

Joana Rita de Lima Dias

# **CONTROLO DA QUALIDADE DO LEITE NUMA EMPRESA DE LACTICÍNIOS**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química**

**Área de especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente**

Orientação do Professor Doutor Jorge Luís Gabriel F. S. Costa Pereira

Co-orientação da Engenheira Maria Eduarda Alves Mendes

**Janeiro 2016**

**Universidade de Coimbra**

---

## ***Agradecimentos***

Quem me conhece sabe que sou uma pessoa de números...não de letras, por isso de uma forma muito sucinta quero agradecer a todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, me ajudaram a ultrapassar todas as dificuldades que foram surgindo ao longo do percurso de mestrado. Mas claro que existem pessoas às quais terei de prestar sempre os meus agradecimentos.

Ao Tiago, estarei sempre eternamente grata ao meu marido, por ter compreendido todas os minutos, todas as horas e todos os dias que tive que me ausentar, tanto fisicamente, como psicologicamente, para poder me dedicar à elaboração desta dissertação, sem ele nada disto teria sido possível.

À minha mãe, ao resto da família e aos meus amigos por terem cuidado dos meus filhos quando não me era possível, por todo o carinho e incentivo que me foram dando ao longo do caminho, um muito obrigado. À Joana, “quem tem uma Joana tem tudo e quem não tiver uma que a arranje”! O apoio sempre foi recíproco e funcionamos sempre na perfeição, sem ti tudo seria mais penoso....muito obrigado por tudo!

Muito obrigado a todos os colaboradores da Lactogal que sempre demonstraram enorme disponibilidade para me ajudar a compreender todo o funcionamento daquela unidade, em especial ao pessoal do laboratório. Muito obrigado à Engenheira Donzília Cantarinho por toda a disponibilidade apresentada em esclarecer as dúvidas que iam aparecendo e ao pessoal com quem trabalhei diretamente, à Catarina, à Adélia, ao Gonçalo, à Fátima, ao Paulo e à Manuela, por estarem sempre disponíveis para me ajudarem no que foi necessário sempre com um sorriso no rosto e que sem a sua ajuda a realização deste trabalho seria muito mais complicada.

E claro, aos meus orientadores de tese, à Engenheira Eduarda Mendes e ao Professor Doutor Jorge Costa Pereira por estarem sempre disponíveis para me elucidarem em todas as dúvidas que foram surgindo ao longo do percurso, um muito obrigado.

Mas claro que o maior agradecimento de todos é para os meus filhos, Leonor e Diogo, que através dos seus sorrisos me incentivaram a continuar quando o que mais me apetecia era parar e desistir, para vocês, o maior agradecimento do mundo!!



---

## ***Objetivos***

O objetivo de partida do projeto inserido no Mestrado em Química no Ramo de Controlo da Qualidade e Ambiente foi a obtenção de um método expedito que permitisse uma rápida análise da qualidade microbiana do leite cru, matéria prima de toda a cadeia de produção de laticínios no momento da receção do mesmo nas unidades de produção. Como resultado do trabalho diário no laboratório outros objetivos de trabalho se foram traçando paralelamente com o inicial. Desta forma a implementação e validação de métodos de determinação da acidez e de lactose do leite foram também realizados.

## ***Resumo***

A presente dissertação teve como base o desenvolvimento e aplicação de diversos testes de natureza microbiológica (contagem de microrganismos) e físico-química (prova de álcool, teste de resazurina, determinação do valor do pH e acidez) que permitem a identificação da qualidade do leite cru. Paralelamente a estas análises foi também realizada a validação de métodos de análise da determinação da acidez do leite através da aplicação de ferramentas estatísticas.

Através do estudo dos parâmetros referidos foi possível a formulação de uma equação, embora ainda rudimentar, que relaciona os valores obtidos com a contaminação microbiológica da matéria prima.

Os leites com baixo teor em lactose também foram alvo de estudos, através da aplicação de um método inovador que utiliza biosensores para verificar a concentração em lactose. A formação dos colaboradores que iriam laborar com este equipamento de quantificação também foi realizada no decorrer do estágio, assim como a monitorização do processo de produção deste tipo de leite.

## **Palavras-chave:**

Controlo de Qualidade, Leite, Placas MPCA 30°C, D-Count, Resazurina; Lactose, Biomilk.



---

## ***Abstract***

The present reasoning had as a basis the development and application of several tests of microbiological nature (counting of microorganisms) and physics- chemistry (alcohol testing, Resazurin test, determining the PH and acidity values) that allow the identification of raw milk. Paralelamente a estas análises foi também realizada a validação de métodos de análise da determinação da acidez do leite através da aplicação de ferramentas estatísticas. At the same time it was performed the validation of analytical methods of determining the acidity by the application of statistical tools .

Through the study of the referred parameters, it was possible to formulate an equation, although still dated, which mirror the obtained results with the microbiological contamination from raw material.

Also, the milks with low lactose percentage were analyzed, through the application of an innovative method that utilizes biosensors to verify the lactose concentration. The training of the participants that were going to work with this quantification material was also accomplished during the internship, as well as the monitoring of the production process of this type of milk.

### **Keywords:**

Quality Control, Milk, 30°C MPCA Plates, D-Count, Resazurin, Lactose, Biomilk



---

## ***Preâmbulo***

Esta tese descreve o trabalho desenvolvido num estágio com a duração de dez meses no Laboratório de Controlo da Qualidade da Lactogal, Produtos Alimentares S.A. sediado na Tocha. O estágio está integrado no segundo ano do mestrado em Química, Ramo de Controlo da Qualidade da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e permitiu o contacto direto com técnicas de controlo da qualidade usadas nesta unidade de produtos alimentares.

A presente dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos. O primeiro capítulo diz pretende dar uma visão global sobre a origem da empresa Lactogal Produtos Alimentares S.A. e seu desenvolvimento ao longo dos anos. Todos os fundamentos teóricos imprescindíveis para a execução e compreensão do trabalho desenvolvido foram abordados no segundo capítulo. No terceiro capítulo referem-se os métodos e os materiais necessários à realização do trabalho, assim como o procedimento para aplicação das ferramentas estatísticas necessárias. No capítulo quarto são apresentados os resultados obtidos durante a execução da parte experimental, assim como todos os resultados e discussões provenientes do tratamento estatísticos enquanto que as conclusões do trabalho são referidas no capítulo cinco.

É de realçar a utilização do ponto decimal como separador dos números reais em detrimento da virgula de modo a facilitar a apresentação, o transporte e tratamento de dados.

Durante o capítulo quatro, aos valores estimados está associado o seu respetivo erro padrão, indicado dentro de parêntesis, de modo a apresentar um maior rigor estatístico aos valores estimados.

---

# Nomenclatura

$b_0$	Ordenada na origem (curva de calibração de primeiro grau)
$b_1$	Ddeclive da reta de calibração (coeficiente de sensibilidade)
$H_0$	Hipótese Nula
$H_1$	Hipótese Alternativa
$SS_A$	Dispersão entre níveis do fator
$SS_{pe}$	Dispersão aleatória (dentro dos níveis)
$SS_T$	Dispersão Total
$\mu$	Média
$\sigma$	Desvio Padrão
AL	Linhas de Ação ( Action Lines)
ANOVA	Análise de Variância (Analysis of variance)
aq	Estado aquoso
CL	Linha de Controlo (Central Line)
CV	Coefficiente de variação
dm	Média das diferenças
FAD	Flavina-adenina dinucleótido
GLC	Cromatografia Gás-Sólido (Gas-Liquid-Chromatography)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (High-performance liquid chromatography)
IC	Intervalo de Confiança
k	Número de réplicas por amostra

---

LAL Linha de Inferior de Ação ( Lower Action Line)

LINA Leite Instável Não Ácido

LVT Lisboa e Vale do Tejo

LWL Linha Inferior de Aviso (Lower Warning Line)

m Declive da reta de calibração

MPCA Milk Plate Count Ágar

n Número de amostras analisadas

NAD Nicotinamida adenina dinucleotídeo

r Coeficiente de Correlação de Pearson

R-Chart Carta de Controlo relativa à amplitude

RCLAC 1 Reagente de Calibração 1

RCLAC 2 Reagente de Calibração 2

s<sup>2</sup> Variância (N≪50)

SM Material Padrão (Standart Material)

TV Valor obtido no teste (Test Value)

UAL Linha de Superior de Ação ( Upper Action Line)

UFC/ml Unidade de formação de colónias por mililitro

UHT Tratamento a temperatura extrema (Ultra high temperature)

UWL Linha Superior de Aviso (Upper Warning Line)

WL Warning Lines

X-Chart Carta de Controlo relativa à posição

# Conteúdo

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Lactogal Produtos Alimentares S.A.</i>	1
<b>2</b>	<b>Fundamentação</b>	<b>3</b>
2.1	<i>O Leite</i>	3
2.1.1	<i>Considerações sobre o leite</i>	5
2.1.2	<i>Componentes principais do leite</i>	7
2.1.2.1	<i>Água</i>	9
2.1.2.2	<i>Gorduras</i>	9
2.1.2.3	<i>Lactose</i>	9
2.1.2.4	<i>Proteínas</i>	10
2.1.2.5	<i>Sais minerais e elementos vestigiais</i>	13
2.1.2.6	<i>Vitaminas</i>	13
2.1.3	<i>Características Organopiléticas</i>	13
2.1.4	<i>Características físicas</i>	14
2.1.4.1	<i>Acidez</i>	14
2.1.4.2	<i>Densidade</i>	15
2.1.4.3	<i>Ponto crioscópico</i>	15
2.1.5	<i>Microrganismos que afetam a qualidade do leite</i>	15
2.1.5.1	<i>Origens da contaminação</i>	15
2.1.5.2	<i>Principais Bactérias</i>	16
	<i>Bactérias psicotróficas</i>	18
	<i>Bactérias mesófilas</i>	18
	<i>Bactérias termófilas</i>	19
2.1.6	<i>Fatores que afetam a qualidade do leite</i>	19
2.1.6.1	<i>Temperatura</i>	19
2.1.6.2	<i>Animal</i>	22
2.1.6.3	<i>Meio ambiente e equipamento</i>	22
2.2	<i>Controlo de Qualidade</i>	23
2.2.1	<i>Leite cru</i>	23

2.2.1.1	<i>Análises microbiológicas</i>	24
	<i>Contagem de microrganismos a 30 °C</i>	24
	<i>Citometria de fluxo (D-COUNT)</i>	24
2.2.1.2	<i>Análises físico-químicas</i>	28
	<i>Prova do álcool</i>	28
	<i>Método da redutase</i>	29
	<i>Teste da resazurina</i>	29
	<i>pH</i>	32
	<i>Acidez</i>	33
2.2.2	<i>Leites com baixas concentrações em lactose</i>	36
2.2.2.1	<i>Intolerância à Lactose</i>	36
2.2.2.2	<i>Biosensores</i>	38
2.3	<i>Controlo Estatístico</i>	43
2.3.1	<i>Formulação de Hipóteses</i>	43
	<i>Distribuições Estatísticas Contínuas</i>	44
	<i>Distribuição normal ou Gaussiana</i>	44
	<i>Distribuição t-Student</i>	45
	<i>Distribuição F</i>	46
	<i>Tipo de erros</i>	47
	<i>Intervalo de Confiança, Nível de Significância e Nível de Confiança</i>	47
	<i>Valor de Prova</i>	48
	<i>Simetria do Teste</i>	48
	<i>Procedimento Padrão</i>	48
2.3.2	<i>Teste de Grubbs</i>	49
2.3.3	<i>Teste t emparelhado</i>	50
2.3.4	<i>Teste de Mandel</i>	51
2.3.5	<i>Teste de Cochran</i>	52
2.3.6	<i>Análise de Variância de fator único</i>	52
2.3.7	<i>Correlação e regressão</i>	54
	2.3.7.1 <i>Coefficiente de Correlação de Pearson</i>	54
	2.3.7.2 <i>Regressão Linear</i>	55
	<i>Regressão linear multivariada</i>	56
2.3.8	<i>Cartas de Controle</i>	58
	<i>X-Chart</i>	58
	<i>R-Chart</i>	60

