programa *Q-Stat* identificou pontos com comportamento atípico (“outliers”), tendo sugerido a sua exclusão do conjunto amostral inicial. Sempre que estes pontos surgiram, de forma a tentar apurar as causas que levaram ao seu aparecimento, repetiram-se as análises, primeiramente pelo método alternativo e, quando necessário, pelo método de referência. De seguida, procedeu-se ao cálculo da nova regressão linear através do programa estatístico *Q-Stat*.

Capítulo V

Resultados e discussão

1. Desenvolvimento experimental

De forma a concluir o objectivo principal deste trabalho houve necessidade de se optimizarem algumas condições do processo de análise de amostras por XRF. Neste capítulo irá ser feita uma primeira abordagem de todos os estudos/procedimentos efectuados até se obterem os resultados finais, apresentados mais à frente.

1.1 Estudo da pressão a utilizar durante a preparação das amostras

Com a realização deste trabalho pretendia-se, como objetivo principal, o desenvolvimento de um modelo de calibração único para quantificar o teor de zinco em 3 diferentes pré-misturas VM usadas na formulação de produtos de nutrição infantil através de espectroscopia de XRF. Para isso, começou-se por determinar a concentração de zinco de diversas amostras destes produtos pelo método de referência (FAAS) e por espectroscopia de XRF e, por fim, fazer uma análise comparativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos.

Durante a preparação das amostras das três diferentes pré-misturas para análise por espectroscopia de XRF foi usada, numa primeira fase, uma pressão de 13 t, que demonstrou num estudo semelhante bons resultados [81]. Contudo, verificou-se que na preparação da pré-mistura 75 ao ser aplicada uma pressão de 13 t, apesar da quantidade pesada e do tempo de compressão terem sido rigorosamente controlados e iguais para os três produtos, não era possível retirar as amostras comprimidas (pastilhas) do conjunto metálico. Com a realização das primeiras pastilhas para análise no espectrómetro de XRF concluiu-se que a presença de amostra ou de alguma sujidade em torno do êmbolo do conjunto metálico dificultava o seu deslize e, conseqüentemente o desprendimento das mesmas. Ainda com a confirmação de que todo o conjunto metálico se encontrava limpo e sem vestígios de amostra em torno do êmbolo a dificuldade em retirar as pastilhas para posterior análise no espectrómetro de XRF persistiu o que indicou que outro motivo, como por exemplo a pressão utilizada, podia estar a influenciar o processo de preparação das amostras referentes à pré-mistura 75.

Houve então, necessidade de se rever este parâmetro a fim de se estabelecer a pressão mais indicada a aplicar a este produto. Desta forma, investigou-se a hipótese da pressão anteriormente aplicada ter sido demasiado alta ao terem sido preparadas várias amostras do mesmo produto e fazendo-se diminuir a pressão. A tabela seguinte relaciona a pressão utilizada e a sua influência na preparação das amostras da pré-mistura 75 para análise no espectrómetro de XRF (tabela 5).

Tabela 5 - Influência da pressão utilizada na preparação das amostras da pré-mistura 75 para análise por espectroscopia de XRF.

Pressão utilizada (t)	Influência na preparação das amostras
13 a 5	- Não foi possível retirar as pastilhas do conjunto metálico.
4	- Houve dificuldade em retirar as pastilhas do conjunto metálico.
3	- Foi possível retirar sem dificuldade as pastilhas do conjunto metálico; - Improbabilidade de destruição das amostras (pastilhas muito compactas).
2	- Foi possível retirar as pastilhas do conjunto metálico; - Probabilidade de destruição das amostras (pastilhas pouco compactas).
1	- Houve destruição das amostras (pastilhas muito pouco compactas).

Pela análise da tabela anterior concluiu-se pelo método tentativa-erro, que com a aplicação de uma pressão de 3 t na preparação de amostras de pré-mistura 75 era possível retirar, sem dificuldade, as pastilhas do conjunto metálico. Para além disso, as pastilhas formadas a esta pressão são muito compactas pelo que a probabilidade de destruição das amostras é reduzida. O facto de uma

pressão igual a 3 t nas pré-misturas 75 ter demonstrado ser suficiente para retirar, sem causar danos, as pastilhas do conjunto metálico, ao contrário das restantes pré-misturas (76 e 98) em que foi empregada uma pressão de 13 t levou a um estudo mais aprofundado da composição das mesmas.

Depois de se terem analisado todos os ingredientes que entram na constituição das três pré-misturas, concluiu-se que todas elas apresentavam uma composição muito semelhante, com exceção da pré-mistura 75 que, para além dos ingredientes em comum, possuía como ingrediente adicional maltodextrina sem glúten. A maltodextrina é um produto de hidrólise do amido, composto por ligações α -(1,4) e α -(1,6) de polímeros de D-glucose [82]. É conhecida pelas suas propriedades de agente estabilizante e ligante sendo, por isso, amplamente usada pelas indústrias alimentares na preparação de emulsões [83]. A presença deste componente na receita da pré-mistura 75 poderá, desta forma, contribuir para aumentar a ligação entre os outros componentes presentes, fazendo com que a compressão, sem destruição das amostras, seja possível aplicando uma pressão de apenas 3 t. Para além disso, este produto difere ligeiramente dos outros dois, no que respeita à textura visual. Observou-se, a olho nu, que esta pré-mistura apresentava coloração mais clara e que as partículas de pó que a constituíam eram mais pequenas, traduzindo-se num pó mais fino.

1.2 Curvas de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM

1.2.1 Curva de calibração única para quantificação de zinco em 3 pré-misturas VM

Ainda utilizando pressões diferentes (13 t para as pré-misturas 98 e 76 e 3 t para a pré-mistura 75) investigou-se a possibilidade de se construir um modelo de calibração único para quantificar o teor de zinco em amostras destes três diferentes produtos.

Durante a calibração de um instrumento existem diversos critérios que devem ser satisfeitos para se verificar a aplicabilidade e fiabilidade dos modelos matemáticos gerados, nomeadamente: o número de amostras usadas (n), a

distribuição uniforme de pontos ao longo da curva, o coeficiente de determinação (R^2), as diferenças entre os valores de referência e os valores alternativos, o valor do erro padrão de calibração (SEC) e a gama de concentrações. Na construção do modelo de calibração foram analisadas pelo método de referência e, posteriormente pelo espectrómetro de XRF, 45 amostras de pré-misturas oriundas da linha de produção. Os valores previstos pelo espectrómetro de XRF para as concentrações do conjunto amostral estudado foram comparados com os valores de referência e, através do programa estatístico *Q-Stat* da Nestlé foi gerado, por regressão linear, um modelo matemático. De seguida, encontram-se representadas as principais características do modelo criado (tabela 6) e a curva de calibração gerada pelo programa *Q-Stat* (figura 12).

Tabela 6 - Características principais da curva de calibração única para quantificação de zinco em 3 pré-misturas VM.

Curva de calibração	Gama de concentrações (mg/100g)		Modelo matemático	n	R^2	SEC (mg/100g)
	Min.	Máx.				
1	42,13	745,14	$Y=58,203+0,807X$	45	0,899	72,506

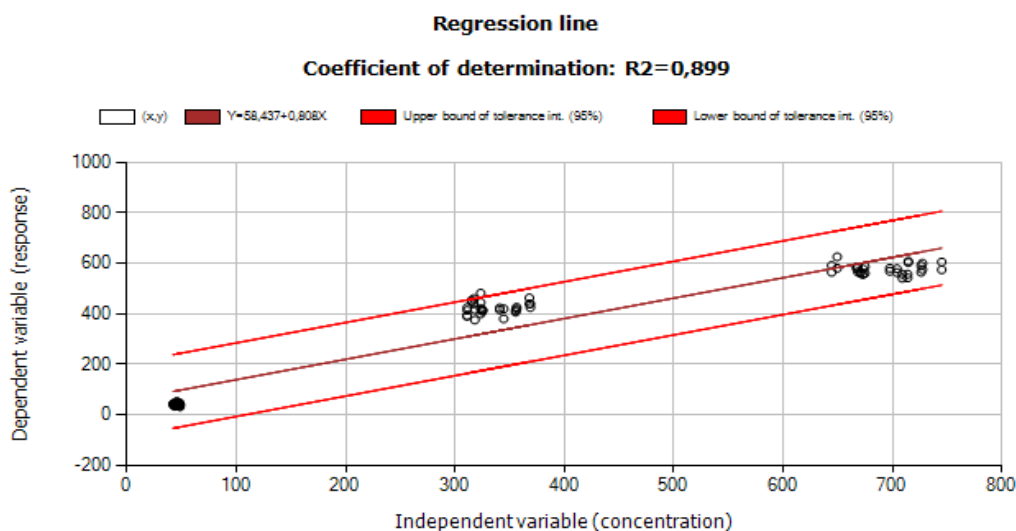


Figura 12 - Curva de calibração única para quantificação de zinco em 3 pré-misturas VM.

O número de padrões usados para a construção da curva de calibração anterior foi de 45, o que pelo motivo das amostras terem sido analisadas em duplicado no espectrómetro de XRF, potencializou a formação de 90 pontos o que vai de acordo com a norma da Nestlé que recomenda o uso de 25 a 30 amostras

[79]. A gama de concentrações é extensa, tendo como limites mínimo e máximo 42,13 mg/100g e 745,14 mg/100g respectivamente. O R^2 calculado foi de 0,899 sendo superior a 0,850 - limite mínimo aceite pela norma da Nestlé [79]. O SEC calculado para este modelo foi de 72,506 mg/100g.

Apesar do R^2 ser superior a 0,850 foi possível visualizar-se que os pontos situados no intervalo entre 300 e 400 mg/100g do eixo das abcissas, correspondentes à pré-mistura VM 75, tinham tendência a desviar-se do modelo matemático previsto, representando o conjunto de amostras com maiores diferenças entre os valores da concentração de zinco obtidos por FAAS e os previstos pelo espectrómetro de XRF.

Na calibração do espectrómetro de XRF, o sinal analítico corresponde à intensidade da radiação característica medida o qual, em condições ideais, deve ser proporcional à concentração do elemento na amostra que originou o sinal. No entanto, esta linearidade nem sempre se verifica, uma vez que há efeitos físicos e químicos da matriz das amostras utilizadas na calibração que interferem nesta medição. As físicas que podem afetar a matriz, destacam-se: o tamanho das partículas constituintes, a uniformidade e a homogeneidade e superfície da amostra. Os efeitos químicos podem resultar essencialmente da interferência entre os elementos constituintes da amostra [84]. Para alcançar os átomos do elemento a analisar, os raios X provenientes da fonte devem atravessar, em primeiro lugar, os átomos que estão acima destes e a fluorescência emitida pelos átomos de interesse deve também passar por estes átomos. Estes átomos sobrepostos, por vezes, absorvem uma parte das radiações X incidente e fluorescente emitida. Esta absorção depende dos elementos que estão presentes e das suas concentrações sendo que geralmente, os elementos pesados absorvem mais que os elementos leves [71].

Deste modo, todos os padrões de calibração devem ter propriedades físicas semelhantes, como densidade, tamanho de partículas e homogeneidade e devem ser analisados de forma reprodutível e idêntica [85].

Uma justificação possível para o desvio do conjunto de pontos relativo à pré-mistura VM 75 do modelo matemático criado, mencionado anteriormente, é a textura do produto. Como já foi referido, esta pré-mistura VM destaca-se

visualmente das restantes ao ser composta por partículas de menor tamanho, que poderá ser considerada uma interferência física, responsável por desencadear diferenças absolutas maiores entre os resultados obtidos por FAAS e os previstos pelo espectrofotómetro de XRF. Para além disso, as amostras desta pré-mistura foram preparadas usando uma pressão diferente dos restantes padrões (3 t), não se tendo seguido o critério de reprodutibilidade em todos os padrões de calibração.

1.2.2 Curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM

Como foi referido anteriormente, grandes diferenças foram observadas entre os resultados obtidos por FAAS e os previstos pelo espectrómetro de XRF para a pré-mistura VM 75, traduzindo-se na formação de um conjunto de pontos que se afastava da equação do modelo matemático criado. De forma a confirmar que estes pontos influenciavam negativamente o modelo matemático anteriormente criado, decidiu-se excluir, da recta de calibração, todas as amostras relativas a esta pré-mistura. Os principais parâmetros do novo modelo gerado bem como a respectiva curva de calibração encontram-se representados na tabela e gráfico seguintes.

Tabela 7 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM.

Curva de calibração	Gama de concentrações (mg/100g)		Modelo matemático	n	R ²	SEC (mg/100g)
	Min.	Máx.				
2	42,13	745,14	$Y=4,377+0,825X$	30	0,993	22,860

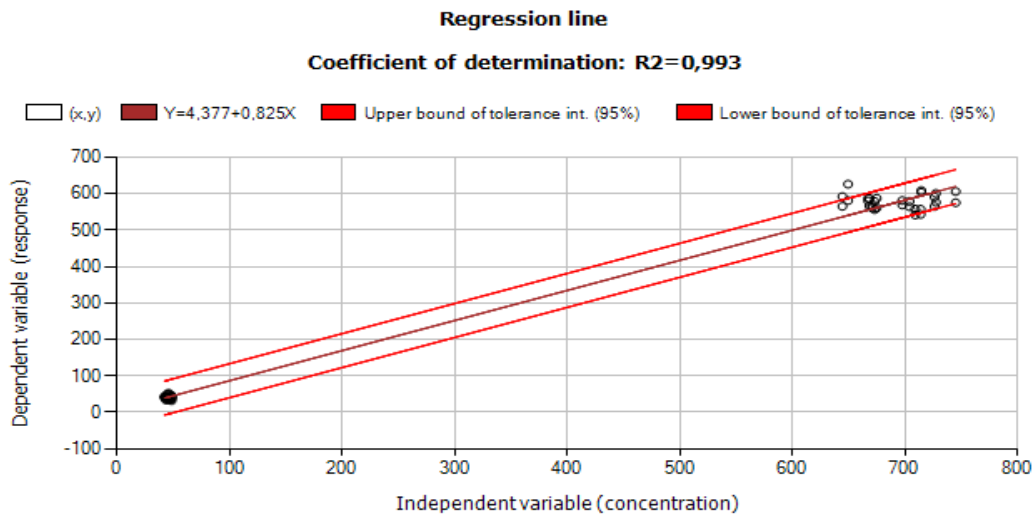


Figura 13 - Curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM.

Na construção da curva de calibração anterior foram analisadas um total de 30 amostras. A gama de linearidade é extensa, tendo como limites mínimo e máximo 42,13 mg/100g e 745,14 mg/100g, respectivamente. O R^2 calculado foi de 0,993 sendo superior a 0,850 - limite mínimo aceite pela norma da Nestlé [79] e ao da curva de calibração única para quantificação de zinco em 3 pré-misturas VM ($R^2=0,899$). O SEC calculado para este modelo foi de 22,860 mg/100g.

Apesar do R^2 ser muito próximo de um, é possível observar-se no gráfico apresentado anteriormente apenas dois aglomerados de pontos, um primeiro situado no eixo das abcissas no intervalo de concentração 0-100 mg/100g e um segundo situado no intervalo 600-750 mg/100g, não se verificando uma distribuição uniforme dos pontos ao longo da recta. Para que esta condição de linearidade se verificasse, tornou-se necessário proceder à formulação de amostras experimentais. A preparação destas amostras baseou-se, como já foi referido anteriormente, nas receitas das pré-misturas VM 76 e 98 usadas na linha de produção. Após uma análise prévia da curva de calibração anterior, manipularam-se uma série de amostras de forma às concentrações esperadas manterem, sempre que possível uma cadência regular, desencadeando assim a formação de pontos no intervalo entre os dois aglomerados. As características do novo modelo matemático gerado bem como a respectiva curva de calibração são apresentados de seguida.

Tabela 8 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (com amostras experimentais).

Curva de calibração	Gama de concentrações (mg/100g)		Modelo matemático	n	R ²	SEC (mg/100g)
	Min.	Máx.				
3	42,13	756,54	$Y=0,233+0,977X$	49	0,993	21,198

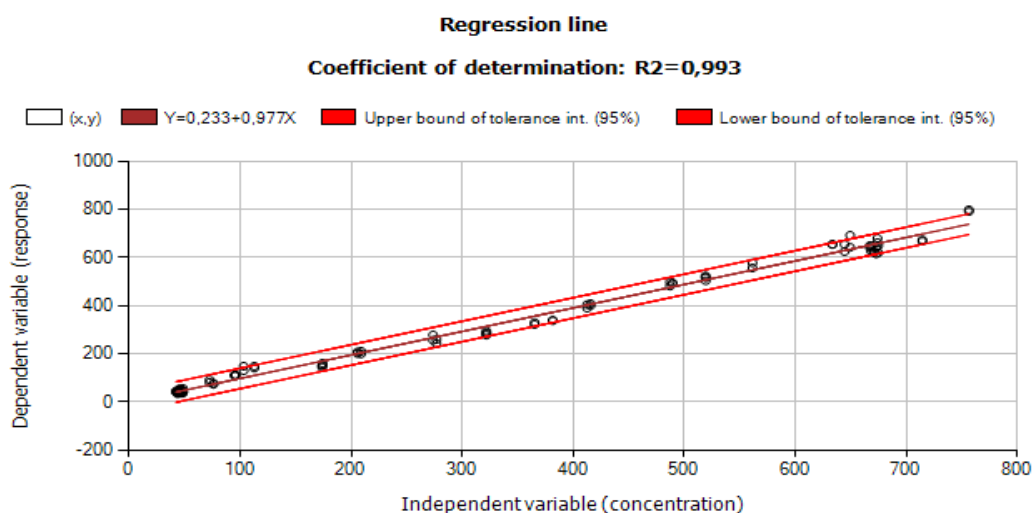


Figura 14 - Curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (com amostras experimentais).

Para a construção do modelo matemático anterior foram analisadas um total de 49 amostras, 30 oriundas da linha de produção e 19 experimentais, preparadas em laboratório. Com a adição de novos pontos ao intervalo compreendido entre os dois aglomerados, o R² da recta permaneceu inalterado e próximo de um, o que indica que a preparação das respectivas amostras bem como a análise das mesmas por FAAS e XRF foram bem-sucedidas. É também possível verificar que os pontos relativos às amostras experimentais encontram-se distribuídos de forma uniforme, contribuindo para a obtenção de uma melhor curva de calibração.

Para além disso, o SEC calculado para este modelo foi de 21,198 mg/100g sendo mais baixo que o valor calculado para o modelo anterior à criação de amostras experimentais.

Apesar do gráfico apresentado acima demonstrar evidências estaticamente significativas que permitem afirmar que as condições de aplicabilidade da regressão linear estão garantidas, a gama de concentrações compreendida pelo modelo não inclui os limites mínimo (30 mg/100g) e máximo (808 mg/100g) de liberação estipulados para as pré-misturas VM 76 e 98 respectivamente (gama de concentrações esperada) (tabela 9).

Tabela 9 - Gamas de concentrações esperadas para as pré-misturas VM 76 e 98.

Pré-mistura	Gama de concentrações esperada (mg/100g)		
	Min.	Teórico	Máx.
76	30	40	50
98	485	646	808

De forma a possibilitar a detecção e quantificação de possíveis erros na elaboração de pré-misturas VM na linha de produção houve necessidade de se prepararem mais amostras experimentais de concentrações inferiores e superiores aos limites mínimo (42,13 mg/100g) e máximo (756,54 mg/100g) da gama de concentrações da curva de calibração 3. Depois das respectivas amostras terem sido analisadas por FAAS e XRF, calculou-se através do programa *Minimate/Minipal* a nova equação da curva e analisaram-se estatisticamente os dados obtidos no programa *Q-Stat*.

Os parâmetros do novo modelo criado encontram-se representados na tabela e gráficos seguintes.

Tabela 10 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (com amostras experimentais de concentrações inferiores ao mínimo e superiores ao máximo das gamas de concentrações esperadas para as pré-misturas VM 76 e 98).

Curva de calibração	Gama de concentrações (mg/100g)		Modelo matemático	n	R ²	SEC (mg/100g)
	Min.	Máx.				
4	17,59	923,11	$Y = -13,110 + 1,060X$	65	0,983	43,567

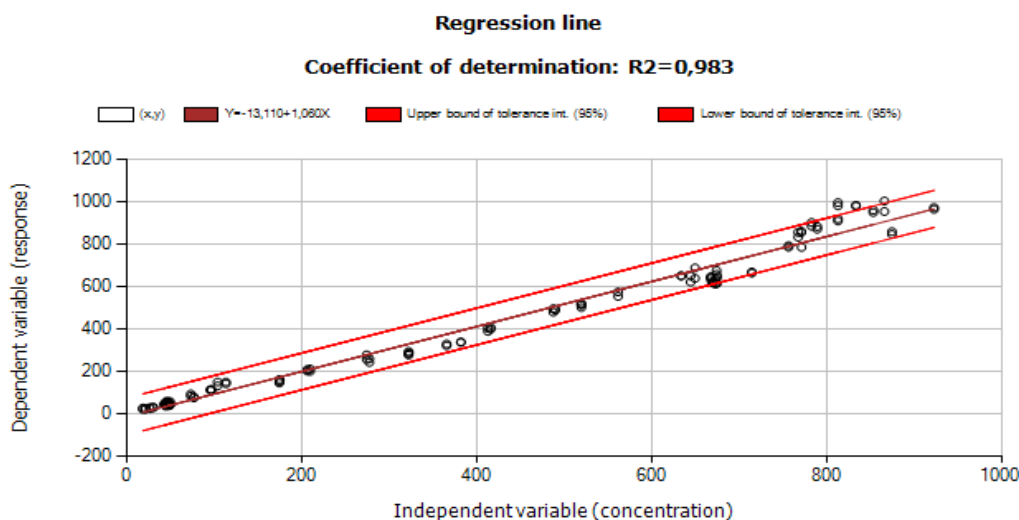


Figura 15 - Curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (com amostras experimentais de concentrações inferiores ao mínimo e superiores ao máximo das gamas de concentrações esperadas para as pré-misturas VM 76 e 98).

Na construção do modelo acima apresentado foram analisadas, para além do conjunto amostral da curva de calibração 3, mais 16 amostras o que se traduziu na formação de 32 novos pontos. O valor do R^2 do modelo proposto, apesar de ser bastante alto (0,983) baixou relativamente ao da curva de calibração 3, o que indica que a introdução destes novos pontos contribuiu para a diminuição do grau de linearidade do modelo e aumento do valor do SEC (43,567 mg/100g). Uma justificação para a diminuição do R^2 é a presença de alguns pontos suspeitos (“*outliers*”) e pontos muito próximos dos limites inferior e superior do intervalo de tolerância para concentrações acima de 775 mg/100g. Pela análise da tabela 11 pode-se concluir que as amostras experimentais com concentrações de zinco mais elevadas (acima de 775 mg/100g) geraram diferenças muito grandes entre os valores obtidos por FAAS e os previstos pelo espectrómetro de XRF.

Tabela 11 - Análise comparativa entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para as amostras experimentais de concentrações de zinco mais elevadas.

Amostra	Concentração esperada (mg/100g)	Resultado médio FAAS (mg/100g)	Resultado médio XRF (mg/100g)	XRF-FAAS (mg/100g)
98_+20%Zn	775,00	767,55	843,46	75,91
98_+20%Zn2	775,00	771,06	856,86	85,80
98_+24%Zn	800,00	782,84	892,87	110,03
98_+24%Zn2	800,00	789,35	875,99	86,64
98_+28%Zn	825,00	813,09	987,70	174,61
98_+28%Zn2	825,00	807,50	965,30	157,80
98_+32%Zn	850,00	853,50	954,25	100,75
98_+32%Zn2	850,00	833,72	980,97	147,25

Após terem sido preparadas novas amostras de igual concentração e se terem novamente realizado análises por XRF e FAAS, o afastamento de resultados entre os dois métodos persistiu e o programa estatístico continuou a considerar estes pontos como “outliers”. Dado que as concentrações teóricas previstas não se afastavam muito dos resultados obtidos por FAAS, a exactidão do espectrómetro de XRF na análise de amostras deste produto de concentrações superiores a 775 mg/100g pode ser questionada e alvo de uma futura investigação.

De forma a não prejudicar os parâmetros R^2 e SEC do modelo de calibração em questão, decidiu-se excluir todos os pontos discrepantes (“outliers”), à exceção dos pontos referentes à amostra 98_+32%Zn. O motivo por se ter deixado essa amostra foi porque apresentou os melhores resultados de entre as amostras de concentração idêntica e havia necessidade de se incluir esses pontos para a gama de concentrações da curva de calibração poder albergar a gama de concentrações esperada para a pré-mistura VM 98 permitindo, assim, a detecção de possíveis erros na formulação destes produtos na linha de produção como, por exemplo, a pesagem de ingredientes fora do estipulado pelas receitas ou misturas de ingredientes mal sucedidas.

2. Resultados finais

Após todas as condições experimentais terem sido optimizadas e ter sido discutido todo o desenvolvimento experimental que foi necessário desenvolver na tentativa de obtenção dos melhores resultados, serão de seguida apresentados e discutidos os resultados finais.

2.1 Curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 76 e 98

A análise dos dados apresentados na (tabela 12 e figura 16) permite inferir que a exclusão de pontos da curva de calibração 4 mencionada na alínea 1.2.2 refletiu-se numa melhoria do R^2 e do SEC calculados para o modelo matemático correspondente (curva de calibração 5). Relativamente ainda à curva de calibração 5, é de referir que os pontos se encontram bem distribuídos ao longo de toda a gama de concentrações. O número de amostras analisadas para a construção da curva de calibração apresentada de seguida foi de 58. A gama de concentrações é muito extensa tendo como mínimo 17,59 mg/100g e máximo 853,50 mg/100g possibilitando, desta forma, a detecção de possíveis erros na fabricação destes produtos, como uma sobredosagem ou défice de adição de zinco.

O R^2 é 0,990 que, ao se aproximar muito da linearidade, indica que a variável independente X (concentração obtida por FAAS) contribui, em grande parte, para a variação da variável dependente Y (resposta analítica). O SEC calculado foi de 26,624 mg/100g.

Tabela 12 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (sem amostras experimentais de concentrações de zinco mais elevadas).

Curva de calibração	Gama de concentrações (mg/100g)		Modelo matemático	n	R ²	SEC (mg/100g)
	Min.	Máx.				
5	17,59	853,50	$Y=-3,644+1,001X$	58	0,990	26,624

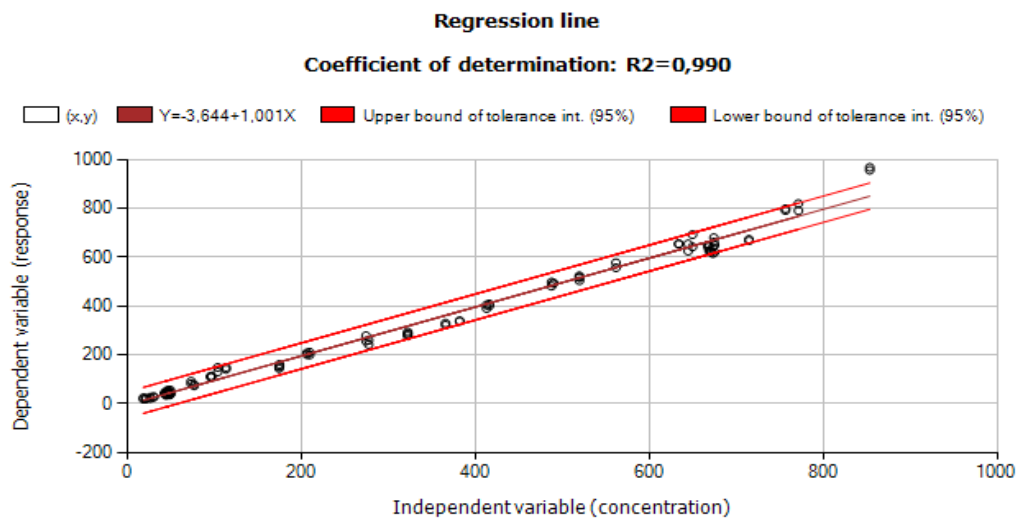


Figura 16 - Curva de calibração para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (sem amostras experimentais de concentrações de zinco mais elevadas).

Além destes parâmetros, verificou-se também se o intervalo de confiança à volta do declive e da intercepção continham o zero. Concluiu-se que, para o modelo em questão, o intervalo de confiança em torno do declive não incluía o zero o que indica que o declive é significativamente diferente de zero e, por isso, existe uma forte relação entre a concentração e a resposta analítica. Por outro lado, observou-se que o intervalo de confiança em torno da intersecção incluía o zero, o que indica que a intersecção não é significativamente diferente de zero podendo, assim, a regressão linear ser forçada a passar pela origem (tabela 13) [86].