<b>3</b>	<b>Procedimentos e materiais</b>	<b>63</b>
3.1	<i>Leite cru</i>	63
3.1.1	<i>Contagem de microrganismos a 30 °C</i>	64
3.1.2	<i>D-COUNT</i>	65
3.1.3	<i>Prova do álcool</i>	66
3.1.4	<i>Teste da resazurina</i>	66
3.1.5	<i>Medição do pH do leite</i>	67
3.1.6	<i>Determinação da acidez do leite</i>	67
3.1.6.1	<i>Determinação da acidez através do método Dornic</i>	67
3.1.6.2	<i>Determinação da acidez pelo método potenciométrico</i>	68
3.2	<i>Biomilk</i>	70
3.2.1	<i>Análise de leites com concentrações reduzidas de lactose</i>	70
3.3	<i>Testes Estatísticos</i>	71
3.3.1	<i>Avaliação de valores discrepantes</i>	72
	<i>Teste de Grubbs</i>	72
	<i>Teste de Cochran</i>	72
	<i>Teste de Mandel</i>	72
3.3.2	<i>Comparação direta de resultados</i>	72
	<i>ANOVA</i>	72
	<i>Teste t emparelhado</i>	73
	<i>Regressão Linear</i>	73
	<i>Regressão Multivariada</i>	73
	<i>Cartas de controle</i>	73
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>75</b>
4.1	<i>Leite cru</i>	75
4.1.1	<i>Repetibilidade do Titrino Plus 877</i>	75
4.1.2	<i>Repetibilidade do eletrodo Testo</i>	76
4.1.3	<i>Comparação de métodos (Testo vs Titrino)</i>	77
4.1.4	<i>D-Count</i>	78
4.1.4.1	<i>Repetibilidade</i>	79
4.1.4.2	<i>Comparação métodos: Placas vs "D-Count"</i>	79
4.1.5	<i>Estimativa rápida do grau de contaminação</i>	83
4.1.5.1	<i>Resposta obtida com as placas</i>	85
4.1.5.2	<i>Resposta obtida com D-Count</i>	87
4.2	<i>Biomilk</i>	89
4.2.1	<i>Repetibilidade do Biomilk</i>	89
4.2.2	<i>Comparação de métodos: DSM vs Biomilk</i>	90

4.2.3	<i>Acompanhamento da produção de leites com concentração em lactose inferior a 100 mg/l . . . . .</i>	91
<b>5</b>	<b><i>Conclusões</i></b>	<b>95</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>97</b>
<b>I</b>	<b>Anexos</b>	<b>103</b>

# Capítulo 1

## *Introdução*

### **1.1 *Lactogal Produtos Alimentares S.A.***

Em 1996 a Cooperativa Lacticoop, a Cooperativa Agros e a Proleite/Mimosa S.A. aliaram-se para dar origem à Lactogal que é atualmente uma das maiores empresas agro-alimentares Portuguesas especializada em laticínios e seus derivados para além de outros produtos de fins alimentares como águas e sumos. Desta forma a Lactogal herdou todas as marcas que provinham das empresas que lhe deram origem, assim como todos os ativos industriais. O seu mercado de comercialização abrange o mercado nacional assim como o internacional e produz para as marcas Matinal, Mimosa, Adagio, Agros, Gresso, Castelinhos, Pleno, Primor, Castelões, Vigor, Milhafre dos Açores, Serra Dourada, Serra da Penha e Fresky.

O Grupo Lactogal é uma empresa Ibérica constituída pelas empresas Portuguesas Lactogal Produtos Alimentares, Laticínios Vigor e Etanor Penha e também pela empresa espanhola Leche Celta e possui unidades fabris situadas tanto em Portugal Continental e ilhas como em Espanha. Hoje em dia é uma das maiores empresas de produtos laticínios da Península Ibérica exportando para países como a China, Países Árabes, entre outros.

O Sistema de Qualidade da Lactogal é pioneira na implementação de métodos de análise de leite em Portugal, tendo nos seus laboratórios de Controle da Qualidade equipamentos que são únicos em Portugal. Podem-se referir os casos do D-Count (equipamento de citometria de fluxo) cuja aplicabilidade para a análise da qualidade microbiana do leite cru foi testada nos laboratórios da Lactogal da Tocha assim como o equipamento de quantificação da lactose Biomilk (biossensor).

1.1. LACTOGAL PRODUTOS ALIMENTARES SCAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

## Capítulo 2

# *Fundamentação*

Neste capítulo vamos abordar diversos aspectos teóricos sobre a matéria prima fundamental de toda a unidade de laticínios, o leite cru. Uma matéria prima de qualidade, para além de dar origem a produtos finais de boa qualidade, também interfere em toda a cadeia de produção dos mesmos. Matérias primas de baixa qualidade dão origem a problemas durante o processo de obtenção do produto final assim como na validade do mesmo, trazendo prejuízos para a empresa. As indústrias dos laticínios não são exceção.

A composição do leite, a sua carga microbiana e a sua estabilidade durante o aquecimento são alguns dos diversos fatores que se apresentam como fundamentais na hora da escolha de uma boa matéria prima. Um leite com baixa qualidade pode apresentar riscos de saúde para o consumidor como também poderá não possuir uma composição considerada como satisfatória a nível nutricional. A cadeia de produção de leite abrange um grande número de problemas que englobam tanto contaminações microbiológicas como contaminações químicas [1].

### **2.1 O Leite**

O leite é o primeiro alimento que um recém nascido recebe e deve fazer sempre parte do seu regime alimentar. Desde sempre que está associado a um bem estar físico e por esse motivo é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. O leite pode vir de várias espécies animais, mas o de vaca, de cabra e de ovelha são os mais utilizados na dieta alimentar. A composição de cada tipo de leite encontra-se indicada na tabela 2.1 na página seguinte.

Tabela 2.1: Composição média (%) do leite proveniente de diferentes espécies animais [2].

<b>Substância</b>	<b>Teor (%)</b>			
	<b>Humano</b>	<b>Vaca</b>	<b>Ovelha</b>	<b>Cabra</b>
<b>Água</b>	87.8	87.3	81.0	86.8
<b>Lactose</b>	7.0	4.8	4.5	4.7
<b>Gordura</b>	3.8	3.7	7.9	4.1
<b>Proteína</b>	1.2	3.5	5.8	3.6
<b>Fração Mineral</b>	0.2	0.7	0.8	0.8

Analisando a tabela verifica-se que os constituintes principais do leite são água, lactose, gordura, proteína e cinzas (nas quais se inclui sais minerais, vitaminas, enzimas e pigmentos). A composição do leite humano é distinta da dos outros leites, pois possui uma quantidade de lactose superior e menor quantidade de proteína. Este valor elevado de lactose atribui-lhe um sabor adocicado único.

É um alimento de elevado valor nutritivo que garante, qualitativa e quantitativamente, necessidades nutricionais específicas que permitem um crescimento/desenvolvimento equilibrado. Sendo o alimento que maior percentagem de cálcio apresenta, e sendo este fundamental no processo de crescimento, nunca deve ser negligenciado. É de salientar que a quantidade de determinado componente não é essencial em todos os aspetos, uma vez que os componentes minoritários como as vitaminas, enzimas, e outros componentes com concentrações vestigiais são de imensa importância para a composição e, conseqüentemente, qualidade do leite. Para além da sua elevada riqueza em cálcio também possui uma elevada percentagem de proteína, sendo por isso o seu consumo tão benéfico como o consumo de carne, peixe e ovos.

Sendo o leite um produto frágil, altera-se com extrema facilidade, por esse motivo é de enorme importância a sua conservação longe de focos de contaminação durante todos os pontos da cadeia de fornecimento do leite desde que é extraído do animal até chegar à unidade de processamento do leite [1]. Na figura 2.1.1 estão exemplificados alguns pontos de controlo que podem ser cruciais para a identificação de focos de contaminação. Assim sendo, uma análise efetuada no ponto 1 (local de produção) permite a deteção de uma possível infeção do úbere da vaca. Ao efetuar uma análise no ponto crítico 2 ao leite extraído de cada animal, possibilita a identificação de leite contaminado de uma vaca específica que depois, se não for identificado à priori, vai contaminar todo o conjunto recolhido na produção leiteira. O tanque de armazenamento do leite na produção agrícola é considerado como um ponto também importante durante o processo de transferência do leite e permite a deteção de falhas, tanto de higiene como de equipamento, durante a transferência do leite desde a vaca até ao tanque e por isso é considerado como o ponto de análise 3. Para além disso os tanques de armazenamento existentes nas produções

podem conter leite extraído do animal naquele dia, se a unidade de produção do leite for relativamente grande, ou então ser a mistura de leites de vários dias, e ao ser analisado o seu conteúdo tem-se logo uma ideia do tempo de armazenamento do leite assim como da sua carga microbiana. Por fim, a análise efetuada ao tanque do camião que faz a transfeza do leite é também considerada como uma análise essencial pois é esta última que é utilizada como barreira para a identificação de leites de má qualidade [1].

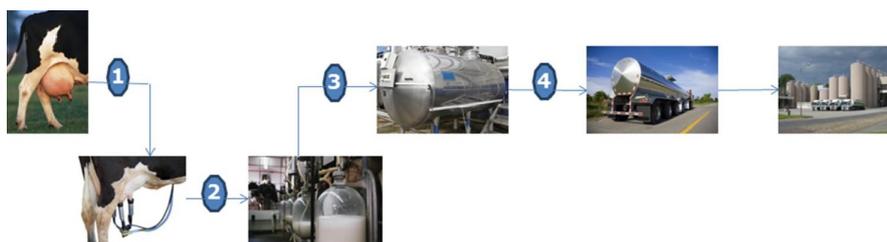


Figura 2.1.1: Pontos específicos para a recolha de amostras ao longo da cadeia de produção do leite (1)- Extração do leite a partir do úbere; (2)- Recolha do leite para reservatórios individuais (3)- Reservatório de armazenamento do leite (4)- Camião tanque de transporte de leite [1].

### 2.1.1 Considerações sobre o leite

De acordo a norma NP 472 [3], leite alimentar é todo o leite cru destinado ao consumo humano de forma direta ou indireta e que for produzido por animais saudáveis, bem alimentados, não fatigados, mantidos em bom estado de higiene e que satisfaçam os seguintes requisitos:

- a) ser produto integral da ordenha completa e ininterrupta;
- b) não conter colostro, pelo que o produto da ordenha obtida nos cinco dias seguintes ao parto não será considerado leite;
- c) ser isento de coloração, cheiro e sabor anormais;
- d) ser colhido, conservado e transportado de acordo com as normas em vigor;
- e) não conter microrganismos patogénicos, pus, sangue nem substâncias estranhas à sua constituição ou composição química original.

Para além destas exigências, a NP 472, também elucida que a designação genérica de leite é apenas aplicada a leite de vaca, sendo os outros tipos de leite designados pelo nome da fêmea reprodutora.

O leite é o produto secretado pelas glândulas mamárias e é o alimento indispensável aos mamíferos no início da sua vida, pois é o único sustento que o organismo tem a capacidade de assimilar em tão tenra idade [4]. O leite recém ordenhado não é todo igual, depende de vários fatores como fatores genéticos, fatores fisiológicos, fatores patológicos, fatores ambientais e de manuseamento.

O leite é dos alimentos mais completos que existe para o ser humano, para

além de ser de fácil digestão. Como não existiam espécies autóctones de Portugal específicas para a produção de leite, começou-se a importar, no século XVII, vacas da raça “frísia” da Holanda. Com o passar dos anos, estes animais foram-se adaptando ao clima e alimentação portuguesa, dando origem a uma sub-raça, essa sim portuguesa, denominada de “turinas”. No entanto as vacas turinas apresentam menor corpulência e menor produtividade do que as raça de que são provenientes. Todavia, nos Açores, a raça “frísia” adaptou-se melhor, devido ao fato das condições climáticas deste arquipélago darem origem a grandes pastos verdes, possibilitando assim a que elas tenham uma alimentação mais semelhante à que tinham na Holanda, por esse motivo, os bovinos açorianos têm rendimentos muito semelhantes às da raça originária [5].

As vacas turinas são, hoje em dia, criadas por todo o país e são responsáveis pela produção quase total do leite existente em Portugal. As vacas das raças portuguesas arouquesa, marinhoa, jarmelista e barrosã apenas contribuem com uma pequena parcela que sobra da amamentação das suas crias, mas esse leite é mais gordo e de maior rendimento no fabrico de manteigas [5].

Tem-se verificado nos últimos anos a diminuição do número de produtores de leite, mas constata-se também que essa diminuição não leva a um decréscimo na produção leiteira. As explorações, ao tornarem-se cada vez maiores, são capazes de acolher um número superior de bovinos leiteiros, o que dá origem a uma maior capacidade de produção. No final de 2007 verificava-se a existência de 8723 produtores de leite no continente, estando 55% destes sediados no Norte do país, 24% na zona Centro, enquanto que 15% encontravam-se no Alentejo e 6% na zona de Lisboa e Vale do Tejo (LVT). A zona do Algarve não apresentava nenhum produtor de leite até à data da realização do estudo representado pelo gráfico da figura 2.1.2 na próxima página [6].

A qualidade do leite utilizado na obtenção de todos os derivados laticínios ocupa um papel determinante na produção. A pasteurização efetuada ao leite não elimina a preocupação que se tem de ter com a qualidade do leite cru que chega às indústrias.

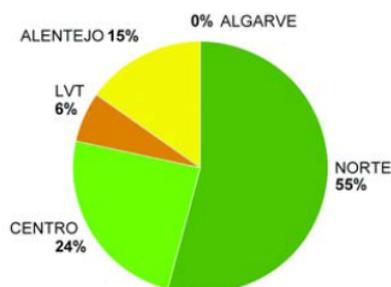


Figura 2.1.2: Variação de produção leiteira em 2007 por região. Na região Norte incluem-se os distritos de Viana do Castelo, Braga, Porto, Vila Real, Bragança e os extremos Norte dos distritos de Aveiro, Viseu e Guarda e é nestas zonas onde a produção de leite apresenta uma maior percentagem, mais de metade, visto esta ser a zona onde as condições climáticas são mais adequadas para a obtenção de pastos verdes. A região Centro está delimitada a norte pelo distrito do Porto, zona do Tâmega e Douro e a sul pela Lezíria do Tejo e a zona do Alto Alentejo e é nela onde se produz cerca de um quarto da quantidade de leite obtido nas explorações agrícolas. As siglas LVT são representativas da região de Lisboa e Vale do Tejo que inclui o distrito de Lisboa na totalidade, a maior parte do distrito de Santarém, cerca de metade do distrito de Setúbal e um terço do de Leiria. Os distritos de Portalegre, Évora e Beja estão na íntegra contidos na região do Alentejo assim como metade de Setúbal e parte de Santarém, sendo esta a maior região do país. O Algarve é representado na totalidade pelo distrito de Faro e verifica-se que nesta região não existe nenhum produtor de leite possivelmente devido ao fato das condições climáticas (zonas secas e áridas) não serem as mais adequadas para a produção de alimento para os animais [6].

### 2.1.2 Componentes principais do leite

O leite é então o produto das glândulas mamárias, as quais entram em funcionamento com o parto. Um pouco antes deste ocorrer, aparece uma secreção denominada de colostro que se mantém ainda uns dias após o parto. Este líquido viscoso, de cor acastanhada, cheiro característico e sabor mais salgado, que é imensamente importante para a cria nos primeiros dias de vida mas não serve para a alimentação humana, possui uma composição muito diferente do leite. O colostro possui uma grande quantidade de proteínas do soro, principalmente imonoglobulinas do tipo IgG<sup>1</sup>, que constituem cerca de 7% do colostro inicial e que são de extrema importância para aumentar a proteção imunológica do recém nascido. Para além de elevados teores de catalases<sup>2</sup>, o colostro também possui elevadas quantidades de células somáticas, cobre e ferro [9]. A composição do colostro vai variando ao longo do tempo, como demonstra a figura 2.1.3 na página seguinte:

<sup>1</sup>Imonoglobulinas são glicoproteínas, também conhecidas por anticorpos, sintetizadas por células em resposta à presença de uma substância estranha conhecida por antígeno [7].

<sup>2</sup>Catalases são enzimas intra celulares muito comuns que possuem a capacidade de decompor o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água. Pertencem à família das oxidoreductases [8].

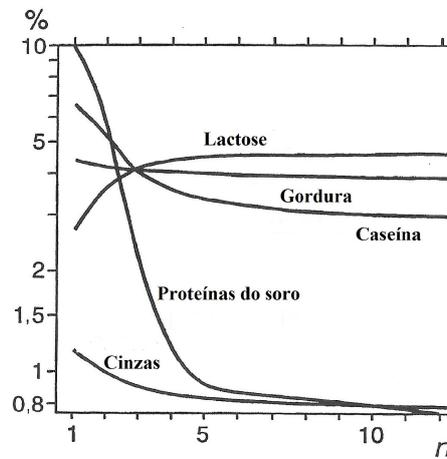


Figura 2.1.3: Exemplo da composição do colostro (% m/m)  $n$  dias após o parto [2, 4, 9].

Com o passar dos dias seguintes ao parto, o bovino leiteiro começa a produzir leite com composição normal que já se pode misturar com leites provenientes de outros bovinos que irá servir para consumo [2].

O leite destinado para consumo humano é uma mistura coloidal de glóbulos brancos, estabilizada por substâncias albuminóides num soro que contém uma solução contendo lactose, proteínas, sais minerais e orgânicos e outras substâncias em quantidades vestigiais como a lecitina, ureia, aminoácidos, ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, álcool, vitaminas, enzimas, entre outros [4].

Os valores que se apresentam na figura 2.1.4 foram obtidos a partir de estudos realizados em Portugal com gado bovino da espécie proveniente da Holanda (turinas) [5]. É importante referir que os dados indicados dizem respeito a valores médios, uma vez que a composição do leite é influenciada por diversos fatores como o clima, alimentação, estado de saúde, entre outros.

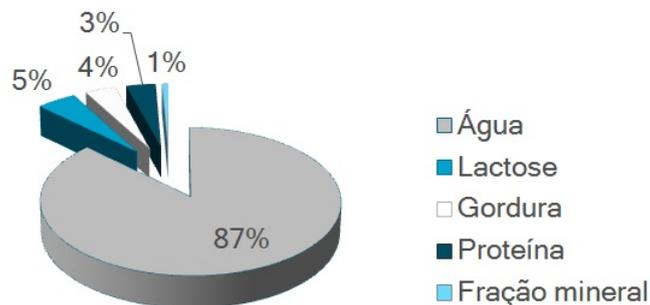


Figura 2.1.4: Composição média do leite bovino.

### 2.1.2.1 Água

A água é o composto que entra em maior percentagem na constituição do leite e é nela que se encontram dissolvidos a lactose, os sais, os gases e as vitaminas, emulsionadas as gorduras e em suspensão coloidal os constituintes azotados. Consoante a quantidade de água existente no leite, este vai apresentar diferentes valores de densidade.

### 2.1.2.2 Gorduras

A matéria gorda é constituída principalmente por uma mistura de triglicerídeos (ésteres de ácidos gordos e glicerol) diferentes, cerca de 98%, colesterol, diglicérides, monoglicérides, esteroides, carotenóides (que fornecem a cor amarelada ao leite), vitaminas (A, D, E e K), entre outros componentes vestigiais como os fosfolípidos, lipoproteínas, glicéridos, cerebrosídeos, ácidos nucleicos, entre outros [2]. Apresentam-se sob a forma de uma emulsão de glóbulos gordos e a sua quantidade depende da espécie e da condição física e alimentar do bovino leiteiro que produz o leite. Estes glóbulos estão protegidos por membranas de forma a evitar ataques enzimáticos e cada glóbulo possui um núcleo composto por triglicerídeos [10].

### 2.1.2.3 Lactose

A lactose, figura 2.1.5, é o açúcar principal do leite e é o maior constituinte sólido do mesmo. É um dissacarídeo formado pela união, através de uma ligação glicosídica  $\beta$ -1,4, entre uma molécula de galactose e uma molécula de glicose. Tem por função principal fornecer energia para o trabalho orgânico [7, 8, 5].

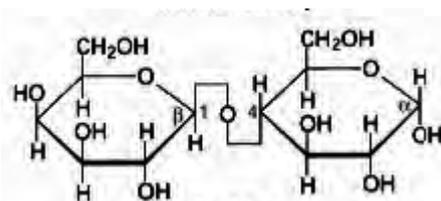


Figura 2.1.5: Representação da fórmula estrutural da lactose em projeção de Fisher ( $\beta$ -D-Galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glicopiranoze) [7].

A sua concentração varia entre os 4,2% e os 5% em animais saudáveis. A concentração da lactose do leite é um parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a qualidade do leite, assim como para a deteção de anormalidades. Se um determinado leite apresentar valores baixos de lactose pode significar que o animal donde provem o leite apresenta problemas de saúde como mastites ou então poderá ser um leite do fim do período de lactação [11, 12].

A lactose é a principal fonte de energia para as bactérias existentes no leite. Estas, através da enzima lactase (E.C. 3.2.1.108), conseguem hidrolisar a lactose em galactose e glucose como se pode verificar através da figura 2.1.6 [9].