Tabela 13 - Características principais do intervalo de confiança da curva de calibração única para quantificação de zinco em 2 pré-misturas VM (sem amostras experimentais de concentrações de zinco mais elevadas).

Curva de calibração	IC do declive inclui o 0?	IC da interseção inclui o 0?
5	Não	Sim

Entre todos os modelos matemáticos apresentados anteriormente, a curva de calibração 5 provou, deste modo, ser a mais adequada para quantificar o teor de zinco nas pré-misturas VM 76 e 98. Os resultados decorrentes da análise de zinco por FAAS e XRF de todas as amostras utilizadas na construção da curva de calibração anterior podem ser consultados no anexo C.

2.2 Curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75

Como foi referido anteriormente, a pré-mistura VM 75 distancia-se pela textura e composição das restantes pré-misturas VM. Uma vez que, durante a construção do modelo de calibração único para quantificação de zinco em três pré-misturas VM, este produto gerou diferenças muito grandes entre os resultados obtidos por FAAS e os previstos pelo espectrómetro de XRF decidiu-se investigar se ao separarmos este produto para uma curva de calibração diferente (modelo 75) essas diferenças eram atenuadas.

Na tabela seguinte estão representados os valores médios obtidos por FAAS e XRF bem como as respectivas diferenças absolutas entre os dois métodos decorrentes da construção dos modelos matemáticos único (curva de calibração única para quantificação de zinco em 3 pré-misturas VM) e 75 (curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75).

Tabela 14 - Análise comparativa entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para os modelos de calibração único e 75.

Descrição da amostra	Valor médio FAAS (mg/100g)	Modelo único		Modelo 75	
		Valor médio XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)	Valor médio XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)
75_32104	311,20	419,57	-108,37	317,07	-5,87
75_40043	317,20	450,44	-133,24	337,69	-20,49
75_52902	315,10	451,02	-135,92	338,08	-22,98
75_53121	367,96	451,77	-83,81	338,58	29,38
75_58706	310,12	384,25	-74,13	328,56	-18,44
75_55651	368,87	432,80	-63,93	345,32	23,55
75_56344	340,88	419,81	-78,93	343,27	-2,39
75_58119	310,98	391,73	-80,75	298,48	12,50
75_59938	323,50	410,17	-86,67	310,80	12,70
75_76560	324,88	416,18	-91,30	314,81	10,07
75_53770	355,47	410,56	-55,09	311,06	44,41
75_42992	318,11	396,27	-78,16	301,52	16,59
75_66727	323,43	463,63	-140,20	346,50	-23,07
75_60723	356,32	422,88	-66,56	319,28	37,04
		Média	-91,22	-	6,64

Após análise dos dados da tabela 14, foi possível verificar que com a construção de um modelo de calibração diferente para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75, as diferenças entre os valores médios obtidos por FAAS e XRF foram reduzidas em todas as amostras. A média das diferenças dos resultados obtidos pelos dois métodos calculada para o modelo único foi -91,22 mg/100g enquanto que para o modelo 75 foi 6,64 mg/100g.

Comprovou-se, assim, que a pré-mistura VM 75 possui características distintas das restantes e que a construção de uma curva de calibração para quantificar zinco em apenas este produto ao invés da utilização de um modelo único poderia ser vantajosa.

De forma a que o conjunto amostral do modelo matemático 75 fosse constituído por, no mínimo, 25 amostras manipularam-se amostras em laboratório objectivando a extensão da gama de concentrações da curva e uma distribuição uniforme de pontos ao longo da recta.

Depois das respectivas amostras terem sido analisadas por FAAS e XRF, calcularam-se através do Q-Stat os parâmetros do modelo matemático gerado (tabela 15 e figura 17).

Tabela 15 - Características principais da curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75.

Curva de calibração	Gama de concentrações (mg/100g)		Modelo matemático	n	R ²	SEC (mg/100g)
	Min.	Máx.				
1	208,04	494,40	$Y=15,051+0,951X$	26	0,927	18,838

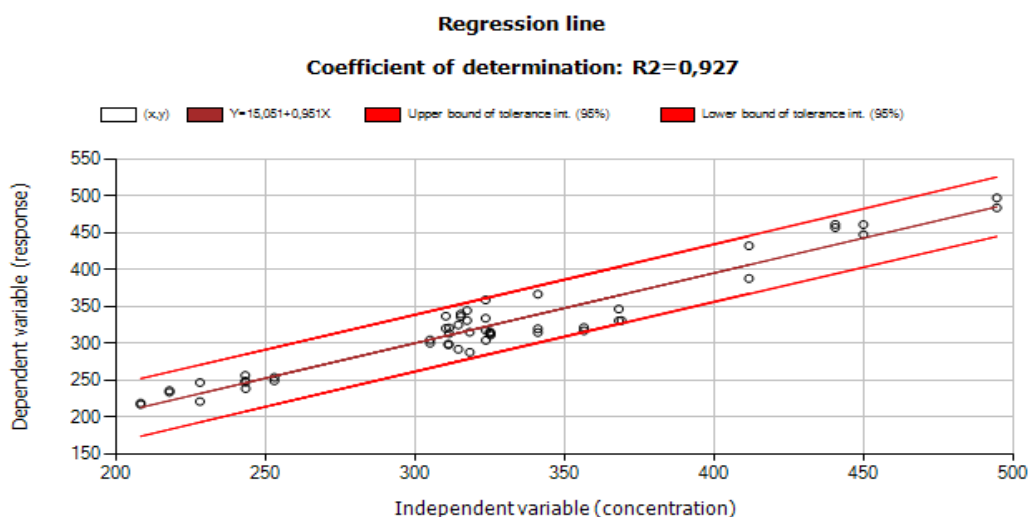


Figura 17 - Curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75.

Para a construção do modelo matemático anterior foram analisadas um total de 26 amostras, 14 oriundas da linha de produção e 12 experimentais, preparadas em laboratório. A gama de concentrações esperada para este material vai desde 235 a 392 mg/100g (tabela 16).

Tabela 16 - Gama de concentrações esperada para a pré mistura VM 75.

Pré-mistura	Gama de concentrações esperada (mg/100g)		
	Min.	Teórico	Máx.
75	235	314	392

Uma vez que gama de concentrações da curva é extensa e tem como mínimo 208,04 mg/100g e máximo 494,40 mg/100g, este modelo permite detetar possíveis erros na preparação deste produto.

Através da figura 17 é possível visualizar-se que, no eixo das abcissas apesar de ser notória uma concentração de pontos no intervalo 300 - 400 mg/100g, os pontos encontram-se distribuídos ao longo de toda a recta. Uma justificação para a presença deste aglomerado de pontos é o facto do conjunto de pontos mencionado corresponder à análise das amostras da linha de produção que, por norma, não variam muito em concentração de zinco. Os pontos mais distanciados deste aglomerado correspondem às amostras experimentais, em que, mantendo a composição do produto se fez aumentar e diminuir a concentração de zinco.

O R^2 calculado para este modelo foi 0,927, sendo superior a 0,850 (valor mínimo aceite pela norma da Nestlé) e o SEC 18,838 mg /100g.

Para além disso, e à semelhança da curva de calibração 5, verificou-se que o intervalo de confiança, do modelo matemático em questão, em torno do declive não incluía o zero o que indica que o declive é significativamente diferente de zero e, por isso, existe uma forte relação entre a concentração e a resposta analítica. Por outro lado, observou-se que o intervalo de confiança em torno da intersecção incluía o zero, o que indica que a intersecção não é significativamente diferente de zero podendo, assim, a regressão linear ser forçada a passar pela origem (tabela 17) [86].

Tabela 17 - Características principais do intervalo de confiança da curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75.

Curva de calibração	IC do declive inclui o 0?	IC da intersecção inclui o 0?
1	Não	Sim

Os resultados decorrentes da análise de zinco por FAAS e XRF de todas as amostras utilizadas na construção da curva de calibração anterior podem ser consultados no anexo D.

2.3 Análise de pré-misturas da linha de produção

Após terem sido estabelecidos os modelos de calibração mais adequados para quantificação de zinco em três pré-misturas VM diferentes decidiu-se avaliar a performance dos mesmos. Recolheram-se, assim, da linha de produção, 13 amostras de cada pré-mistura VM e procedeu-se à quantificação do teor de zinco por FAAS e XRF.

A tabela e gráfico seguintes evidenciam os resultados médios obtidos por FAAS e XRF bem como as respectivas diferenças entre eles para o conjunto amostral da pré-mistura VM 98.

Tabela 18 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 98.

Amostra	Resultado médio FAAS (mg/100g)	Resultado médio XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)	Erro relativo (%)
98_84857	649,51	654,67	-5,16	0,79
98_05208	644,48	632,29	12,19	1,89
98_00434	682,65	673,14	9,51	1,39
98_09940	650,60	654,42	-3,82	0,59
98_27318	543,91	549,94	-6,03	1,11
98_42605	663,13	673,88	-10,75	1,62
98_67314	642,30	649,93	-7,63	1,19
98_06032	722,66	697,58	25,08	3,47
98_32970	715,37	705,11	10,26	1,43
98_83360	700,91	696,50	4,41	0,63
98_78887	723,18	707,15	16,03	2,22
98_64251	670,05	667,11	2,94	0,44
98_80391	687,06	651,12	35,94	5,23
		Média	-	1,69

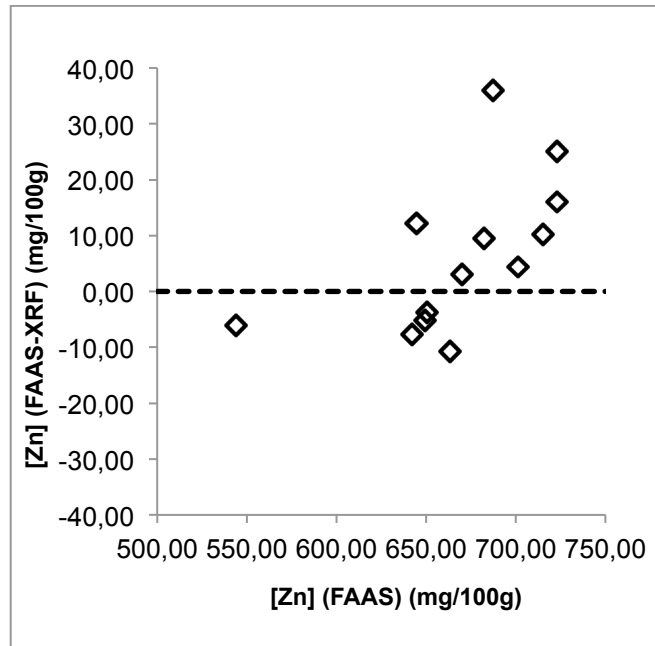


Figura 18 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 98.

Através do gráfico anterior é possível observar-se que, com exceção de duas amostras, a diferença máxima entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi de 20 mg/100g. Verificou-se também que não existe uma tendência, em todas as análises, para um dos métodos fornecer sempre resultados superiores ou inferiores ao outro.

O erro percentual relativo calculado foi idêntico em todas as análises, sendo o seu valor médio 1,69, que ao ser muito inferior a 10% (valor máximo comumente aceite pelos laboratórios) indica que existe uma grande proximidade entre os valores obtidos por XRF e FAAS.

De seguida, são apresentados os resultados obtidos por FAAS e XRF para as 13 amostras de pré-mistura VM 76.

Tabela 19 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 76.

Amostra	Resultado médio FAAS (mg/100g)	Resultado médio XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)	Erro relativo (%)
76_71588	50,20	53,80	-3,60	7,17
76_81914	46,70	44,65	2,05	4,39
76_01860	38,22	37,61	0,61	1,60
76_81328	39,94	46,39	-6,45	16,15
76_05433	40,05	46,86	-6,81	17,00
76_87238	36,66	38,68	-2,02	5,51
76_88927	39,17	39,62	-0,45	1,15
76_89320	43,91	44,64	-0,73	1,66
76_30621	46,29	45,65	0,64	1,38
76_74860	45,15	45,21	-0,06	0,13
76_61983	40,02	37,44	2,58	6,45
76_82605	43,44	43,33	0,11	0,25
76_05847	44,22	45,72	-1,50	3,39
Média			-	5,10

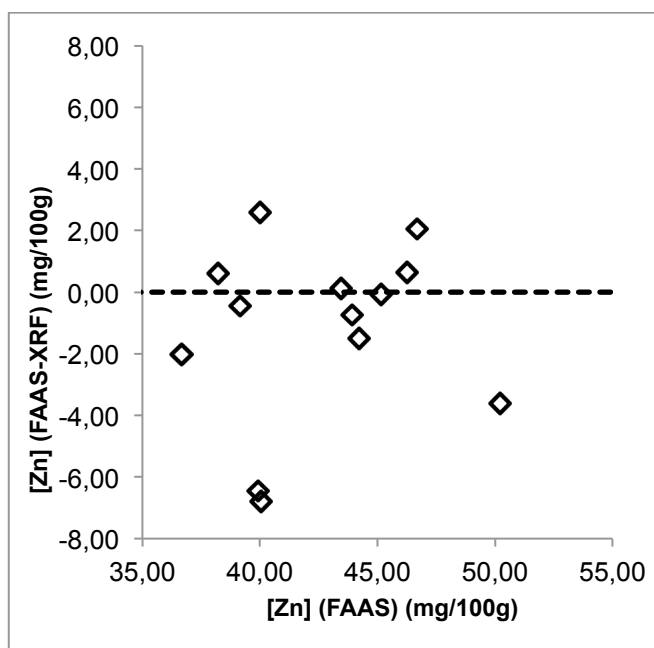


Figura 19 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 76.

Comparando os resultados de FAAS e XRF constatou-se que a diferença máxima obtida foi de cerca de 7 mg/100g e, que na maioria das vezes a diferença registada foi inferior a 2 mg/100g.

À semelhança do gráfico apresentado para a pré-mistura VM 98 não se verificou uma tendência para um dos métodos fornecer sempre resultados inferiores ou superiores ao outro.

O erro percentual relativo apesar de não ter sido idêntico nas 13 análises efetuadas, de forma geral, não foi muito alto exceptuando os calculados para as amostras 76_81328 e 76_05433 e tem como valor médio 5,10 (valor inferior a 10,00) o que indica que existe um elevado grau de exactidão entre os valores obtidos por XRF e FAAS.

Os resultados apresentados de seguida são referentes à determinação da concentração de zinco no conjunto de pré-misturas VM 75.

Tabela 20 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 75.

Amostra	Resultado médio FAAS (mg/100g)	Resultado médio XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)	Erro relativo (%)
75_66727	323,43	326,93	-3,50	1,08
75_42992	318,11	327,41	-9,30	2,92
75_32104	311,20	312,2	-1,00	0,32
75_76560	324,88	325,88	-1,00	0,31
75_10409	341,20	332,88	8,32	2,44
75_62439	345,87	338,16	7,71	2,23
75_70496	324,30	330,9	-6,60	2,04
75_72937	237,76	234,84	2,92	1,23
75_78126	345,91	333,96	11,95	3,45
75_83629	343,13	336,92	6,21	1,81
75_84237	348,23	335,54	12,69	3,64
75_84633	327,46	331,52	-4,06	1,24
75_77291	330,11	318,31	11,80	3,57
		Média	-	2,02

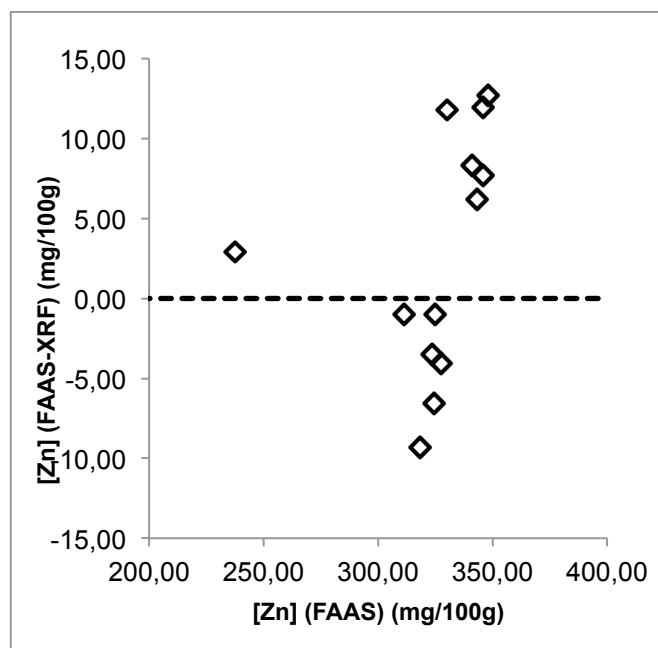


Figura 20 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de zinco a pré-misturas VM 75.

Para todas as análises efectuadas, concluiu-se que a diferença máxima registada entre os valores obtidos por FAAS e os previstos pelo espectrómetro de XRF foi de 12,69 mg/100g e que, mais uma vez, não houve tendência para um dos métodos fornecer resultados inferiores ou superiores ao outro.

O erro percentual relativo calculado foi idêntico em todas as análises, sendo o seu valor médio 2,02 e inferior a 10,00, o que indica que existe uma grande proximidade entre os valores obtidos por XRF e FAAS.

Os resultados discutidos acima são idênticos aos apresentados por *L. Perring et al.*[41].

2.4 Avaliação da precisão dos métodos alternativos

A precisão de um método analítico define-se como o grau de concordância entre resultados de vários ensaios independentes obtidos nas mesmas condições experimentais, permitindo avaliar a dispersão dos resultados dos ensaios sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões [87].

A repetibilidade (precisão entre ensaios) refere-se à dispersão dos resultados do método, operando num curto intervalo de tempo e nas mesmas condições (mesma amostra, analista, equipamento, método, laboratório, etc.) [87].

O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i e X_{i-1}). Na prática, aceitam-se resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se $[(X_i - X_{i-1}) < r]$ [87,88].

Neste contexto, ainda não estando no âmbito do trabalho, decidiu-se avaliar a precisão dos resultados fornecidos pelas curvas de calibração anteriormente desenvolvidas através da análise de repetibilidade. Para se realizar esta análise recolheu-se uma amostra de cada pré-mistura VM e analisaram-se 6 replicados no espectrómetro de XRF. Os resultados obtidos foram analisados no *Q-Stat* e encontram-se representados nas tabelas seguintes.

Tabela 21 – Resultados de repetibilidade obtidos para a pré-mistura VM 98

Amostra	[Zn] XRF (mg/100g)	Média	r	CV(r) (%)
98_83360_1	639,87	647,72	21,85	1,20
98_83360_2	650,19			
98_83360_3	652,00			
98_83360_4	643,80			
98_83360_5	655,26			
98_83360_6	645,17			

Tabela 22 – Resultados de repetibilidade obtidos para a pré-mistura VM 76.

Amostra	[Zn] XRF (mg/100g)	Média	r	CV(r) (%)
76_69308_1	40,42	40,78	8,02	7,20
76_69308_2	42,35			
76_69308_3	39,08			
76_69308_4	45,04			
76_69308_5	37,58			
76_69308_6	40,19			

Tabela 23 - Resultados de repetibilidade obtidos para a pré-mistura VM 75.

Amostra	[Zn] XRF (mg/100g)	Média	r	CV(r) (%)
75_58327_1	305,66	309,92	13,95	1,60
75_58327_2	309,81			
75_58327_3	312,93			
75_58327_4	314,80			
75_58327_5	306,06			
75_58327_6	310,28			

Através dos resultados apresentados anteriormente, verificou-se que em todos os conjuntos de replicados de cada amostra de pré-mistura VM foi possível satisfazer a condição $[(X_i - X_{i-1}) < r]$.

Para além disso, é possível observar-se pelas tabelas representadas acima que os valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV(r)) variaram entre 1,20% e 7,70 %, correspondendo o valor mais elevado à análise do conjunto de replicados da pré-mistura VM 76, de menor concentração em zinco.

2.5 Comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos para as amostras experimentais

Como referido anteriormente, de forma a aumentar a gama de linearidade das curvas de calibração e de melhorar a distribuição dos pontos ao longo destas preparam-se e analisaram-se, para além das amostras provenientes da linha de produção, amostras experimentais de concentrações conhecidas. Apesar destas amostras terem sido alvo de uma rigorosa preparação durante a qual todas as condições exigidas pela linha de produção foram, sempre que possível, reproduzidas os resultados obtidos pelos métodos de referência e alternativos, em momento algum, coincidiram com os valores de concentração previstos para as amostras experimentais (Anexo B).

De modo a avaliar a exatidão dos dois métodos fez-se uma análise comparativa entre as concentrações de zinco esperadas para as amostras experimentais e as obtidas por FAAS e XRF.

Os gráficos que se seguem representam as concentrações teóricas esperadas para as amostras experimentais e as obtidas por FAAS e XRF para a pré-mistura VM 76.

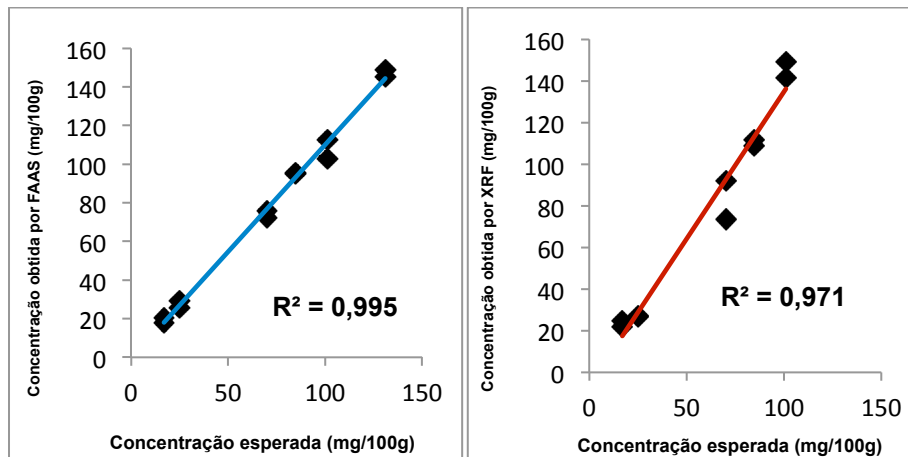


Figura 21 - Representações gráficas da concentração esperada para as amostras experimentais versus concentração obtida por FAAS (esquerda) e XRF (direita) para a pré-mistura VM 76.

Pelos gráficos acima apresentados constatou-se que existe uma relação linear entre a concentração esperada para as 12 amostras experimentais preparadas e as concentrações obtidas pelos métodos de referência e alternativo. Os coeficientes de determinação calculados para os gráficos que relacionam a concentração esperada e a obtida por FAAS e XRF foi, respetivamente 0,995 e 0,971. Relativamente à pré-mistura VM 98 foram preparadas, em laboratório, 24 amostras.

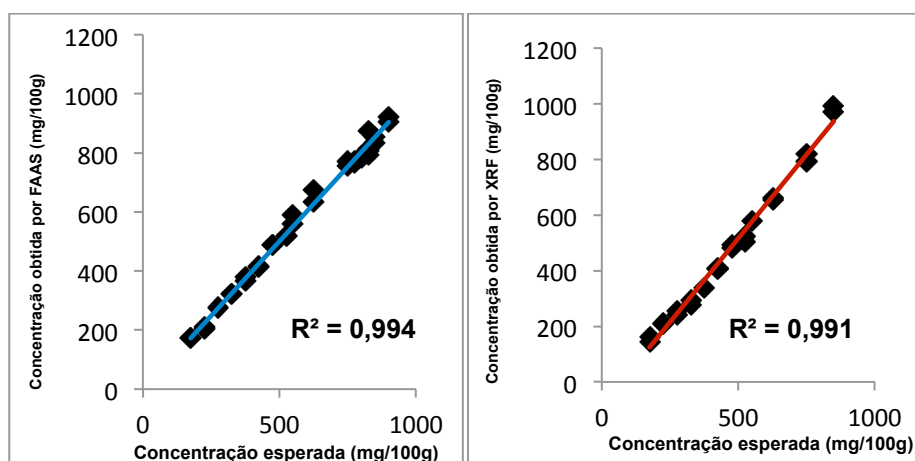


Figura 22 - Representações gráficas da concentração esperada para as amostras experimentais versus concentração obtida por FAAS (esquerda) e XRF (direita) para a pré-mistura VM 98.

Para esta pré-mistura também se verificou uma relação linear entre as concentrações esperadas e as obtidas pelos dois métodos, confirmada pela aproximação a um dos valores dos coeficientes de determinação. De seguida, são apresentados os gráficos relativos à pré-mistura VM 75.

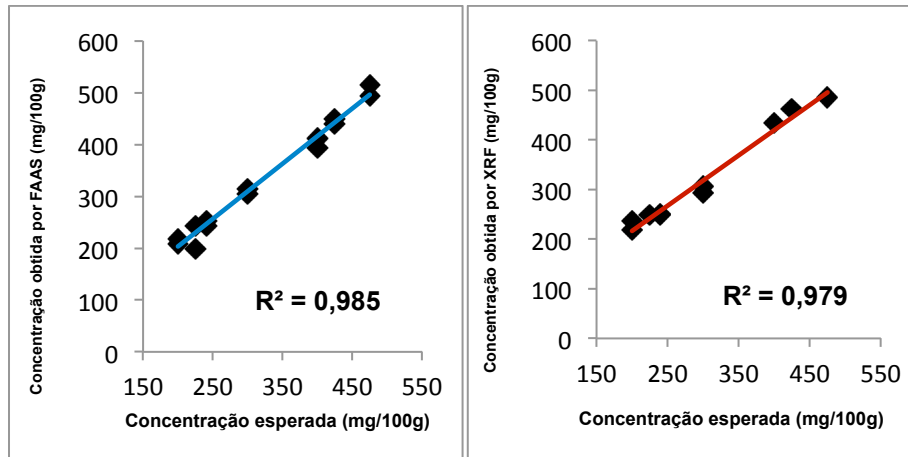


Figura 23 - Representações gráficas da concentração esperada para as amostras experimentais versus concentração obtida por FAAS (esquerda) e XRF (direita) para a pré-mistura VM 75.

Verificou-se, à semelhança das restantes pré-misturas VM, uma forte relação linear entre as concentrações teóricas calculadas para as 7 amostras experimentais preparadas e as obtidas pelos métodos de referência e alternativo.

A obtenção de coeficientes de determinação muito próximos da unidade, ao se relacionarem as concentrações esperadas para as amostras experimentais e as concentrações obtidas pelos dois métodos vem confirmar que, por um lado, estas amostras foram bem preparadas e que ambos os métodos forneceram resultados concordantes com os previstos pelos cálculos teóricos.

Em adição, para as três pré-misturas, os coeficientes de determinação calculados para as regressões lineares entre as concentrações esperadas e as obtidas por FAAS foram sempre superiores aos calculados para as regressões lineares entre as concentrações esperadas e as obtidas pelo espectrofotómetro de XRF. Confirmou-se, assim, que apesar do espectrómetro de XRF ser capaz de fornecer resultados muito próximos dos teóricos, o método de referência fornece resultados mais exatos.

3. Trabalhos preliminares e complementares desenvolvidos na empresa

Durante o meu estágio em ambiente empresarial, para além do trabalho desenvolvido para alcançar o objectivo principal desta dissertação realizei também outros trabalhos para a empresa. Numa fase inicial do meu estágio, calibrei também os espectrómetros FT-NIR e XRF para a liberação de pré-misturas com base nos teores de vitamina C, cálcio e ferro (objectivo secundário). Numa fase final e complementar do estágio curricular iniciei a criação de modelos de calibração com amostras de linha de cereais de pequeno almoço no espectrómetro de XRF, para futuramente este equipamento alternativo servir de apoio para as análises de cálcio.

Relativamente à calibração dos espectrómetros FT-NIR e XRF para quantificação dos micronutrientes referidos anteriormente em pré-misturas VM da nova receita, inicialmente realizei diversas análises de vitamina C, ferro e cálcio pelas metodologias de referência e comecei a construir novas curvas de calibração. Contudo, como foi mencionado no capítulo I, num passado recente, catorze receitas de pré-misturas VM eram usadas na formulação de catorze diferentes farinhas infantis tendo sido desenvolvidos, num trabalho anterior, modelos de calibração para quantificação de cálcio, ferro e vitamina C para cada um dos produtos. Com a simplificação do processo, todas as farinhas infantis produzidas na fábrica foram agrupadas, consoante a sua matriz, em três grupos principais estando cada grupo associado a uma determinada receita de pré-mistura VM (75, 76 ou 98). Houve, assim necessidade de se averiguar, paralelamente à construção dos novos modelos de calibração, se os modelos de calibração criados anteriormente se adaptavam à nova realidade e podiam ser usados na quantificação de cálcio, ferro e vitamina C em pré-misturas VM da nova receita. Desta forma, procedeu-se, inicialmente, à determinação das concentrações destes micronutrientes em amostras de pré-mistura VM da nova receita pelas metodologias de referência e, posteriormente, analisaram-se essas mesmas amostras pelas metodologias alternativas. Na análise das amostras pelas metodologias alternativas, as concentrações dos três micronutrientes de cada pré-mistura da nova receita foram determinadas com recurso aos modelos de calibração anteriormente gerados para as receitas de pré-misturas antigas,

pertencentes ao mesmo grupo. Os valores obtidos pelas metodologias de referência foram comparados com os obtidos por cada modelo de calibração e, os modelos de calibração que potenciaram menores diferenças entre os valores das duas metodologias foram implementados para quantificar as concentrações de micronutrientes em pré-misturas da nova receita (tabela 24).