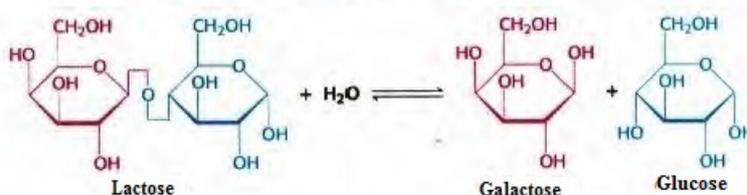


Figura 2.1.6: Hidrólise da lactose em galactose e glucose [7].

Posteriormente, estas moléculas transformam-se, parcialmente no caso da galactose, em ácido láctico, equação 2.1.1<sup>3</sup> através de bactérias homofermentativas<sup>4</sup> ou de bactérias heterofermentativas<sup>5</sup> [9].



Da atividade das bactérias resulta cerca de 1% a 2 % do ácido láctico existente no leite. O aparecimento deste ácido na composição do leite é de extrema importância pois vai funcionar como um inibidor eficaz para o desenvolvimento de outras bactérias. O pKa deste ácido é aproximadamente de 3.95, o que implica que a inibição dessas bactérias seja maior a valores de pH menores. Praticamente nenhuma bactéria é capaz de se desenvolver quando o pH do leite atinge valores inferiores a 4.5 devido à formação do ácido láctico. No entanto a estes valores de pH é possível o desenvolvimento de algumas leveduras e fungos [9].

#### 2.1.2.4 Proteínas

As proteínas são macro moléculas biológicas constituídas por ligações covalentes entre resíduos de aminoácidos. O primeiro aminoácido a ser descoberto foi a asparagina (Asn) em 1806 e a treonina (Thr) foi o vigésimo e último em 1938. Todos os vinte aminoácidos possuem um grupo carboxílico e um grupo amino ligado ao mesmo átomo de carbono, estando a sua estrutura geral indicada na figura 2.1.7 na próxima página. Os vinte aminoácidos existentes estão agrupados na tabela 2.2 e encontram-se agrupados de acordo com as propriedades físico-químicas do grupo R.

<sup>3</sup>Pi- Esta designação refere-se ao fósforo inorgânico (fosfato).

<sup>4</sup>Bactérias homofermentativas são aquelas que produzem apenas ácido láctico a partir da glucose.

<sup>5</sup>Bactérias heterofermentativas são aquelas que para além de ácido láctico, produzem também dióxido de carbono, ácido acético e etanol.

A existência destes vinte aminoácidos permite um grande número de combinações diferentes e, conseqüentemente a formação de diversas proteínas que variam em tamanho e em tipo, o que dá origem a uma enorme variedade de funções biológicas distintas [7, 8].

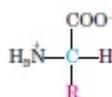


Figura 2.1.7: Estrutura geral de um aminoácido. O grupo R ligado ao carbono central é diferente em cada aminoácido [8].

Tabela 2.2: Aminoácidos comuns nas proteínas agrupados de acordo com a sua classe [8].

<b>Apolares Alifáticos</b>	<b>Apolares Aromáticos</b>	<b>Polares</b>		
		<b>neutros</b>	<b>básicos</b>	<b>ácidos</b>
Alanina (Ala)	Fenilalanina (Phe)	Serina (Ser)	Lisina (Lys)	Aspartato (Asp)
Leucina (Leu)	Triptofano (Trp)	Treonina (Thr)	Arginina (Arg)	Glutamato (Glu)
Valina (Val)	Tirosina (Tyr)	Cisteína (Cys)	Histidina (His)	
Isoleucina (Ile)		Asparagina (Asn)		
Prolina (Pro)		Glutamina (Gln)		
Metionina (met)				
Glicina (Gly)				

Tendo em conta que o leite é o primeiro alimento de um mamífero, as proteínas lácteas terão de ser as mais completas para poderem fornecer os elementos indispensáveis nesta primeira fase da vida que é tão influente durante todas as seguintes etapas do seu desenvolvimento [5, 13].

As proteínas do leite classificam-se em caseínas (80%), proteínas do soro (19%) e também enzimas (1%) [7, 14]. A caseína é uma fosfoproteína, de elevado peso molecular e é específica da constituição do leite dando origem a uma solução coloidal cuja concentração varia pouco durante as fases de aleitamento, mas pode apresentar variações consideráveis de espécie para espécie [11]. São moléculas com características anfífilas<sup>6</sup> e que são de fácil fosforilação<sup>7</sup> entre elas, assim como com moléculas de fosfato de cálcio amorfo<sup>8</sup> dando origem a complexos esféricos hidratados denominados de micelas. Nas micelas, a pH compreendido entre 6 e 7, a caseína está na forma de sais de caseinato, pois como o caseinato apresenta carga global negativa (devido à ionização de grupos funcionais do tipo carboxilato)

<sup>6</sup> Moléculas anfífilas são moléculas que apresentam uma parte polar e outra parte apolar.

<sup>7</sup> Fosforilação consiste na reação de ativação de uma molécula por adição de um grupo fosfato, promovida por uma enzima (fosfatase).

<sup>8</sup> Substância amorfa não possui uma rede estrutural bem definida caracterizada pela presença de uma célula unitária cuja estrutura se repete indefinidamente no espaço.

encontra-se geralmente associada a di-catiões como por exemplo iões de cálcio e de magnésio.

O sais restantes de caseínas estão na forma de fosfato cálcico e também, mas em menor quantidade, na forma de caseína-citrato de cálcio. Na realidade esta denominação de micelas não se encontra correta do ponto de vista da química coloidal, pois estas micelas são apenas partículas pequenas devendo-se denominar este conjunto por complexo caseinato-cálcico/fosfato-cálcico. No entanto, a denominação de micela é usada amplamente e por esse motivo vai-se continuar a usar neste trabalho.

As micelas podem apresentar diversos tamanhos e acredita-se que todos os seus constituintes (caseína, sais de fósforo e cálcio na sua maioria, e outros componentes vestigiais como lipasa e proteinasa) se encontram em equilíbrio com a fase aquosa, numa estrutura aberta que, conseqüentemente possuem no seu interior grandes quantidades de água, cerca de 1.5 gramas de água por grama de proteína. A sua densidade é de 1.486 a 15 °C, é insolúvel a valores de pH compreendidos entre 4 e 5, e, em média, constitui 3% do leite. Esta proteína obtém-se pela precipitação natural (fermentação) ou então pela adição de coalhos e ácidos e utiliza-se na produção de queijos [4, 10].

As proteínas do soro, denominadas também por seroproteínas são a lactoalbumina e a lactoglobulina e encontram-se no leite principalmente na sua forma molecular ou então na forma de pequenos agregados e possuem a capacidade de se ligar a contrações na presença de baixas quantidades de água [9]. Estas proteínas possuem uma estrutura intramolecular regida pelo enovelamento de proteínas, mais conhecido por *foldings*<sup>9</sup>, que dá origem à formação de ligações dissulfeto<sup>10</sup> entre resíduos de cisteína que permitem a inclusão da maior parte dos resíduos hidrofóbicos no interior da molécula, desta forma este tipo de proteínas não dá origem a agregados complexos nem interage com outras proteínas no estado nativo. A lactoalbumina possui uma estrutura primária, altamente compactada e possui uma forma esférica [11]. É completamente solúvel em água, e só precipita pela adição de ácidos e pelo aumento de temperatura. Esta proteína encontra-se na película que se forma no leite quando este é cozido ou na espuma quando se procede ao à fervura do leite [4]. A lactoglobulina por sua vez é a seroproteína que se encontra em maior quantidade no leite e possui menor estabilidade térmica do que a lactoalbumina [11].

As enzimas do leite são proteínas de peso molecular elevado e que provém do sangue e das células secretoras da mama, mas também podem ser sintetizadas durante o metabolismo de alguns microrganismos. As principais enzimas do leite são a peroxidase, a catalase e a fosfatase. No que diz respeito ao seu peso em relação

<sup>9</sup>O *foldings* é a capacidade que as proteínas possuem de se enovelar espontaneamente formando uma estrutura tridimensional que é responsável pelo papel fundamental das proteínas na Bioquímica [7].

<sup>10</sup>Na nomenclatura mais antiga é conhecida por ligações dissulfureto.

às outras proteínas são desprezáveis, mas no que diz respeito à sua funcionalidade, são de extrema importância.

#### 2.1.2.5 *Sais minerais e elementos vestigiais*

Os sais minerais existentes na constituição do leite são os sais de cálcio, de fósforo, de ferro, de magnésio, de sódio, de potássio e de cobre, embora os dois primeiros sejam os mais importantes. Os sais de cálcio e fósforo são muito importantes na formação de toda a estrutura óssea, assim como dos dentes, para além disso também facilitam a coagulação do sangue, desempenhando assim um papel importante na dieta diária. Os sais de cálcio estão também envolvidos na contração muscular, na estabilização e ativação de diversas enzimas e de neurotransmissores. Estes sais são de fácil absorção pelo organismo através da vitamina D [5].

#### 2.1.2.6 *Vitaminas*

As vitaminas são elementos de importância extrema no desenvolvimento do corpo assim como para a conservação da saúde, sendo que a sua carência está relacionada com algumas doenças, como se pode verificar pela análise da tabela (2.3) e da tabela 2.4. As vitaminas mais comuns existentes no leite são a A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, D e PP [2, 5].

Tabela 2.3: Necessidades diárias em vitaminas para um adulto (mg) [2, 5].

<b><i>Vitaminas</i></b>	<b><i>Necessidade diária de um adulto (mg)</i></b>
<b><i>A</i></b>	1 - 2
<b><i>B<sub>1</sub></i></b>	1 - 2
<b><i>B<sub>2</sub></i></b>	2 - 4
<b><i>C</i></b>	30 - 100
<b><i>D</i></b>	0.01

Tabela 2.4: Doenças resultantes da carência em vitaminas [2].

<b><i>Vitaminas</i></b>	<b><i>Doenças associadas à sua carência</i></b>
<b><i>A</i></b>	Cegueira noturna e sistema imunitário deficiente
<b><i>B<sub>1</sub></i></b>	Crescimento mais lento
<b><i>B<sub>2</sub></i></b>	Perda de apetite
<b><i>C</i></b>	Fatiga, Diarreia, Escorbuto
<b><i>D</i></b>	Raquitismo

#### 2.1.3 *Características Organopiléticas*

Sendo o leite um produto bioquimicamente instável, altera-se com extrema facilidade, e por esse motivo é necessário protegê-lo contra possíveis contaminações, as

quais iriam reduzir o seu valor como produto de alto conteúdo nutritivo e protetor.

De acordo com a NP 467 de 1979 [15] que legisla os exames preliminares de análise que se devem efetuar ao leite cru, este deve ser inspecionado de forma a se verificar as suas características organolépticas como o aspeto, cor, aroma e sabor. Observa-se se o leite é normal, coalhado, viscoso, filamentososo ou se apresenta substâncias que se destacam do líquido homogéneo, abstraindo-se da nata ou de alguns olhos de gordura nas camadas superficiais do leite. No que diz respeito à cor este poderá apresentar cor branca, amarelada ou apresentar coloração anormal. O aroma poderá ser incomum ou anormal e o seu sabor poderá ser fora do normal, mais ou menos acentuado e anormal (sabores estranhos similares a um adocicado extremo, a nabo, a peixe, a podre, amargo, a sal). Através desta análise rápida é possível ter de imediato uma noção da qualidade higiénica do leite. De acordo com esta norma também deverá ser efetuada um ensaio prévio da acidez que consiste em mergulhar no leite uma tira azul e uma tira vermelha de papel de tornesol e verificar a alteração nas cores das respetivas tiras e compará-las com as cores padrões. Nunca se deve observar reação neutra e muito menos alcalina.

#### 2.1.4 *Características físicas*

O leite é maioritariamente constituído por água, e é nela que se encontram dissolvidos, emulsionados ou suspensos todos os restantes constituintes. Por ser uma solução aquosa comporta-se como um líquido nas condições de temperatura e pressão padrão (25 °C e 1 atm) e por isso é um bom solvente para moléculas polares e possui também uma elevada constante dielétrica.

##### 2.1.4.1 *Acidez*

A acidez do leite define-se como sendo a grandeza que quantifica a quantidade de ácidos orgânicos existentes num determinado volume de leite. Quando o leite é ordenhado possui caráter ligeiramente ácido proveniente de componentes como a albumina, citratos, dióxido de carbono, caseínas e fosfatos, estando o seu pH entre os valores 6.6 e 6.8. A acidez provocada pela existência dos compostos referidos é considerada como sendo a acidez natural do leite.

Todavia, quando a colheita do leite não se realiza sob as melhores formas, apresentando lacunas em alguns fatores como nas condições higiénicas, na falta de refrigeração, nas más condições de saúde do animal, entre outras, o leite apresenta uma maior percentagem de ácidos orgânicos, principalmente do ácido láctico, que é produzido por microrganismos fermentadores da lactose (acidez adquirida).

Ao conjunto formado pela acidez natural e pela acidez adquirida dá-se o nome de acidez real que pode ser expressa em diferentes unidades. A acidez real do leite depende de vários fatores como a genética dos próprios animais, a sanidade da

glândula mamária, o tipo de alimentação, o estado físico do animal, o momento da ordenha e a diluição do leite [9, 16].

#### 2.1.4.2 *Densidade*

A densidade do leite depende essencialmente da concentração dos elementos que se encontram dispersos na solução assim como em suspensão e também da percentagem de gordura existente no mesmo. O leite considerado como apto costuma possuir um valor de densidade que oscila entre os 1.023 e os 1.040 g/cm<sup>3</sup>, medidos a 15 °C. Valores fora deste intervalo podem indicar a adulteração do leite através da adição de água (produzindo uma diminuição da densidade) ou então através da retirada de gordura ou adição de outros constituintes como sal, açúcar ou amido (levando a um aumento da densidade) [9, 13, 16].

#### 2.1.4.3 *Ponto crioscópico*

O ponto crioscópico indica a temperatura à qual o leite passa para o estado sólido. Para um leite com valores normais de lactose e cloretos (4.75% e 0.1%, respetivamente) o valor do ponto crioscópico é de - 0.531°C. Um aumento do ponto crioscópico pode indicar a alteração da composição do leite, assim, se o for adicionado ao leite água verifica-se o aumento da temperatura de congelamento do leite, aproximando-se do ponto de congelamento da água (0 °C) [13, 16].

### 2.1.5 *Microrganismos que afetam a qualidade do leite*

Desde o momento da produção do leite, este está exposto a um grande número de microrganismos. A quantidade e tipo de microrganismos está relacionado com as práticas de higiene e saúde de toda a cadeia de transporte do leite, desde a produção até chegar à unidade de produção, como já foi referido em 2.1 na página 3. Os contaminantes biológicos encontrados no leite são essencialmente bactérias, fungos e vírus, sendo que alguns deles são patogénicos para o Homem enquanto que outros, os saprófitas, são os responsáveis pela deterioração do leite [16].

#### 2.1.5.1 *Origens da contaminação*

O leite, ao ser produzido e secretado dos alvéolos da glândula mamária de uma vaca em perfeitas condições de saúde a 37 °C, possui uma carga microbiana baixa, cerca de 300 a 1500 bactérias por mililitro, sendo esta predominantemente constituída por bactérias do tipo Gram Positivas como as *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*, além de conter também *Lactobacilos Saprófitas* do úbere e canais galactóforos [16, 17]. Mas ao ser retirado, manuseado e armazenado pode ser contaminado com microrganismos provenientes do interior da glândula mamária, da

superfície das tetas e do úbere, dos equipamentos de ordenha assim como de todos os utensílios existentes nas proximidades. Para além das fontes de contaminação instantâneas que podem ocorrer, verifica-se também que o tempo e a maneira como o leite está armazenado é fundamental para a não proliferação da população bacteriana, que em pouco tempo pode levar à deterioração do leite. Como não é possível eliminar as fontes de contaminação do leite que provém da anatomia do próprio animal, devemos por isso diminuir ao máximo as outras que são posteriores [4].

Em Portugal, sensivelmente até à década 80, as entregas do leite cru eram efetuadas duas vezes por dia, uma de manhã e outra ao final da tarde, na unidade de processamento do leite, garantindo por isso sempre a frescura do leite. Mas a necessidade de expansão das unidades fabris provocou a redução do número de indústrias e aumentou a distância entre estas e as vacarias. Consequentemente o tempo entre as entregas do leite também sofreu um aumento significativo, tendo o leite que permanecer mais tempo nas vacarias e durante esse tempo o leite tem de ser mantido nas melhores condições de temperatura e higiene [2]. Desta forma o leite deve ser mantido num sistema fechado, devidamente limpo e desinfetado, de modo a que não exista a possibilidade de contaminação por parte de microrganismos exteriores. Para além disso, ele também deve ser arrefecido rapidamente a temperaturas que rondam os 4 °C e mantido assim até se realizar a transfeção do leite para os camiões de recolha. Analisando a figura 2.1.8, verifica-se que os problemas de qualidade começam quando os tempos de recolha do leite começam a aumentar. Este problema resolve-se se as entregas de leite às indústrias se verificar com intervalos mais curtos de tempo, de modo a evitar que o leite cru permaneça nos tanques de armazenamento das vacarias por mais do que dois dias. Se tal não for possível, recomenda-se que este fique armazenado a temperaturas entre os 2 °C e os 3 °C [2].

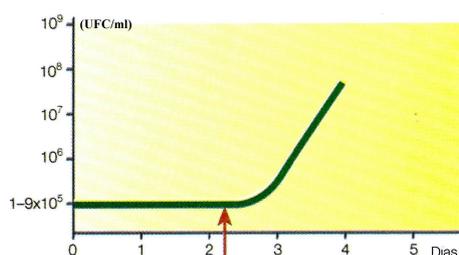


Figura 2.1.8: Crescimento bacteriano do leite cru mantido a uma temperatura de + 4 °C expresso em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/ml) [2].

### 2.1.5.2 Principais Bactérias

As bactérias multiplicam-se através da divisão das suas células, desta forma cada divisão celular origina 2 células novas, sendo o seu crescimento descrito por uma

progressão geométrica de termo geral  $2^n$ , em que  $n$  são o número de divisões efetuadas pelas células [9]. O tempo de multiplicação das bactérias depende de dois fatores fundamentais, o tipo de bactérias e a temperatura a que se encontram. Também importantes são os valores de pH do meio, a quantidade de oxigênio, as quantidades de inibidores e nutrientes existentes no próprio leite, assim como luz, pressão osmótica média e a presença de outros microrganismos [16].

Na figura 2.1.9 encontra-se a função logaritmo da carga microbiana em função do tempo e verifica-se claramente a formação das quatro fases: a fase de latência, fase de crescimento, fase estacionária e a fase de redução.



Figura 2.1.9: Gráfico de crescimento bacteriano onde se pode visualizar claramente 4 fases distintas. Na fase de latência não se verifica o aumento do número de bactérias, pois estas ainda se encontram em fase de adaptação às condições do meio. Mal termina esta adaptação verifica-se o início da fase de crescimento, na qual o aumento da população é bastante visível. Durante a fase estacionária, o número de bactérias mantém-se sensivelmente estável, pois o balanço entre a formação e morte de indivíduos é praticamente nulo. Durante a fase de redução verifica-se a diminuição da população microbiana, pois verifica-se um decréscimo do fenómeno da multiplicação celular e um aumento da morte celular [9].

Durante a fase de latência, não se verifica o aumento do número de bactérias devido ao fato do sistema enzimático destas estar ainda a adaptar-se às condições existentes, para só depois começar a sua propagação. A duração desta fase depende essencialmente do estado fisiológico das bactérias, da temperatura a que se encontra o leite e das características do meio de cultura, sendo por isso muito importante tentar controlar ao máximo os fatores referidos de modo a que esta fase possua a maior duração possível para que o leite chegue à unidade fabril antes de possuir cargas microbianas elevadas. Durante a fase exponencial o crescimento verifica-se a toda a velocidade até atingir uma fase estacionária que é constituída por um misto de crescimento e de morte celular. O decréscimo da velocidade de crescimento é devida à presença de inibidores, produzidos pelas próprias bactérias e/ou à diminuição da quantidade de nutrientes disponível para estas. De seguida verifica-se a diminuição do número de bactérias, pois a multiplicação celular começa a ser em menor número que a morte celular [9].

Um dos fatores de extrema importância para o desenvolvimento das bactérias é a temperatura do meio onde estas se encontram e é esse o motivo pelo qual elas se

encontram classificadas de acordo com a temperatura favorável ao seu desenvolvimento ótimo, como se poder verificar através da análise da tabela 2.5. Assim sendo elas podem ser classificadas em psicotróficas, mesófilas ou termófilas.

Tabela 2.5: Condições térmicas de desenvolvimento de colônias de bactérias de acordo com a sua designação [16].

<b>Classe de microrganismos</b>	<b>Temperatura(°C)</b>		
	<b>Mínima</b>	<b>Ótima</b>	<b>Máxima</b>
<b>Bactérias Psicotróficas</b>	0	10 - 15	30
<b>Bactérias Mesófilas</b>	15 - 25	25 - 37	40 - 45
<b>Bactérias Termófilas</b>	25 - 45	50 - 60	60 - 90

**Bactérias psicotróficas** Este tipo de bactérias desenvolve-se em temperaturas compreendidas entre os 2 e os 10 °C e provocam a degradação das proteínas e da gordura do leite, alterando o sabor e o odor do mesmo, assim como também o seu rendimento na produção de queijos. As bactérias do género *Pseudomonas* são frequentemente encontradas em leite cru mantido a temperaturas entre os 0 °C e os 4.4 °C por longos períodos de tempo, pois são as que apresentam melhor capacidade de crescimento em ambientes refrigerados [16]. Para além de possuírem baixos valores de temperaturas ótimas de desenvolvimento possuem também uma fase de latência que pode variar entre as 48 e as 78 horas, mas que posterior a esta se desenvolvem muito rapidamente. As bactérias do tipo *Pseudomonas* são encontradas com maior frequência no leite cru do que os outros tipos de bactérias Gram negativas, pois apresentam melhor capacidade de crescimento em ambientes refrigerados do que os outros géneros de bactérias psicotróficas Gram negativas [18].

As bactérias psicotróficas começam a ser tidas como uma grande ameaça à indústria dos lacticínios pois elas produzem lipases e proteases extra celulares resistentes ao calor que têm a capacidade de deteriorar o leite e consequentemente reduzir o tempo de vida do leite UHT nas prateleiras [18].