Tabela 24 - Ajuste dos modelos de calibração para determinação dos teores de cálcio, ferro e vitamina C em pré-misturas VM da nova receita.

Pré-mistura (nova receita)	Modelo de calibração	
	Ca+Fe	Vitamina C
75	Láctea c/ Frutos	Frutos A
76	Via Láctea	Cacau
98	Láctea Simples	Láctea Simples

Os resultados relativos à criação dos modelos de calibração para quantificação de cálcio em cereais de pequeno-almoço podem ser consultados no anexo A.

3.1 Outros trabalhos desenvolvidos na empresa

- Colaboração na atualização das curvas de calibração para quantificação de matéria gorda, humidade e vitamina C em produtos de nutrição infantil por espectroscopia de FT-NIR;

- Atualização das curvas de calibração para quantificação de açúcares em cereais de pequeno almoço por espectroscopia de FT-NIR;

- Formação de operadores de linha na quantificação de cálcio, ferro e zinco por espectroscopia de XRF e de vitamina C por espectroscopia de FT-NIR em pré-misturas VM.

- Organização dos reagentes no armazém segundo as suas classes de perigo;

- Colaboração na elaboração de uma instrução de trabalho para a prensa hidráulica *Specac 15 tonenals*;

- Acompanhamento de manutenções ao espectrómetro de XRF.

Capítulo VI

Conclusões

Com a realização deste trabalho pretendia-se desenvolver um modelo de calibração único para quantificar o teor de zinco em três pré-misturas VM (76, 75 e 98) de produtos de nutrição infantil através de espectroscopia de XRF. A construção de um modelo de calibração único possibilitaria a simplificação do processo de análise no entanto, devido ao facto da pré-mistura VM 75 se distanciar das restantes na textura e composição houve necessidade de se construir um modelo de calibração diferente para este produto. Construíram-se, assim dois modelos de calibração, um para quantificação do teor de zinco em pré-misturas VM 76 e 98 e outro para quantificação do teor de zinco em pré-misturas VM 75. O modelo de calibração gerado para as pré-misturas VM 76 e 98 possui uma gama de linearidade muito extensa, tendo como mínimo 17,59 mg/100g e 853,50 mg/100g, um R^2 de 0,990 e um SEC de 26,624 mg/100g. O modelo de calibração gerado para a pré-mistura VM 75 possui uma gama de linearidade que vai desde 208,04 mg/100g a 494,40 mg/100g, um R^2 de 0,927 e um SEC de 18,838 mg/100g.

Na análise das treze amostras de cada pré-mistura VM o espectrómetro de XRF forneceu valores de concentração de zinco muito próximos dos obtidos por FAAS, com erros percentuais relativos médios de 1,69% para a pré-mistura VM 98, 5,10% para a pré-mistura VM 76 e 2,02% para a pré-mistura VM 75. Estes resultados indicam que os modelos de calibração anteriormente construídos, são adequados e podem ser usados na determinação rápida do teor de zinco em pré-misturas VM.

A implementação da metodologia de XRF, na linha de produção, para quantificação de zinco em pré-misturas VM permite controlar o PCC relativo à adição de vitaminas e minerais durante o processamento de farinhas infantis. Para além disso, com a construção dos modelos de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM a metodologia FT-NIR para análise de vitamina C foi abandonada o que permitiu a simplificação do processo e a redução do tempo de análise.

A espectroscopia de XRF é uma metodologia rápida e fidedigna e que, comparativamente à FAAS possui inúmeras vantagens em contexto industrial, entre elas: exige pouca ou nenhuma preparação das amostras, não consome

reagentes, é pouco dispendiosa, pode ser manuseada por pessoal não qualificado e é “amiga do ambiente”. Contudo, pela análise comparativa entre os resultados teóricos e os obtidos por FAAS e XRF para as amostras experimentais confirmou-se que a FAAS é uma metodologia com uma exatidão mais elevada e, portanto a caracterização de pré-misturas em que o espectrómetro de XRF tenha fornecido valores muito próximos ou fora dos limites de especificação continuará a ser feita, com rigor, por FAAS.

Importa também referir o sucesso do cumprimento dos principais objectivos propostos para este trabalho, resultado da motivação, empenho e dedicação a este projecto.

Por fim realço o quanto enriquecedor foi para mim a realização deste trabalho que, ao ser desenvolvido em contexto empresarial, me permitiu crescer tanto a nível pessoal como profissional. O trabalho versátil que realizei, no seio da empresa, entre a linha de produção de nutrição infantil e o laboratório físico-químico do departamento de Garantia da Qualidade facultou-me a aquisição de um conjunto de competências que acredito se transformem em ferramentas a utilizar em actividades futuras no mercado de trabalho.

Capítulo VII

Perspectivas Futuras

Relativamente à quantificação de zinco em pré-misturas VM o conjunto de análises efectuado, após a construção dos modelos de calibração, demonstrou um elevado grau de proximidade entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para as três pré-misturas estudadas. No entanto, de forma a concluir se a espectroscopia de XRF poderá, efectivamente, ser considerado um método alternativo à FAAS na quantificação deste mineral em pré-misturas VM deverá efectuar-se, num trabalho posterior, a validação dos modelos de calibração gerados. Para além disso, os métodos desenvolvidos requererão uma monitorização permanente de forma a que a eficácia da calibração e a performance do espectrómetro de XRF possa ser assegurada.

Como outros trabalhos futuros aponta-se também o melhoramento dos modelos criados, especialmente o modelo de calibração gerado para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75. De forma a finalizar este objectivo, mais amostras experimentais de concentrações conhecidas deveriam ser preparadas, contribuindo, assim, para uma distribuição uniforme de pontos ao longo da recta e para o aumento da robustez do respectivo modelo de calibração.

Uma vez que o espectrómetro de XRF é uma ferramenta que permite quantificar, com alguma precisão e rapidez, a presença de minerais em diferentes matrizes, a hipótese de se desenvolverem novos modelos de calibração para potenciais novos produtos e para quantificar outros minerais nos produtos estudados deve estar sempre presente.

Capítulo VIII

Referências Bibliográficas

1. Público, S.d.M.d.M. [cited 2014 30 December]; Available from: <http://www.smmp.pt/?p=21420>.
2. *Fast Facts About Malnutrition*. [cited 2015 11 Janeiro]; Available from: <http://www.gainhealth.org/>.
3. Black, R.E., L.H. Allen, Z.A. Bhutta, L.E. Caulfield, M. De Onis, M. Ezzati, C. Mathers, e J. Rivera, "Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences". *The Lancet*, 2008. **371**(9608): p. 243-260.
4. Hendricks, K.M. e S.H. Badruddin, "Weaning recommendations: the scientific basis". *Nutrition reviews*, 1992. **50**(5): p. 125-133.
5. Marcondes, E. e A.d.S. Coelho Neto, "Crescimento normal e deficiente". 1970: Sarvier.
6. Tlahms, M.C., et al., "Nutrition During Infancy", in *Krause's Food & Nutrition Therapy*, L.K. Mahan e S. Escott-Stump, Editors. 2008, Saunders/Elsevier.
7. Devincenzi, M., L. Ribeiro, S. Modesto, K. Campos, e D. Sigulem, "Nutrição e Alimentação nos Dois Primeiros Anos de Vida", in *Compacta Nutrição*. 2004.
8. Melø, R., K. Gellein, L. Evje, and T. Syversen, "Minerals and trace elements in commercial infant food". *Food and chemical toxicology*, 2008. **46**(10): p. 3339-3342.
9. Fraga, C.G., "Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health". *Molecular Aspects of Medicine*, 2005. **26**(4): p. 235-244.
10. Guerra, A., et al, "Alimentação e nutrição do lactente", in *Revista de Medicina da Criança e do Adolescente*. 2012.
11. Berton, P., et al, "Trace Element Speciation in Food", in *Advances in Food Science and Technology*, V.P. M, S. Thomas, L.B. Iturriaga, and P.D. Ribotta, Editors. 2013, Wiley.
12. Belitz, H.D., W. Grosch, e P. Schieberle, "Minerals", in *Food Chemistry*, H.D. Belitz, W. Grosch, and P. Schieberle, Editors. 2009, Springer.
13. Haymes, E.M., "Iron", in *Sports Nutrition: Vitamins and Trace Elements*, I. Wolinsky and J.A. Driskell, Editors. 2006, CRC Press.
14. *Decreto-Lei n.º 53/2008, de 25 de Março*. 2008, Diário da República.
15. Allen, L., WHO, "Iron, vitamin A and iodine", in *Guidelines on Food Fortification with Micronutrients*, L. Allen, Editor. 2006, WHO: Geneva.
16. Aukett, M., Y. Parks, P. Scott, e B. Wharton, "Treatment with iron increases weight gain and psychomotor development". *Archives of disease in childhood*, 1986. **61**(9): p. 849-857.

17. Walter, T., I. De Andraca, P. Chadud, e C.G. Perales, "Iron deficiency anemia: adverse effects on infant psychomotor development". *Pediatrics*, 1989. **84**(1): p. 7-17.
18. Hurrell, R.F., "Preventing iron deficiency through food fortification". *Nutrition Reviews*, 1997. **55**(6): p. 210-222.
19. Martinez-Navarrete, N., M. Camacho, J. Martinez-Lahuerta, J. Martinez-Monzó, e P. Fito, "Iron deficiency and iron fortified foods—a review". *Food Research International*, 2002. **35**(2): p. 225-231.
20. Michaelsen, K.F., L. Weaver, F. Branca, C.R.O.f.E. World Health Organization, e A. Robertson, "Minerals other than iron", in *Feeding and Nutrition of Infants and Young Children: Guidelines for the WHO European Region, with Emphasis on the Former Soviet Countries*. WHO Regional Publications, European Series. 2000, ERIC Clearinghouse.
21. Thacher, T.D., P.R. Fischer, J.M. Pettifor, J.O. Lawson, C.O. Isichei, J.C. Reading, e G.M. Chan, "A comparison of calcium, vitamin D, or both for nutritional rickets in Nigerian children". *New England Journal of Medicine*, 1999. **341**(8): p. 563-568.
22. Allen, L., WHO, "Zinc, folate, vitamin B12 and other B vitamins, vitamin C, vitamin D, calcium, selenium and fluoride", in *Guidelines on food fortification with micronutrients*, L. Allen, Editor. 2006, WHO: Geneva.
23. Costa, H., *Análise de Produtos de Nutrição Infantil por Fluorescência de Rx*. 2011, Universidade de Aveiro.
24. Gurr, M., *Calcium in Nutrition*. 1999, ILSI Press: International Life Sciences Institute.
25. Lukaski, C.H., "Zinc", in *Sports Nutrition: Vitamins and Trace Elements*, I. Wolinsky and J.A. Driskell, Editors. 2006, CRC Press.
26. Brown, K., "Suplementación con zinc y crecimiento en niños: un meta análisis de estudios de intervención". *Dieta y Salud*, 1995. **4**(1-2): p. 1-7.
27. MacDonald, R.S., "The role of zinc in growth and cell proliferation". *The Journal of nutrition*, 2000. **130**(5): p. 1500S-1508S.
28. Nishi, Y., "Zinc and growth". *Journal of the American College of Nutrition*, 1996. **15**(4): p. 340-344.
29. Blom, I., S. Jameson, F. Krook, B. Larsson-Stymne, e L. Wranne, "Zinc deficiency with transitory acrodermatitis enteropathica in a boy of low birth weight". *British Journal of Dermatology*, 1981. **104**(4): p. 459-464.
30. Evans, G., "Zinc and its deficiency diseases". *Clinical physiology and biochemistry*, 1985. **4**(1): p. 94-98.
31. WHO, "Zinc", in *Trace elements in human nutrition and health*. 1996, WHO: Geneva.

32. Salgueiro, M.J., M. Zubillaga, A. Lysionek, R. Caro, R. Weill, e J. Boccio, "Fortification strategies to combat zinc and iron deficiency". *Nutrition Reviews-Washington*, 2002. **60**(2): p. 52-58.
33. FAO/WHO, "Vitamin C", in *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*, FAO/WHO, Editor. 1998, FAO/WHO: Bangkok, Thailand.
34. Keith, E.R., "Ascorbic Acid", in *Nutrition: Vitamins and Trace Elements*, I. Wolinsky and J.A. Driskell, Editors. 2006, CRC Press.
35. Alles, M.S., P.A. Scholtens, e J.G. Bindels, "Current trends in the composition of infant milk formulas". *Current Paediatrics*, 2004. **14**(1): p. 51-63.
36. Akre, J., "Lactação", in *Alimentação Infantil - Bases Fisiológicas*, J. Akre, Editor. 1997, IBFAN Brasil.
37. WHO. *Breastfeeding*. n.d. [cited 2015 11 January]; Available from: <http://www.who.int/topics/breastfeeding/en/>.
38. Gibson, R., E. Ferguson, e J. Lehrfeld, "Complementary foods for infant feeding in developing countries: their nutrient adequacy and improvement". *European Journal of Clinical Nutrition*, 1998. **52**(10): p. 764-770.
39. Guo, M., "Introduction: trends and issues in breastfeeding and the use of infant formula" in *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*, M. Guo, Editor. 2014, Elsevier Science.
40. Heppell, N., "Nutritional losses and gains during processing: future problems and issues". *Proceedings of the Nutrition Society*, 2002. **61**(01): p. 145-148.
41. Perring, L., D. Andrey, M. Basic-Dvorzak, e D. Hammer, "Rapid quantification of iron, copper and zinc in food premixes using energy dispersive X-ray fluorescence". *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005. **18**(7): p. 655-663.
42. Soares, E., "Avanca continous Dry-Mix user requirement specification (URS)-Project: vitamin addition". 2013.
43. Nestlé. *Princípios Corporativos*. 2011 [cited 2015 11 January]; Available from: <http://www.empresanestle.pt/conhecianestle/principioscorporativos>.
44. *Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011*. 2012. p. 1-19.
45. Multon, J. e J. Davenas, *1. Qu'est-ce que la qualité d'un produit alimentaire et quels en sont les opérateurs*. La qualité des produits alimentaires, politique, incitations, gestion et contrôle, 1994.
46. Kress-Rogers, E. e A. Ratingen, "Instrumentation for food quality assurance", in *Instrumentation and Sensors for the Food Industry* E. Kress-Rogers and C.J.B. Brimelow, Editors. 2001, CRC Press.