**Bactérias mesófilas** As bactérias mesófilas constituem um grupo de extrema importância na qualidade do leite, pois é nele onde estão inseridos a maior parte dos microrganismos acidificantes assim como a maioria dos contaminantes do leite, tanto deterioradores, como patogénicos. Este tipo de bactérias multiplicam-se numa faixa de temperaturas entre os 15 e os 45 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento de 32 °C [17]. Entre as bactérias mesófilas mais importantes estão os *Lactobacilos*, *Streptococos*, *Lactococos* e *Coliformes* que se multiplicam rapidamente quando o leite não é mantido sob refrigeração [9, 16].

Estas bactérias são originárias do solo, dos estábulos, das forragens e da água e originam no leite um sabor desagradável e acidificando-o [16].

**Bactérias termófilas** As bactérias termófilas são aquelas cuja temperatura ótima de crescimento está compreendida entre os 50 °C e os 60 °C. O leite cru possui poucas destas bactérias, mas em número suficiente para trazer problemas à qualidade do leite, caso este for mantido a temperaturas elevadas. Estas bactérias têm a característica de conseguirem resistir à pasteurização, provocando a diminuição do tempo de conservação de leite UHT [16].

## 2.1.6 Fatores que afetam a qualidade do leite

### 2.1.6.1 Temperatura

Como já foi referido a temperatura é o fator fundamental de todo o crescimento bacteriano. Tal fato pode ser comprovado através da análise da tabela 2.6, que relaciona o tempo de crescimento bacteriano com a temperatura e o tipo de bactérias existentes e pela figura 2.1.10 que evidencia a influência que a temperatura tem na contagem microbiana de dois leites A e B com cargas microbianas distintas.

Tabela 2.6: Tempo médio da fase de crescimento de alguns tipos de bactéria em horas no leite [9].

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>5 °C</b>	<b>15 °C</b>	<b>30 °C</b>
<b>Bactérias Lácticas</b>	> 20	2.1	0.5
<b><i>Pseudomonas</i></b>	4.0	1.9	0.7
<b><i>Coliformes</i></b>	8.0	1.7	0.45

Através da análise da tabela anterior facilmente se conclui que, ao provocar o aumento de temperatura a que os microrganismos estão sujeitos verifica-se uma diminuição do tempo da fase de crescimento, ou seja, o número máximo de indivíduos existentes num determinado meio é atingido num menor espaço de tempo, ocorrendo por isso a degradação mais rápida do leite. Observa-se também que as *Bactérias Lácticas* não alteram o leite que se encontra refrigerado a temperatura de 5 °C, e que as *Pseudomonas* crescem mais lentamente que os restantes bactérias [9]. Pelo contrário se a temperatura for menor, a velocidade de todos os processos que ocorrem na célula diminui, e desta forma diminui também o crescimento bacteriano assim como a produção de ácido láctico, prolongando o tempo de conservação do leite nas melhores condições de higiene.



Figura 2.1.10: Evolução da contagem das colônias durante a conservação de dois leites A e B com diferentes contagens iniciais mantidos a temperaturas diferentes. As linhas a tracejado indicam a região onde se pode verificar a alteração do leite [9].

A temperatura também influi no modo em que aumenta o tempo de atuação dos inibidores naturais que existem no leite. Através da análise da figura 2.1.10, pode-se verificar que duas amostras de um leite B, que possui uma carga microbiana baixa de cerca de  $1.0 \times 10^3$  UFC/ml, conservadas a duas temperaturas distintas de  $4^\circ\text{C}$  e  $15^\circ\text{C}$ , possuem cargas microbianas completamente distintas ao fim de 24 horas. A amostra mantida à temperatura de  $15^\circ\text{C}$  já não se encontra apta para consumo, pois já atingiu o intervalo de valores de carga microbiana indicativas para a alteração do leite, no entanto a amostra mantida a  $4^\circ\text{C}$  ainda está nas perfeitas condições, mantendo quase intacta a sua contagem inicial. Ao fim de 72 horas a diferença entre as contagens iniciais e finais das duas amostras do leite B são ainda mais significativas, sendo de  $1.0 \times 10^5$  UFC/ml e  $1.0 \times 10^9$  UFC/ml para as amostras mantidas a  $4^\circ\text{C}$  e  $15^\circ\text{C}$ , respetivamente. Ao fim de 72 horas verifica-se que a carga microbiana da amostra mantida a temperatura superior sofreu um aumento de 1000000 pontos percentuais em relação à contagem microbiana inicial e que a outra amostra sofreu um aumento de 1000 por cento, estando ainda nas condições consideradas como aptas para consumo. Considerando agora duas amostras de um leite A, com uma contagem inicial elevada de cerca de  $5.0 \times 10^5$  UFC/ml, mantidas também a duas temperaturas de conservação diferentes, verifica-se que a amostra mantida a  $15^\circ\text{C}$  em cerca de 5 horas atinge valores de carga microbiana que indicam a alteração do leite, enquanto que o mantido a temperatura de  $4^\circ\text{C}$  só atinge esses valores ao fim de 24 horas.

Pode-se constatar então que contagens iniciais baixas aliadas a baixas temperaturas de conservação são fundamentais para a manutenção de leites com baixos valores de contagens microbianas, no entanto, é importante salientar que um leite com uma baixa contagem terá sempre um maior tempo de conservação<sup>11</sup>, independentemente da temperatura a que for mantido [9].

Não é apenas no tempo de crescimento que a temperatura é considerada como

<sup>11</sup>O tempo de conservação do leite é o tempo de armazenamento durante o qual o leite se mantém em boas condições, ou seja, que o nível de contaminação esteja compreendido entre os 0.5 e os  $1.0 \times 10^6$  UFC/ml [9].

um fator fundamental pois as bactérias existentes no leite provém de fontes como o estrume existente no meio e também do úbere da vaca e ambos estão a temperaturas próximas dos 37 °C, deste modo as bactérias necessitam de um tempo de adaptação maior ao substrato até se encontrarem nas condições favoráveis para se começarem a multiplicar, e desta forma o tempo de latência também aumenta [9]. Como é óbvio o tipo de flora microbiana e a quantidade também tem grande influência no desenvolvimento microbiano. A tabela 2.7 relaciona a contagem microbiana ao fim de 24 horas de ordenha de várias amostras de um mesmo leite com a mesma contagem microbiana inicial de  $2.3 \times 10^3$  UFC /ml, conservadas durante 24 horas, a diferentes temperaturas assim como o tempo de conservação de cada amostra de leite.

Tabela 2.7: Exemplo do efeito temperatura sobre um leite com uma contagem inicial de  $2.3 \times 10^3$  UFC /ml [9].

<i>Temp. de conservação do leite (°C)</i>	<i>UFC/ml (24 horas após ordenha)</i>	<i>Tempo de conservação do leite (h)</i>
<b>4</b>	$2.5 \times 10^3$	> 75
<b>10</b>	$1.2 \times 10^4$	30
<b>16</b>	$1.8 \times 10^5$	19
<b>20</b>	$4.5 \times 10^6$	11
<b>30</b>	$1.4 \times 10^9$	5

A análise da tabela anterior apoia as conclusões retiradas através da inspeção do gráfico 2.1.10 na página precedente. Mais uma vez se verifica que quanto menor for a temperatura de conservação a que o leite é mantido, menor é a carga microbiana e maior é o seu tempo de conservação.

Pela análise do gráfico 2.1.10 e da tabela 2.7 conclui-se que o leite cru quando é ordenhado deve ser mantido refrigerado a uma temperatura de 4 °C, pois a esta temperatura o crescimento microbiano é baixo, todavia não pode ser mantido nessas condições pois verifica-se o aparecimento de bactérias do tipo *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, assim como alguns *Coliformes* passado alguns dias de refrigeração [17]. Por este motivo, embora o leite esteja refrigerado a uma temperatura baixa, de cerca de 4 °C, não deve permanecer mais de dois dias nos tanques refrigerados de retenção nas explorações pecuárias, como já foi referido em 2.1.5.1 pois o processo de pasteurização elimina as bactérias na sua maioria, mas os *Streptococci* e os *Lactobacilli* persistem mesmo depois do tratamento térmico [17].

É de notar que por vezes o tipo de contaminação poderá ser mais importante que a contaminação total de um leite. Por exemplo uma contaminação de  $10^5$  UFC/mL de bactérias proveniente de um animal com mastite é menos prejudicial

ao tempo de conservação do leite do que  $10^3$  UFC/mL de psicotróficos [9].

#### **2.1.6.2 Animal**

O estado de saúde do animal é de extrema importância para a obtenção de um leite de qualidade, pois o leite por ele produzido é um veículo de transporte de germes. De entre as várias doenças que pode afetar os bovinos leiteiros, como a tuberculose, a febre aftosa e o aborto, a mastite é a mais comum. Esta última é uma infecção das glândulas mamárias originária por microrganismos como os *Mycobacterium Tuberculosis*, alguns *Streptococos*, *Staphylococcus Aureus* e algumas estirpes de *Escherichia Coli* que, ao entrarem pelos tetos das vacas vão-se instalar e desenvolver, provocando uma alteração significativa na quantidade e na qualidade do leite produzido pelo animal [9]. O leite produzido irá ser em menor quantidade e a acidez deste irá ser alterada, tornando-se alcalino e como tal, este não será aceite pelos compradores o que trará grandes prejuízos económicos ao proprietário. Para além de que, um animal com esta doença pode não conseguir recuperar nunca mais a sua aptidão de produtora de leite e no caso da infecção ser irreversível pode dar mesmo origem à morte do animal. O leite proveniente destes animais apresenta uma cor anormal como a existência de coágulos ou sangue e nunca deve ser aproveitado, pois ao ser ingerido pode ser um veículo de microrganismos patogénicos. Leites provenientes de animais com mastites apresentam elevadas contagem de células somáticas [5, 9, 13]. As causas do aparecimentos desta doença estão relacionadas principalmente com a falta de higiene dos animais, dos estábulos e do material circundante e também está relacionada com uma ordenha má realizada que dê origem a feridas [5].

#### **2.1.6.3 Meio ambiente e equipamento**

O grau de contaminação do leite depende do estado de limpeza do animal assim como do ordenhador e pessoal interveniente e também da higiene e limpeza das superfícies com as quais o leite entra em contato. São geralmente estas últimas o maior foco de contaminação. A maior parte destas fontes são eliminadas utilizando a ordenha mecânica que deve estar convenientemente lavada e desinfetada.

## 2.2 *Controlo de Qualidade*

O controlo de qualidade das unidades fabris de processamento do leite tem de ser efetuado ao longo de toda a cadeia produtiva, tanto na chegada do leite cru, como durante o processamento do leite e na libertação do produto acabado para o mercado. A garantia de que o leite se encontra em perfeitas condições de qualidade e higiene garante à unidade fabril a produção contínua de produto de forma segura.

### 2.2.1 *Leite cru*

A pasteurização sofrida pelo leite na unidade de produção não elimina os cuidados a ter com a qualidade do leite tanto no produtor como na própria unidade de fabril. Sendo o leite cru a matéria prima de toda a produção de lacticínios, a qualidade deste infere imenso no processo de produção, pois se esta não for elevada, pode dar origem a problemas durante a pasteurização do leite, provocando graves consequências económicas para a empresa assim como produzir problemas a nível da armazenagem dos produtos lácteos [19].