47. Sies, H. e W. Stahl, "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants". *The American journal of clinical nutrition*, 1995. **62**(6): p. 1315S-1321S.
48. Gál, I., "Estimation of Ascorbic Acid (Vitamin C) by Titration". *Nature*, 1936. **138**: p. 799.
49. Tillmans, J., "Das antiskorbutische vitamin". *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 1930. **60**(1): p. 34-44.
50. Anonymous, "Ascorbic Acid by Visual Titration", in *Laboratory Instructions*. 2009, Nestlé, Switzerland. p. 11.
51. Eitenmiller, R.R., W.O. Landen, e L. Ye, "Ascorbic acid: vitamin C", in *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*, R.R. Eitenmiller, W.O. Landen, e L. Ye, Editors. 2007, Taylor & Francis. p. 243-245.
52. Fassel, V.A. e R.N. Kniseley, "Inductively coupled plasma. Optical emission spectroscopy". *Analytical Chemistry*, 1974. **46**(13): p. 1110A-1120a.
53. Hill, S.J.E.A., "Atomic Absorption, Methods and Instrumentation", in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Three-Volume Set, J.C. Lindon, G.E. Tranter, J.L. Holmes, e J.L. Aaa, Editors. 2000, Elsevier Science & Technology.
54. Skoog, D., D. West, F. Holler, e S. Crouch, "Atomic Spectroscopy", in *Fundamentals of Analytical Chemistry*, D. Skoog, D. West, F. Holler, e S. Crouch, Editors. 2013, Cengage Learning.
55. Lajunen, L.H.J., P. Peřařnaki, e R.S.O. Chemistry, "Atomic Absorption Spectrometry", in *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*, L.H.J. Lajunen, Editor. 2004, Royal Society of Chemistry.
56. Van Loon, J.C., "Analytical atomic absorption spectroscopy: selected methods". 1980: Academic Press.
57. Skoog, D.A., F.J. Holler, e S.R. Crouch, "Atomic Spectroscopy", in *Principles of Instrumental Analysis*, D.A. Skoog, F.J. Holler, e S.R. Crouch, Editors. 2007, Thomson Brooks/Cole.
58. Kenkel, J., "Atomic Spectroscopy", in *Analytical Chemistry for Technicians*, Third Edition, J. Kenkel, Editor. 2010, CRC Press.
59. Reh, C., "In-line and off-line FTIR measurements", in *Instrumentation and Sensors for the Food Industry*, Second Edition, E. Kress-Rogers e C.J.B. Brimelow, Editors. 2001, Taylor & Francis. p. 213.
60. Nawrocka, A. e J. Lamorska, "Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods", in *Advances in Agrophysical Research*, S. Gundas e A. Stepniewski, Editors. 2013, InTech.
61. Nicolai, B.M., K. Beullens, E. Bobelyn, A. Peirs, W. Saeys, K.I. Theron, e J. Lammertyn, "Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means

- of NIR spectroscopy: A review". *Postharvest Biology and Technology*, 2007. **46**(2): p. 99-118.
62. Osborne, B.G., T. Fearn, P.H. Hindle, e P.T. Hindle, "Practical NIR Spectroscopy with Applications" in *Food and Beverage Analysis*. 1993: Longman Scientific & Technical.
63. Blanco, M., J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, e C. De La Pezuela, "Determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations by near infrared reflectance spectroscopy". *Talanta*, 1993. **40**(11): p. 1671-1676.
64. Pissard, A., J.A. Fernández Pierna, V. Baeten, G. Sinnaeve, G. Lognay, A. Mouteau, P. Dupont, A. Rondia, e M. Lateur, "Non-destructive measurement of vitamin C, total polyphenol and sugar content in apples using near-infrared spectroscopy". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013. **93**(2): p. 238-244.
65. Yang, H. e J. Irudayaraj, "Rapid determination of vitamin C by NIR, MIR and FT-Raman techniques". *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2002. **54**(9): p. 1247-1255.
66. Liu, H., B. Xiang, e L. Qu, "Structure analysis of ascorbic acid using near-infrared spectroscopy and generalized two-dimensional correlation spectroscopy". *Journal of molecular structure*, 2006. **794**(1): p. 12-17.
67. Seibert, J.A., "X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 1: Basic principles of x-ray production". *Journal of nuclear medicine technology*, 2004. **32**(3): p. 139-147.
68. Slavin, W., "FLAMES, FURNACES, PLASMAS How Do We Choose?" *Analytical Chemistry*, 1986. **58**(4): p. 589A-597A.
69. HORIBA. *X-Ray Fluorescence Analysis*. 2015 [cited 2014 30 December]; Available from: www.horiba.com.
70. [cited 2015 10 January]; Available from: <http://www.panalytical.com/Home.htm>.
71. Brouwer, P., "Theory of XRF-Getting acquainted with the principles". 2013, PANalytical B.V.: The Netherlands.
72. Buckman-Ellis, J. "X-Ray Fluorescence Theory". 2004 [cited 2015 11 January]; Available from: <http://mxp.physics.umn.edu/s04/Projects/s04xrf/theory.htm>.
73. Ciurapinski, A., J. Parus, e D. Donohue, "Particle analysis for a strengthened safeguards system: Use of a scanning electron microscope equipped with EDXRF and WDXRF spectrometers". *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 2002. **251**(3): p. 345-352.
74. Perring, L., D. Andrey, M. Basic-Dvorzak, e J. Blanc, "Rapid multimineral determination in infant cereal matrices using wavelength dispersive X-ray fluorescence". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. **53**(12): p. 4696-4700.

75. Jenkins, R., "X-Ray Techniques: Overview", in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd.
76. Kueppers, S. e M. Haider, "Process analytical chemistry—future trends in industry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003. **376**(3): p. 313-315.
77. Perring, L. e D. Andrey, "ED-XRF as a tool for rapid minerals control in milk-based products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. **51**(15): p. 4207-4212.
78. Perring, L. e D. Andrey, "Wavelength-dispersive x-ray fluorescence measurements on organic matrices: application to milk-based products". *X-Ray Spectrometry*, 2004. **33**(2): p. 128-135.
79. Anonymous, "Minerals by x-ray fluorescence", in *Laboratory Instructions*. 2011, Nestlé, Switzerland.
80. Miller, J.N., "Basic statistical methods for Analytical Chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review". *Analyst*, 1991. **116**(1): p. 3-14.
81. Vila Real, C., "Estudo de métodos analíticos alternativos para quantificação do teor de cálcio, ferro e vitamina C em pré-misturas enriquecidas em micronutrientes", in *Escola Superior de Biotecnologia*. 2014, Universidade Católica Portuguesa: Porto.
82. Wang, Y.J. e L. Wang, "Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches". *Starch-Stärke*, 2000. **52**(8-9): p. 296-304.
83. Loret, C., V. Meunier, W.J. Frith, e P.J. Fryer, "Rheological characterisation of the gelation behaviour of maltodextrin aqueous solutions". *Carbohydrate Polymers*, 2004. **57**(2): p. 153-163.
84. Marguá, E., I. Queralt, e M. Hidalgo, "Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009. **28**(3): p. 362-372.
85. Kuijper, A., "Sample preparation for X-ray fluorescence analysis". 1996.
86. Ellison, S.L.R., T.J. Farrant, e V. Barwick, "7. Regression", in *Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide*, S.L.R. Ellison, T.J. Farrant, e V. Barwick, Editors. 2009, RSC Publishing.
87. RELACRE, "Guia RELACRE 13", in *VALIDAÇÃO DE MÉTODOS INTERNOS DE ENSAIO EM ANÁLISE QUÍMICA*. 2000.
88. International Organization for Standardization ISO. "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results" - Part 6: Use in practice of accuracy values. ISO 5725-6. Geneva 1994.

ANEXOS

ANEXO A

1. Quantificação do teor de cálcio em cereais de pequeno almoço

Como mencionado anteriormente, simultaneamente ao trabalho desenvolvido para alcançar os objectivos desta dissertação, colaborei também no desenvolvimento de uma metodologia alternativa para quantificação de cálcio em cereais de pequeno-almoço.

Este tema nasceu, à semelhança do trabalho realizado para as pré-misturas vitamínicas, da necessidade de se controlar melhor o processo de produção dos cereais de pequeno-almoço, de forma a garantir, na linha de produção, a qualidade nutricional dos produtos finais.

Os padrões de calibração usados na construção das curvas de calibração a seguir representadas foram amostras diárias da linha de produção. Todas as análises de FAAS (método de referência) foram realizadas pelos analistas do laboratório físico-químico da fábrica da Nestlé de Avanca. Seguiu-se as análises das respectivas amostras por espectroscopia de XRF e a geração dos modelos matemáticos através do programa *Q-Stat*.

1.1 Curva de calibração única para quantificação de cálcio em 4 produtos diferentes

Apesar de, na fábrica da Nestlé de Avanca se produzirem, atualmente, quatro tipologias de cereais de pequeno-almoço, a criação de um modelo de calibração único para quantificação de cálcio através de espectroscopia de XRF seria, pela simplificação do processo de análise, uma vantagem comparativamente à criação de quatro modelos (um modelo por produto). Por este motivo, ainda que a composição dos quatro produtos se diferenciem, particularmente pela presença ou ausência de cacau (tabela 25), começou-se por investigar a possibilidade de se construir um modelo de calibração único para quantificar o teor de cálcio em amostras destes quatro diferentes produtos.

Tabela 25 - Gamas de concentrações esperadas e composição dos cereais de pequeno-almoço.

Produto	Contém cacau na composição	Gama de concentrações esperada (mg/100g)	
		Min.	Máx.
A	Sim	400	700
B	Sim	400	694
C	Não	364	546
D	Não	400	658

As principais características do modelo matemático criado (tabela 26) e a respectiva curva de calibração encontram-se representadas na tabela e gráficos seguintes.

Tabela 26 - Características principais curva de calibração única para quantificação de cálcio em 4 produtos diferentes.

Curva de calibração	Gama de concentrações (mg/100g)		Modelo matemático	n	R ²	SEC (mg/100g)
	Min.	Máx.				
1	366,00	753,00	$Y=73,296+0,847X$	96	0,831	18,956

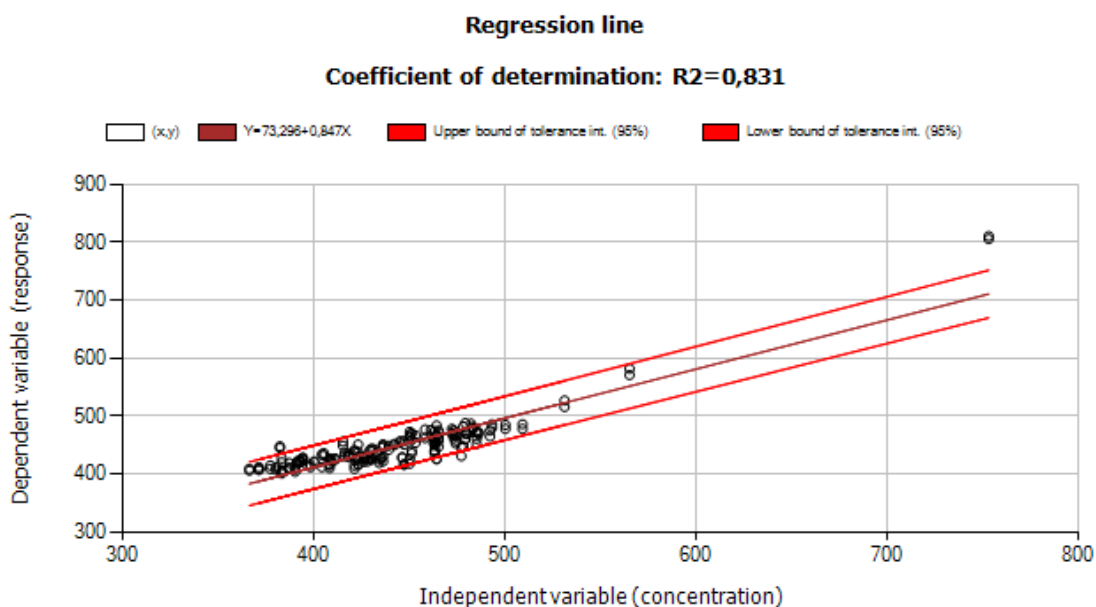


Figura 24 - Curva de calibração única para quantificação de cálcio em 4 produtos diferentes.

Para a construção do modelo matemático anterior foram analisadas um total de 96 amostras dos quatro produtos (A, B, C e D), o que vai de acordo com a norma da Nestlé que recomenda o uso de 25 a 30 amostras [79]. As gamas de concentrações esperadas para os quatro produtos estão compreendidas no intervalo 364-700 mg/100g. Apesar da gama de concentrações ser extensa e ter como mínimo 366,00 mg/100g e máximo 753,00 mg/100g respectivamente, este modelo permite detetar sobredosagens de cálcio na preparação destes produtos. No entanto, pelo facto do valor do limite inferior da gama de concentrações ser superior ao limite inferior da gama de trabalho, este modelo não permite detetar uma dosagem de cálcio deficiente na preparação destes produtos.

O R^2 calculado foi de 0,831 sendo inferior a 0,850 - limite mínimo aceite pela norma da Nestlé [79]. O SEC calculado para este modelo foi de 18,956 mg/100g.

Uma vez que é de conhecimento científico que as composições das matrizes dos padrões de calibração devem ser o mais idênticas possíveis [84], decidiu-se investigar se a geração de dois modelos matemáticos, um para os produtos com cacau e outro para os produtos sem cacau ao invés de um influenciavam positivamente as características dos novos modelos.

1.2. Curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos com cacau

Na construção do modelo de calibração para quantificação de cálcio em cereais de pequeno-almoço com cacau na composição foram analisadas 50 amostras dos produtos A e B.

As principais características do novo modelo gerado encontram-se representadas na tabela e gráfico seguintes.

Tabela 27- Características principais curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos com cacau.

Curva de calibração	Gama de concentrações (mg/100g)		Modelo matemático	n	R^2	SEC (mg/100g)
	Min.	Máx.				
2	404,00	531,00	$Y=118,028+0,735X$	50	0,675	12,793

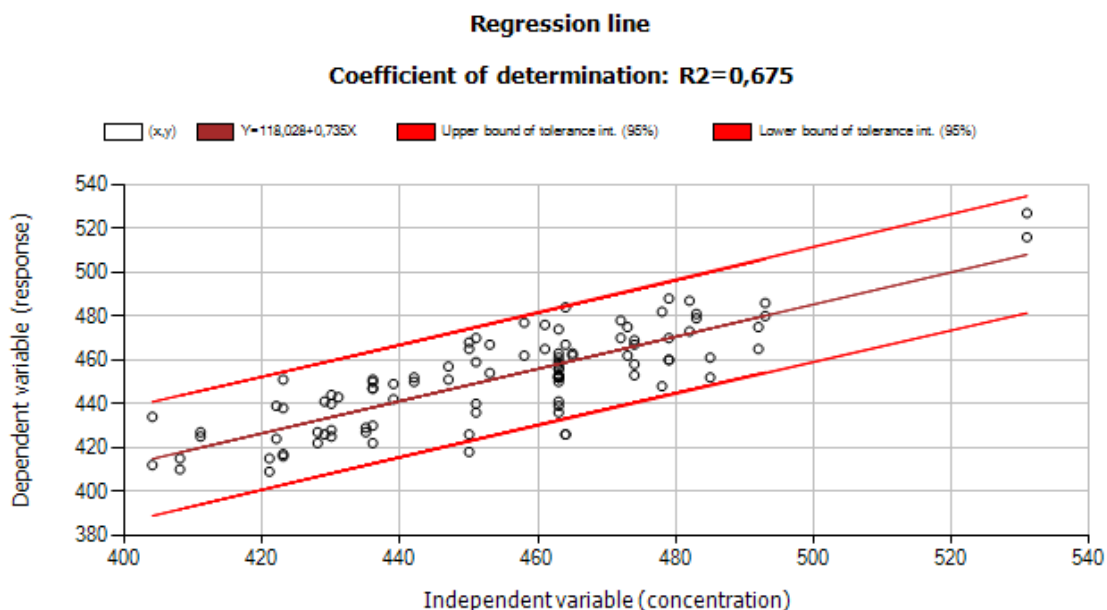


Figura 25 - Curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos com cacau.

O R^2 calculado foi de 0,675 sendo muito baixo e inferior a 0,850 - limite mínimo aceite pela norma da Nestlé [79].

A gama de concentrações é pouco extensa, tendo como limites mínimo e máximo 404,00 e 531,00 mg/100g respectivamente. Uma vez que o limite inferior desta gama é superior a 400 mg/100g (limite mínimo da concentração esperada para os produtos com cacau) e o limite máximo é inferior a 700 mg/100g (limite máximo de concentração esperada para os produtos com cacau), este modelo não permite detectar possíveis sobredosagens ou dosagens deficientes de cálcio na preparação destes produtos. O SEC calculado para este modelo foi de 12,793 mg/100g.

1.3 Curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos sem cacau

Na construção do modelo de calibração para quantificação de cálcio em cereais de pequeno-almoço sem cacau na composição foram analisadas 46 amostras dos produtos C e D.

As principais características do novo modelo gerado encontram-se representadas na tabela e gráfico seguintes.

Tabela 28 - Características principais curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos sem cacau.

Curva de calibração	Gama de concentrações (mg/100g)		Modelo matemático	n	R ²	SEC (mg/100g)
	Min.	Máx.				
3	366,00	753,00	$Y=49,486+0,919X$	46	0,895	20,473

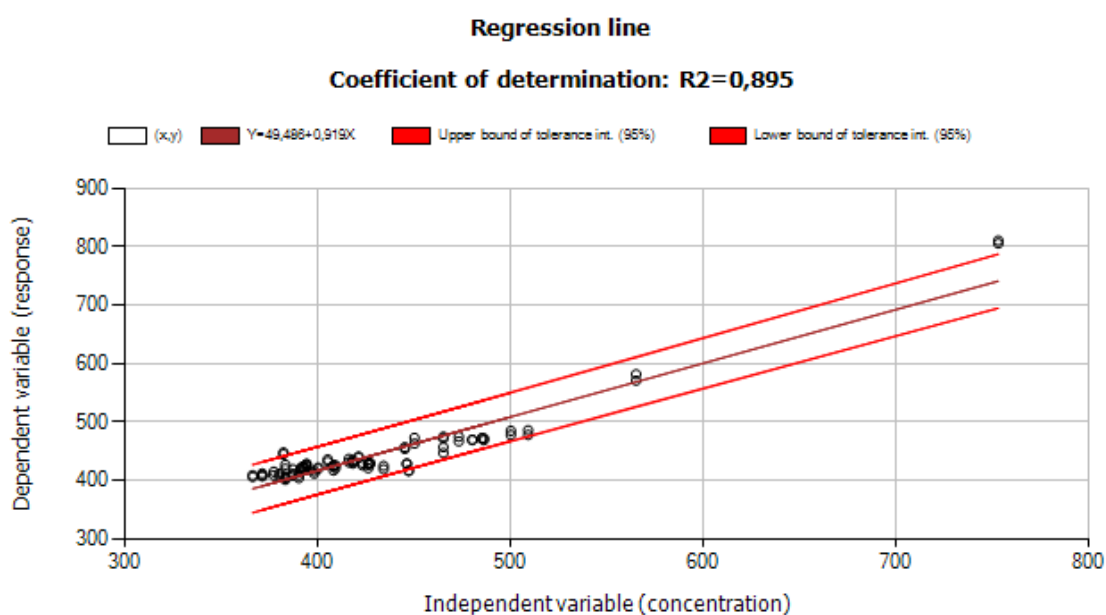


Figura 26 - Curva de calibração para quantificação de cálcio em produtos sem cacau.

O R² calculado foi de 0,895 sendo superior a 0,850 - limite mínimo aceite pela norma da Nestlé [79].

A gama de concentrações é muito extensa, tendo como limites mínimo e máximo 366,00 e 753,00 mg/100g respectivamente.

Uma vez que o limite inferior desta gama é superior a 364 mg/100g (limite mínimo de concentração esperada para os produtos com cacau) e o limite máximo é superior a 658 mg/100g (limite máximo de concentração esperada para os produtos com cacau), este modelo permite detectar apenas possíveis

sobredosagens de cálcio na preparação destes produtos, não permitindo detetar dosagens deficientes. O SEC calculado para este modelo foi de 20,473 mg/100g.

Foi possível visualizar-se que, apesar de existir uma relação linear entre as concentrações de cálcio determinadas por FAAS e as previstas pelo espectrómetro de XRF confirmada pelas baixas diferenças obtidas para os dois métodos, os valores dos coeficientes de determinação dos três modelos anteriores são baixos.

No que respeita à deteção de erros na preparação destes produtos verificou-se, para todos os modelos gerados, que apenas através da curva de calibração única e da curva de calibração para produtos sem cacau era possível detectar possíveis sobredosagens de cálcio. Não sendo possível, através dos modelos gerados, a deteção de dosagens deficientes de cálcio durante a formulação dos produtos investigou-se, à semelhança das pré-misturas VM, se a preparação de amostras experimentais de concentrações inferiores aos limites mínimos da gama de concentrações esperada era exequível. Por questões inerentes às receitas e aos processos de produção dos cereais de pequeno-almoço a realização destas amostras não foi possível.

As amostras oriundas da linha de produção e usadas como padrões de calibração na construção das três curvas de calibração apresentadas anteriormente não variaram muito, com exceção de uma amostra do produto A, em concentração de cálcio não contribuindo para o aumento da linearidade dos modelos gerados.

De forma a aumentar a gama de linearidade das curvas de calibração investigou-se, assim, se havia possibilidade de se preparar, em laboratório, amostras de concentrações superiores em cálcio às amostras da linha de produção. A preparação destas amostras baseou-se, na adição de quantidades conhecidas de carbonato de cálcio (fonte de cálcio das receitas) aos produtos finais. As referidas amostras foram analisadas por FAAS e os resultados obtidos por este método foram comparados com os teóricos previstos. Observou-se que, em todas as análises, os resultados obtidos por FAAS afastaram-se muitos dos resultados previstos.

Uma justificação possível para estes resultados é o facto de não se ter conseguido amostras suficientemente homogéneas.

1.4 Análise de amostras de cereais de pequeno-almoço da linha de produção

Após terem sido desenvolvidos os três modelos de calibração apresentados anteriormente para quantificação de cálcio em cereais de pequeno-almoço decidiu-se avaliar a performance dos mesmos. Recolheram-se, assim, da linha de produção, três amostras dos produtos A, B e D e procedeu-se à quantificação do teor de cálcio por FAAS e XRF. As análises por XRF foram realizadas em duplicado. A quantificação de cálcio nos produtos com cacau na sua composição (A e B) foi realizada através das curvas de calibração 1 e 2 doravante designadas por, respectivamente modelo único e modelo com cacau. Por outro lado, o produto D como não possui cacau na sua composição, a quantificação de cálcio nas amostras deste produto foi realizada a partir das curvas de calibração 1 (modelo único) e 3 doravante designada por modelo sem cacau.

Tabela 29 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para os modelos único e com cacau na quantificação de cálcio a amostras do produto A.

Amostra	Resultado FAAS (mg/100g)	Modelo único		Modelo com cacau	
		Resultado XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)	Resultado XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)
A_5158_03;59_1	474	491	-17	499	-25
A_5158_03;59_2	474	496	-22	504	-30
A_5156_19;27_1	446	447	-1	452	-6
A_5156_19;27_2	446	448	-2	453	-7
A_5159_02;35_1	467	487	-20	487	-20
A_5159_02;35_2	467	495	-28	483	-16
A_Ref_1	411	439	-28	449	-38
A_Ref_2	411	444	-33	450	-39
		Média	-19	-	-23

Para além destas amostras foram também analisadas por XRF uma amostra de referência para cada produto, com exceção do produto D em que tal não foi

possível. As amostras de referência são amostras fornecidas por um organismo reconhecido e credível que possuem um valor de concentração conhecido ou outra grandeza para cada parâmetro a analisar [87].

A tabela e gráfico anteriores evidenciam os resultados obtidos por FAAS e por XRF bem como as respectivas diferenças entre eles para o conjunto amostral do produto A.

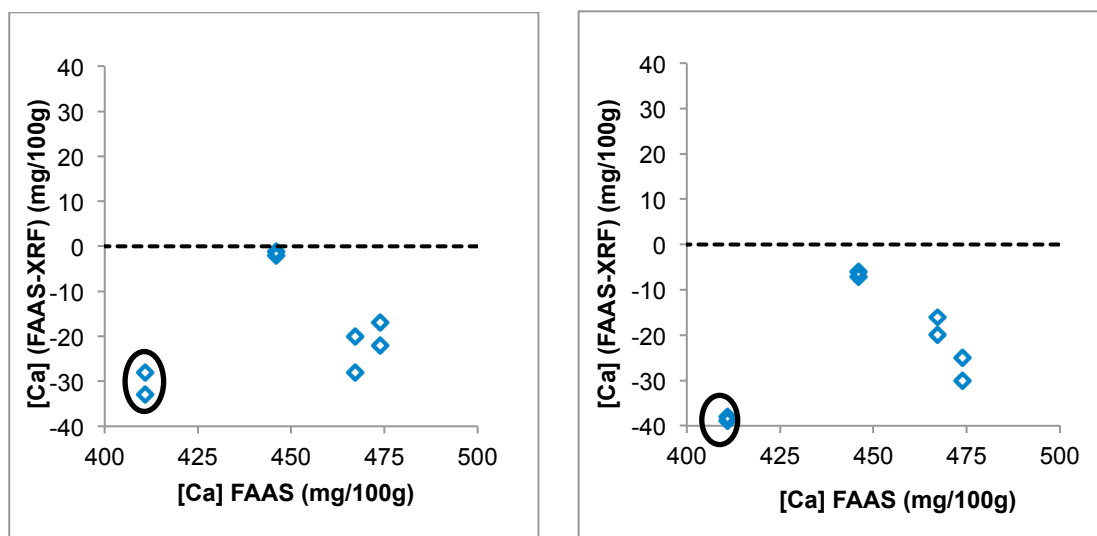


Figura 27 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na quantificação de cálcio de amostras do produto A através do modelo único (esquerda) e modelo com cacau (direita).

Pela tabela e gráficos anteriores é possível observar-se que, para ambos os modelos de calibração, a diferença máxima entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi de 39 mg/100g. Verificou-se também que, tanto no modelo de calibração único como no modelo de calibração com cacau existe uma tendência para, em todas as análises, a metodologia XRF fornecer sempre resultados superiores aos obtidos por FAAS.

Analisando as diferenças entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de todo o conjunto amostral verificou-se que, à exceção de uma amostra as diferenças foram menores quando as análises foram realizadas utilizando o modelo único em detrimento do modelo com cacau. De referir também que o mesmo sucedeu para a análise da amostra de referência, assinalada nos gráficos com um círculo.

A tabela e gráfico seguintes evidenciam os resultados obtidos por FAAS e por XRF bem como as respectivas diferenças entre eles para o conjunto amostral do produto B.

Tabela 30 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para os modelos único e com cacau na quantificação de cálcio a amostras do produto B.