O leite que chega à unidade de produção tem que possuir parâmetros de qualidade específicos que estão regulamentadas pela NP 472 de 1987 [3] e se tais parâmetros não forem cumpridos o leite é rejeitado pela empresa. É necessário por isso efetuar testes de controlo de qualidade ao leite no momento em que ele chega à fábrica de forma a ser aceite ou rejeitado. Estes testes de rotina, para além de serem considerados como critérios de rejeição e aceitação, também são utilizados para realizar um controlo sobre a composição do leite. Desta forma, leites com maiores parâmetros de qualidade são pagos ao produtor a preços mais elevados do que leites com valores mais baixos nos parâmetros de qualidade. Estes parâmetros de qualidade referidos dependem do produto final obtido, se for para a produção de leite UHT convém que a matéria prima seja rica em sólidos totais, se for queijo o leite deverá ter uma elevada percentagem de caseína e gordura, para o fabrico de manteiga e nata, uma elevada percentagem de gordura é fundamental, por este motivo, um leite cru que é considerado com baixa qualidade na sua composição para fabrico de leite UHT poder ser considerado como matéria prima de boa qualidade para o fabrico de outros lacticínios [16].

Os testes aplicados ao leite cru podem ser de carácter microbiológico ou físico-químico e convém que estes sejam efetuados com a maior rapidez possível ou seja, logo que cheguem à unidade de produção. Periodicamente são analisados os resultados de cada produtor para se ter uma noção clara dos fornecedores de leites com maiores critérios de qualidade. É importante assim, tanto para o consumidor, como para o produtor e como para a indústria, conhecer a composição, o grau de contaminação e a estabilidade do leite, pois são estas informações que serão

fundamentais para o encaminhamento do produto recebido [19].

### 2.2.1.1 *Análises microbiológicas*

Todas as análises microbiológicas e físico-químicas estão regulamentadas pelas normas portuguesas de qualidade alimentar. É de salientar que todas estas normas datam dos anos 70 e 80 do século passado e por esse motivo já se encontram desatualizadas. Não se pode comparar os padrões de qualidade dessa altura com os atuais, por esse motivo neste trabalho vamos referir essas normas unicamente como métodos de procedimentos a efetuar.

**Contagem de microrganismos a 30 °C** A NP 459 de 1985[20] regula a aplicação do método de contagem de microrganismos a 30 °C. Este método direto de contagem padrão é utilizado para avaliar quantitativamente a carga microbiana do leite e é o mais usado [17]. No entanto verifica-se que certas bactérias têm tendência a permanecer unidas entre si depois da divisão, formando cadeias curtas ou longas, assim sendo os valores de contagem de colónias obtidos através deste método poderão ser inferiores aos valores reais, contudo, dado que este processo ainda é considerado atualmente como método de referência foi utilizado e assumido como capaz de indicar valores fiáveis[9, 20].

**Citometria de fluxo (D-COUNT)** Como já foi referido no ponto 2.2.1.1, o processo de referência para a quantificação da carga microbiana do leite cru é a contagem de microrganismos a 30 °C, mas este métodos possui a grande desvantagem de não ser de resposta imediata para além de não conseguir identificar microrganismos viáveis que não se desenvolvem no meio de cultura utilizado. Aliado a essas desvantagens tem também o problema de não distinguir entre culturas vivas de culturas mortas e de provocar cansaço e tédio nos analistas depois de várias horas a inspecionar placas (visualmente ou com o auxílio de lupa / microscópio) [21]. Estas técnicas são baseadas em fundamentos que já têm mais de um século e por esse motivo já se encontram um pouco aquém do que se pretende hoje em dia e por todos esses motivos foram desenvolvidos ao longo dos anos outros processos, como os colorimétricos baseados na libertação de corantes por enzimas, testes de redução de corantes e testes de bioluminescência, mas estes testes, embora rápidos não dão informação no que diz respeito à especificidade [21, 22]. Para além disso também se verifica que os métodos colorimétricos, como o do azul de metileno, nem sempre representam de forma correta microrganismos viáveis devido ao fato de alguns destes poderem estar a sofrer de stress e não responderem de forma esperada [22].

A citometria engloba processos como a identificação, quantificação e caracterização de células biológicas isoladas ou outras células de menor tamanho. Este

processo pode ser efetuado, como já foi referido através de um microscópio, ou então através de aparelhos denominados por citômetros de fluxo. A citometria de fluxo é uma técnica extremamente sensível, que não necessita de meio de cultura ou fase de enriquecimento e dá resultados quantitativos imediatos [22]. Esta técnica tem a vantagem de ser automática, objetiva e rápida, pois permite a análise de várias centenas de células por segundo o que traz um enorme ganho de tempo a nível industrial. Para que tal seja possível, os citômetros de fluxo medem quantitativamente as características óticas de uma célula (ou de outras partículas) quando estas se apresentam sob a forma de um fino fluxo de fluido único à frente de um feixe de luz. Para que as células se apresentem dessa forma, elas são introduzidas no interior de uma corrente rápida de fluido que, de seguida, entra na célula de fluxo. Este fluido rápido, com cerca de 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro é formado por um líquido isotónico<sup>12</sup> e move-se a cerca de 20 km/h. É nele que as amostras são injetadas a uma velocidade onde as células são introduzidas em quantidades que podem variar entre os 10 e os 60  $\mu\text{l}$  por minuto. A amostra é então introduzida, através de métodos hidrodinâmicos, no centro da corrente de fluido, dando origem a uma corrente laminar de células que se movem numa única fila para o interior do citómetro [22].

A fonte de luz utilizada é uma lâmpada de mercúrio de alta pressão ou um conjunto de lasers. À medida que as partículas vão passando, uma a uma, através do feixe de luz são medidos três parâmetros usando como detetor tubos fotomultiplicadores [22].

O interesse crescente em métodos de deteção rápidos e automáticos para análises de rotina no leite cru levaram à criação de equipamentos de quantificação direta de microrganismos como o BatoScan FC, usado por exemplo no Laboratório Interprofissional [6]. Este equipamento baseia-se na citometria de fluxo e faz a contagem bactéria a bactéria, fornecendo o resultado em impulsos IBC que depois são convertidos em colónias UFC, mas possui a desvantagem de não permitir a distinção entre os microrganismos, pois estes são muito similares e apenas é usado para analisar leite [21, 22]. Por este motivo cada vez é mais usada a citometria de fluxo aliada a técnicas de marcação de células por fluorescência pois desta forma, utilizando os marcadores corretos, é possível fazer a distinção entre microrganismos. Existem várias marcas de fluorescência que podem ser utilizadas com este objetivo, tudo depende do que se pretende medir, pois parâmetros como a integridade da membrana e o potencial eletroquímico transmembranar são importantes. Esse potencial é diferente entre células viáveis e células não viáveis, é a razão pela qual é possível distinguir as colónias vivas das mortas [22].

O D-Count é um equipamento de análise dos laboratórios da Biomeriux, baseado na citometria de fluxo que permite detetar e quantificar, de forma direta, a carga

<sup>12</sup>Num líquido isotónico a concentração de soluto tem o mesmo valor dentro e fora da célula.

microbiana de amostras líquidas, neste caso de leite cru. O equipamento está dividido em três zonas diferentes, a primeira zona corresponde ao local de preparação das amostras, a segunda corresponde ao analisador (detetor) e a terceira à recolha de dados como se pode ver na figura 2.2.1

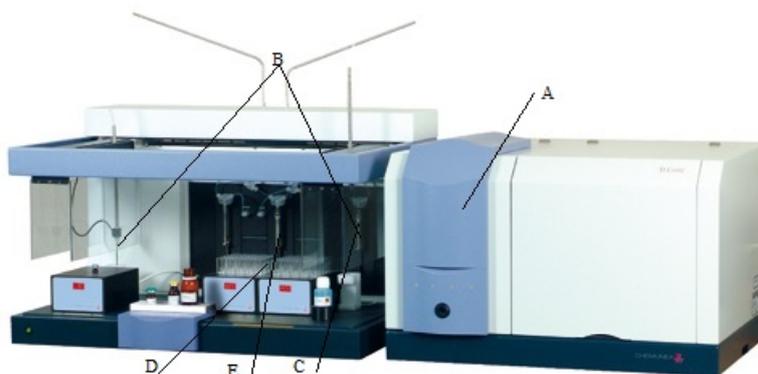


Figura 2.2.1: Equipamento de citometria de fluxo (D-Count): (A)- Acesso à célula de fluxo; (B)- Agulha; (C)- Bomba; (D)- Diluidor; (E)- Seringa [23].

Os microrganismos existentes na amostra a analisar são marcados através do uso de substrato viável, figura 2.2.2, que depois é clivado por enzimas no interior do citoplasma das células dos microrganismos viáveis [23], (neste caso o reagente usado é o ChemChrome B [22]) dando origem a um fluorocromo que, ao ser atravessado por um feixe de luz de comprimento de onda de 488 nm (figura 2.2.3 na próxima página) apresenta propriedades de fluorescência e por isso é reconhecido pelo detetor.

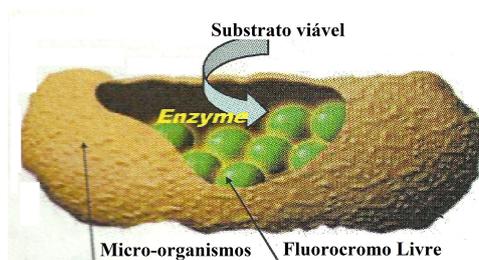


Figura 2.2.2: Marcação dos microrganismos usando substrato viável [23].

Desta forma as células tornam-se fluorescentes após sofrerem clivagem por parte das enzimas funcionais do citoplasma, como se pode verificar através da figura 2.2.4.

A obtenção da fluorescência por parte das células só ocorre quando se verifica a retenção desses produtos por parte das membranas da célula, pois se a membrana da célula se desintegrar não será possível a identificação da mesma o que irá levar a

contagens incorretas [22, 23]. O ChemChrom B é um substrato muito usado devido ao fato de ser bastante seletivo e apresentar uma grande viabilidade mesmo quando as células se encontram sobre stress durante a incubação[22].

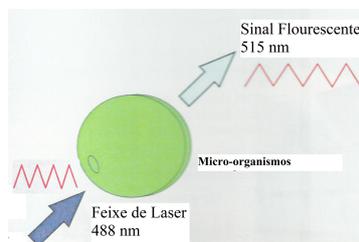


Figura 2.2.3: Tecnologia de marcação de microrganismos [23].

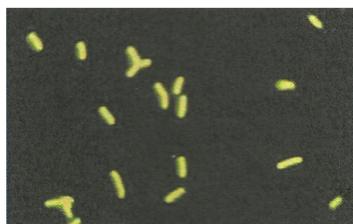


Figura 2.2.4: Microrganismos marcados com substrato fluorescente [23].

O D-Count usa como detetores dois tubos fotomultiplicadores que quantificam a fluorescência emitida pelos microrganismos, como está representada na figura 2.2.5 quando estes são iluminados pelo feixe de laser a 488nm. Estes são contabilizados um por um, à medida que atravessam a célula de quartzo [23]. O D-Count é desta forma uma citômetro de fluxo que realiza contagens diretas de microrganismos.