Amostra	Resultado FAAS (mg/100g)	Modelo único		Modelo com cacau	
		Resultado XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)	Resultado XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)
B_5112_22;49_1	487	476	11	482	5
B_5112_22;49_2	487	475	12	483	4
B_5111_23;05_1	477	447	30	456	21
B_5111_23;05_2	477	452	25	458	19
B_5104_01;12_1	473	449	24	457	16
B_5104_01;12_2	473	437	36	447	26
B_Ref_1	423	413	10	420	3
B_Ref_2	423	416	7	429	-6
		Média	19	-	11

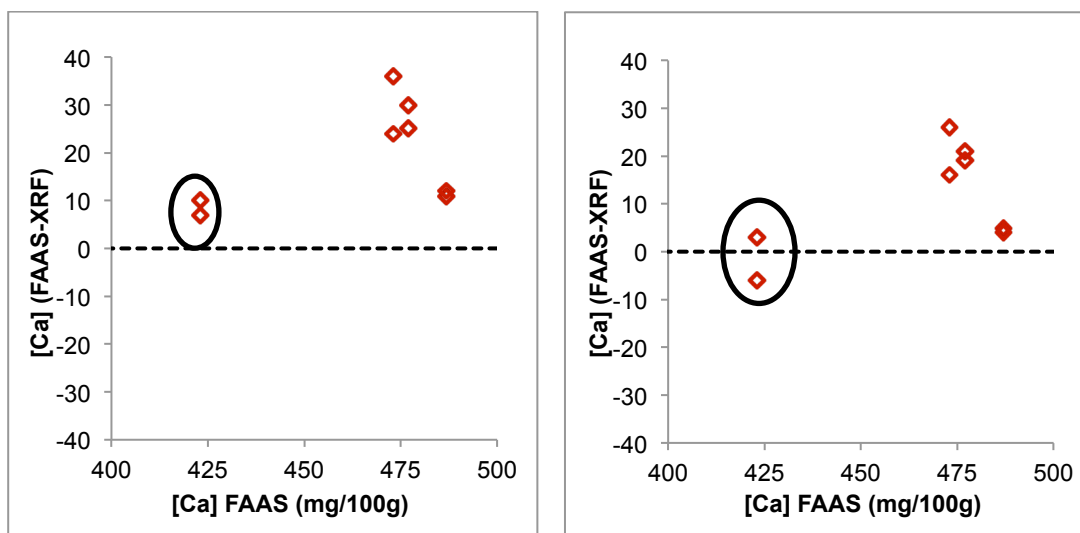


Figura 28 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na quantificação de cálcio de amostras do produto B através do modelo único (esquerda) e modelo com cacau (direita).

Pela tabela e gráficos anteriores é possível observar-se que, para ambos os modelos de calibração, a diferença máxima entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi de 36 mg/100g. Verificou-se também que, tanto no modelo de

calibração único como no modelo de calibração com cacau existe uma tendência para, na maioria das análises efetuadas, a metodologia XRF fornecer sempre resultados inferiores aos obtidos por FAAS.

Analisando as diferenças entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de todo o conjunto amostral verificou-se que, à exceção de uma amostra as diferenças foram menores quando as análises foram realizadas utilizando o modelo com cacau em detrimento do modelo único. De referir também que o mesmo sucedeu para a análise da amostra de referência, assinalada nos gráficos com um círculo.

A tabela e gráfico seguintes evidenciam os resultados obtidos por FAAS e por XRF bem como as respectivas diferenças entre eles para o conjunto amostral do produto D.

Tabela 31 - Comparação entre os resultados obtidos por FAAS e XRF para os modelos único e com cacau na quantificação de cálcio a amostras do produto B.

Amostra	Resultado FAAS (mg/100g)	Modelo único		Modelo sem cacau	
		Resultado XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)	Resultado XRF (mg/100g)	FAAS-XRF (mg/100g)
D_5144_Rov1_1	385	395	-10	388	-3
D_5144_Rov1_2	385	393	-8	387	-2
D_5144_17;56_1	460	431	29	423	37
D_5144_17;56_2	460	442	18	433	27
D_7;13_1	458	435	23	435	23
D_7;13_2	458	429	29	429	29
		Média	14	-	19

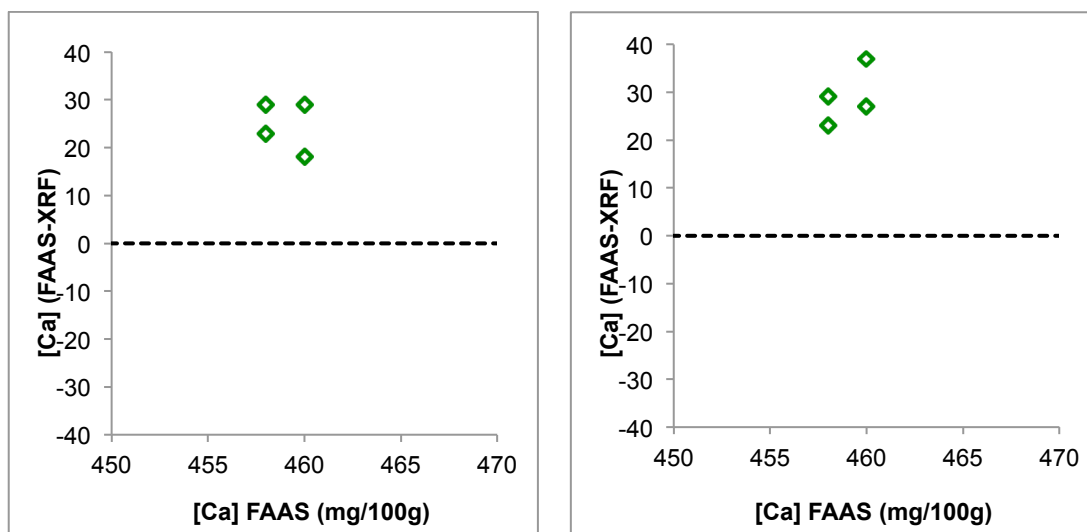


Figura 29 - Comparação gráfica entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na quantificação de cálcio de amostras do produto D através do modelo único (esquerda) e modelo sem cacau (direita).

Pela tabela e gráficos anteriores é possível observar-se que, para ambos os modelos de calibração, a diferença máxima entre os resultados obtidos pelos dois métodos foi de 37 mg/100g. Verificou-se também que, tanto no modelo de calibração único como no modelo de calibração sem cacau existe uma tendência para, em todas as análises efetuadas, a metodologia XRF fornecer sempre resultados inferiores aos obtidos por FAAS.

Analisando as diferenças entre os resultados obtidos por FAAS e XRF na análise de todo o conjunto amostral verificou-se que, as diferenças obtidas quando as análises foram realizadas utilizando os modelos único e sem cacau foram muito idênticas.

ANEXO B

Tabela 32- Concentrações esperadas vs. obtidas por FAAS para as amostras experimentais das pré-misturas VM 76 e 98.

	Amostra	Concentração esperada (mg/100g)	Concentração obtida por FAAS (mg/100g)	Obtido- Esperado (mg/100g)
Pré-mistura VM 76	76-57% Zn	17,00	20,51	3,51
	76-57% Zn2	17,00	17,59	0,59
	76-37%Zn	25,00	29,32	4,32
	76-37%Zn2	25,00	25,62	0,62
	76+76%Zn	70,00	72,42	2,42
	76+76%Zn2	70,00	75,86	5,86
	76+114%Zn	85,00	95,71	10,71
	76+114%Zn2	85,00	95,04	10,04
	76+154%Zn	101,00	112,67	11,67
	76+154%Zn2	101,00	103,07	2,07
	76+229%Zn	131,00	145,15	14,15
	76+229%Zn2	131,00	148,57	17,57
Pré-mistura VM 98	76-57% Zn	175,00	174,10	0,90
	98-73%Zn2	175,00	173,74	1,26
	98-65%Zn	225,00	208,84	16,16
	98-65%Zn2	225,00	205,68	19,32
	98-57%Zn	275,00	273,73	1,27
	98-57%Zn2	275,00	276,80	1,80
	98-50%Zn	325,00	321,81	3,19
	98-50%Zn2	325,00	321,68	3,32
	98-42%Zn	375,00	381,59	6,59
	98-42%Zn2	375,00	365,23	9,77
	98-34%Zn	425,00	415,60	9,40
	98-34%Zn2	425,00	412,54	12,46
	98-27%Zn	475,00	487,21	12,21
	98-27%Zn2	475,00	489,46	14,46
	98-19%Zn	525,00	519,43	5,57
	98-19%Zn2	525,00	519,24	5,76
	98-15%Zn	550,00	590,84	40,84
	98-15%Zn2	550,00	561,47	11,47
	98-3%Zn	625,00	674,09	49,09
	98-3%Zn2	625,00	633,59	8,59
	98+16%Zn	750,00	756,54	6,54
	98+16%Zn2	750,00	771,40	21,40
	98+20%Zn	775,00	767,55	7,45
	98+20%Zn2	775,00	771,06	3,94
	98+24%Zn	800,00	782,84	17,16
	98+24%Zn2	800,00	789,35	10,65
	98+28%Zn	825,00	813,09	11,91
	98+28%Zn2	825,00	807,50	17,50
98+32%Zn	850,00	853,50	3,50	
98+32%Zn2	850,00	833,72	16,28	
98+39%Zn	900,00	923,11	23,11	
98+39%Zn2	900,00	905,04	5,04	

Tabela 33 - Concentrações esperadas vs. obtidas por FAAS para as amostras experimentais da pré-mistura VM 75.

	Amostra	Concentração esperada (mg/100g)	Concentração obtida por FAAS (mg/100g)	 Obtido-Esperado (mg/100g)
Pré-mistura VM 75	76-57% Zn	200,00	206,7	6,70
	75-36%Zn2	200,00	217,66	17,66
	75-28%Zn	225,00	199,80	25,20
	75-28%Zn2	225,00	243,15	18,15
	75-24%Zn	240,00	243,03	3,03
	75-24%Zn2	240,00	252,73	12,73
	75-4%Zn	300,00	304,83	4,83
	75-4%Zn2	300,00	314,28	14,28
	75+27%Zn	400,00	411,50	11,50
	75+27%Zn2	400,00	392,83	7,17
	75+35%Zn	425,00	449,76	24,76
	75+35%Zn2	425,00	440,37	15,37
	75+51%Zn	475,00	515,86	40,86
	75+51%Zn2	475,00	494,40	19,40

ANEXO C

Tabela 34 - Concentrações obtidas por FAAS e previstas por XRF na construção da curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 76 e 98.

Valor médio obtido por FAAS (mg/100g)	Valor obtido por XRF (mg/100g)	 FAAS- XRF (mg/100g)
17,59	24,70	7,11
17,59	18,64	1,05
20,51	21,91	1,40
20,51	19,33	1,18
25,62	26,87	1,25
25,62	22,06	3,56
29,32	27,17	2,15
29,32	28,71	0,61
42,13	42,51	0,38
42,13	44,25	2,12
42,94	39,46	3,48
42,94	42,41	0,53
43,01	46,61	3,60
43,01	42,52	0,49
43,50	34,32	9,18
43,50	39,78	3,72
44,49	41,80	2,69
44,49	51,87	7,38
45,69	37,74	7,95
45,69	46,01	0,32
45,72	55,26	9,54
45,72	41,48	4,24
45,85	51,17	5,32
45,85	36,49	9,36
46,13	42,09	4,04
46,13	39,04	7,09
46,33	36,67	9,66
46,33	40,71	5,62
47,93	49,23	1,30
47,93	36,36	11,57
47,93	44,79	3,14
47,93	43,32	4,61
48,31	46,50	1,81
48,31	38,72	9,59
48,34	43,61	4,73

48,34	41,87	6,47
48,44	55,99	7,55
48,44	41,88	6,56
72,42	92,01	19,59
72,42	81,24	8,82
75,86	73,43	2,43
75,86	77,62	1,76
95,04	108,95	13,91
95,04	112,90	17,86
95,71	111,59	15,88
95,71	111,80	16,09
103,07	149,02	45,95
103,07	130,49	27,42
112,67	141,34	28,67
112,67	148,95	36,28
173,74	144,21	29,53
173,74	151,29	22,45
174,10	161,36	12,74
174,10	154,02	20,08
205,68	207,92	2,24
205,68	201,53	4,15
208,84	211,04	2,20
208,84	200,03	8,81
273,73	256,77	16,96
273,73	278,79	5,06
276,80	242,33	34,47
276,80	259,91	16,89
321,68	277,66	44,02
321,68	284,17	37,51
321,81	294,28	27,53
321,81	287,11	34,70
365,23	330,40	34,83
365,23	322,17	43,06
381,59	339,94	41,65
381,59	338,04	43,55
412,54	405,09	7,45
412,54	390,32	22,22
415,60	409,23	6,37
415,60	400,74	14,86
487,21	481,84	5,37
487,21	498,66	11,45
489,46	494,64	5,18
489,46	492,77	3,31
519,24	524,65	5,41

519,24	518,90	0,34
519,43	504,10	15,33
519,43	516,94	2,49
561,47	578,42	16,95
561,47	557,57	3,90
633,59	654,83	21,24
633,59	655,53	21,94
644,48	625,48	19,00
644,48	655,41	10,93
649,51	643,14	6,37
649,51	693,37	43,86
667,32	650,11	17,21
667,32	642,19	25,13
668,38	627,07	41,31
668,38	649,59	18,79
670,83	625,94	44,89
670,83	620,72	50,11
673,08	615,75	57,33
673,08	640,48	32,60
674,09	662,56	11,53
674,09	680,70	6,61
674,90	621,10	53,80
674,90	650,27	24,63
714,54	673,80	40,74
714,54	668,28	46,26
756,54	791,99	35,45
756,54	799,23	42,69
771,40	820,37	48,97
771,40	790,98	19,58
853,50	969,05	115,55
853,50	957,21	103,71

ANEXO D

Tabela 35 - Concentrações obtidas por FAAS e previstas por XRF na construção da curva de calibração para quantificação de zinco em pré-misturas VM 75.

Valor médio obtido por FAAS (mg/100g)	Valor obtido por XRF (mg/100g)	 FAAS-XRF (mg/100g)
208,04	217,05	9,01
208,04	218,78	10,74
217,66	235,82	18,16
217,66	233,56	15,90
227,89	220,95	6,94
227,89	246,70	18,81
243,03	248,61	5,58
243,03	256,37	13,34
243,15	247,35	4,20
243,15	238,61	4,54
252,73	249,19	3,54
252,73	253,78	1,05
304,83	304,62	0,21
304,83	300,26	4,57
310,12	320,24	10,12
310,12	336,87	26,75
310,98	298,93	12,05
310,98	298,03	12,95
311,20	313,37	2,17
311,20	320,77	9,57
314,28	291,89	22,39
314,28	324,97	10,69
315,10	339,78	24,68
315,10	336,37	21,27
317,20	330,99	13,79
317,20	344,39	27,19
318,11	315,15	2,96
318,11	287,88	30,23
323,43	334,07	10,64
323,43	358,92	35,49
323,50	317,57	5,93
323,50	304,02	19,48
324,88	314,32	10,56
324,88	315,30	9,58
325,05	311,18	13,87
325,05	313,15	11,90

340,88	314,68	26,20
340,88	366,74	25,86
340,88	319,79	21,09
356,32	317,01	39,31
356,32	321,55	34,77
367,96	330,61	37,35
367,96	346,54	21,42
368,87	330,86	38,01
411,50	432,45	20,95
411,50	388,03	23,47
440,37	457,12	16,75
440,37	461,35	20,98
449,76	461,17	11,41
449,76	447,47	2,29
494,40	483,98	10,42
494,40	497,39	2,99