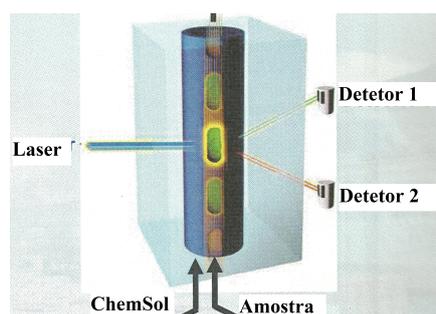


Figura 2.2.5: Fluxo laminar a atravessar a célula de quartzo do D-Count [23].

As contagens obtidas através da citometria de fluxo já foram comparadas com as obtidas através de métodos de contagens standards, como a contagem de microrganismos a 30 °C, e os valores obtidos apresentam uma correlação bastante elevada.

Os valores obtidos pela citometria de fluxo podem ser menores em relação às contagens em placa, pois, muitas vezes as células estão sob a forma de aglomerados ou cadeias e quando se efetua a contagem por placa contabiliza-se mais do que uma célula, enquanto que na citometria apenas é detetada uma única célula, mas também podem ser mais elevados quando se verifica a formação de colónias a partir de uma única célula uma vez que nestes casos na contagem por placa considera-se apenas uma unidade, no citômetro são contabilizadas várias [22].

Quando às amostras de leite não são retiradas as proteínas e as micelas, o D-Count não consegue distinguir da melhor forma as bactérias existentes no leite, pois as proteínas e micelas vão provocar interferência ótica pois têm a capacidade de se ligar às sondas fluorescentes dando origem a falsos positivos. De qualquer forma, a combinação de proteases com detergentes, aliados à utilização da centrifugação, facilita a distinção entre a população microbiana e as proteínas e micelas [22].

### 2.2.1.2 Análises físico-químicas

**Prova do álcool** A NP 453 de 2002 [24] regula a aplicação da prova de álcool efetuada ao leite cru como primeiro teste de verificação de qualidade. Ao adicionar álcool etílico ao leite na proporção de 1:1 vai-se provocar a desidratação total ou parcial de alguns colóides hidrófilos tendo por consequência a sua coagulação. Na figura 2.2.6 estão representados dois tipos de leite, o da esquerda com reação negativa é considerado como sendo um leite de boa qualidade, enquanto que o do lado direito, onde se verifica a formação de coágulos, é considerado um leite com reação positiva e sendo assim é classificado como leite de má qualidade. Verifica-se a formação de flocos de caseínas em leites com acidificação elevada provocada por leites de início ou final de lactação ou então de leites provenientes de animais com masmita [25].



Figura 2.2.6: Provas de álcool negativa (leite apto) e positiva (leite não apto)[26].

De acordo com a NP 453 de 2002 é realizada um teste preliminar com adição,

em iguais quantidades de leite e álcool com uma concentração de 80% num tubo de ensaio que é invertido uma vez. Se este teste der positivo, isto é, se se verificar a formação de coágulos, repete-se a o teste utilizando álcool a 75% [24]. Se o segundo teste também apresentar uma reação positiva na formação de coágulos o leite é recusado, se der negativa o leite é considerado como apto para ser usado para esterilização, mas não para pasteurização, nem fabrico de queijos [25]. Esta prova avalia a estabilidade do leite, nomeadamente das suas proteínas, quando são submetidas à desidratação provocada pelo álcool e é utilizada para averiguar se o leite permanecerá estável depois de sofrer tratamento térmico [19, 27]. Um leite fresco de boa qualidade, ao ser submetido a um aquecimento até a ebulição, não sofre alteração, enquanto que um leite com uma acidificação anormal dá origem à formação de pequenos flóculos de caseína que precipita [25].

Todavia pode se verificar a ocorrência de precipitação da caseína do leite durante o teste do álcool sem este possuir acidez acima do considerado normal, 0.18 gramas de ácido láctico por 100 ml de leite. Este tipo de leite é denominado por leite LINA (leite instável não ácido). Existem estudos que revelam que alterações na dieta dos animais também leva a obtenção de leites com maiores valores de acidez e consequentemente, provas de álcool positivas, sem possuírem cargas microbianas elevadas [19].

Todo o leite que apresentar prova de álcool negativa é conduzido a um tanque isotérmico onde é misturado e utilizado para o processo de fabrico de leite UHT.

### **Método da redutase**

**Teste da resazurina** Existem dois corantes que são de largo uso no controlo de qualidade a nível microbiano para estimar o número aproximado de microrganismos viáveis contidos numa amostra de leite, o azul de metileno ( $C_{16}H_{18}N_3SCl$ ) e a resazurina ( $C_{12}H_7NO_4$ ), cujas fórmulas estruturais se encontram nas figuras 2.2.7 e 2.2.8. Em ambos os casos o tempo de redução para branco é inversamente proporcional ao número de microrganismos viáveis existentes, mas como o teste com o azul de metileno é mais demorado caiu em desuso, sendo o da resazurina mais utilizado [4, 17, 28, 29].

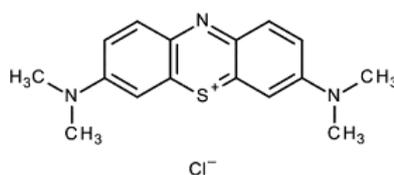


Figura 2.2.7: Representação da fórmula estrutural da molécula de Azul de Metileno.

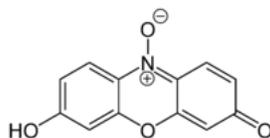


Figura 2.2.8: Representação da fórmula estrutural da molécula de Resazurina.

A flora microbiana do leite tem a capacidade de produzir uma enzima, a redutase, que vai provocar a alteração de cor na resazurina, permitindo uma fácil despistagem de leite cru impróprio para ser usado. Esta alteração de cor ocorre devido à ação dessa enzima sobre os átomos de oxigénio existentes no leite consumindo-os durante o seu metabolismo [13, 30]. Após a redução, a molécula de resazurina, que é uma oxazona altera a sua cor de azul para rosa e posteriormente para branco no caso de amostras contendo uma grande flora microbiana. A primeira etapa da redução é devida à perda de um átomo de oxigénio que se encontrava inicialmente ligado ao átomo de azoto que pertence ao núcleo da fenoxazina e se encontrava predisposto à redução. Esta primeira reação reduz a molécula de resazurina (de tonalidade azul) para resorufina (de tonalidade rosa). Esta alteração não é reversível por contacto com o oxigénio atmosférico e não depende dos potenciais de oxidação nem de redução dos intervenientes na reação. A segunda redução corresponde à transformação da molécula de resorufina na molécula de dihidroresorufina que, por ser incolor, vai-se verificar a mudança de rosa para a cor branca comum no leite. No entanto esta segunda etapa já é reversível por contacto com o oxigénio [29, 31]. Na figura 2.2.9 estão representadas as estruturas químicas das moléculas referidas, assim como as respetivas cores.

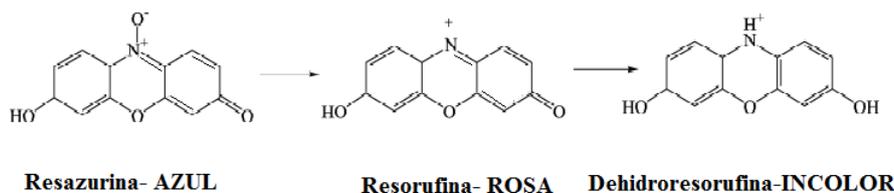


Figura 2.2.9: Alterações químicas representativa da redução da resazurina (azul) a dihidroresorufina (incolor) [31].

Esta prova de redução é de grande aplicação na indústria dos lacticínios para verificar a qualidade do leite cru, possuindo grandes vantagens de uso, pois é de fácil aplicação, fácil análise, de baixo custo, apenas detetam microrganismos vivos e pode-se dizer que é um método rápido de deteção. No entanto possui a desvantagem de não sofrer igual ação redutora por parte de todos os tipos de microrganismos [17].

A NP 455 de 1983 [32] regulamenta a aplicação do teste da resazurina efetuada

ao leite cru. Este teste foi introduzido na Alemanha em 1928 para substituir o teste do azul de metileno que, como já foi referido, para além de ser um teste demorado também é reversível por contacto com o oxigénio. A cor do leite com resazurina passa de azul para branco passando pelas tonalidades lilás e rosa, mais ou menos intensas, de acordo com a tonalidade adquirida num determinado intervalo de tempo, o leite é classificado através de um grau de 6 a 0, em que 6 corresponde a um leite de excelente qualidade e um 0 corresponde a um leite de pior qualidade. As cores correspondentes aos graus referidos estão evidenciadas na figura 2.2.10.

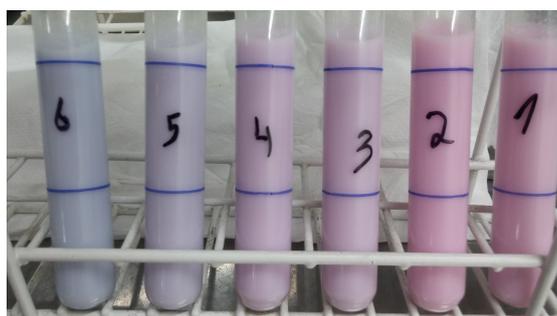


Figura 2.2.10: Diferentes cores apresentadas pela resazurina de acordo com a qualidade micro-biológica do leite e respetivos graus.

Tendo em conta que a classificação do leite está relacionada com uma escala colorimétrica, em 1943 dois investigadores Thomas e Davis desenharam o comparador de cores Lovibond, figura 2.2.11, cujo disco apresenta as várias tonalidades da resazurina e o respetivo grau que lhe corresponde, permitindo assim resultados mais precisos para comparar a qualidade dos leites [28]. Desta forma leites com cores no disco Lovibond compreendidos entre 4 e 6 são considerados como de boa qualidade e aptos para pasteurização [16].



Figura 2.2.11: Comparador Lovibond

Na tabela 2.8 pode-se verificar a relação entre a qualidade do leite com a cor e grau de resazurina. Consta-se que quanto menor a qualidade do leite, menor é o grau do disco do Lovibond, e maiores são as concentrações de resorufina e de dehidroresorufina [13].

Tabela 2.8: Relação entre a qualidade do leite e a sua percentagem em resazurina, resorufina e dehidroresorufina [13].

<i>Qualidade</i>	<i>Cor</i>	<i>Disco</i>	<i>Resazurina</i>	<i>Resorufina</i>	<i>Dehidroresorufina</i>
<b>Excelente</b>	Azul	6	100	0	0
<b>Muito Boa</b>	Lilás	5	80	20	0
<b>Boa</b>	Malva	4	60	40	0
<b>Regular</b>	PúrpuraRosa	3	40	60	0
<b>Pobre</b>	RosaPúrpura	2	20	80	0
<b>Má</b>	Rosa	1	0	100	0
<b>Muito Má</b>	Incolor	0	0	0	100

A precisão deste teste diminui com o tempo de refrigeração do leite, pois nestes casos a flora mesófila tradicional é substituída pela flora psicotrófica. Os psicotróficos não têm capacidade para provocar a redução da molécula de azul de metileno e por esse motivo não são detetados através deste teste [26]. Este método é de grande interesse para a identificação de leites provenientes de vacas doentes ou de leites de vacas no fim do seu período de lactação [25].

Verifica-se que o grau de contaminação obtido através deste método possui boa correlação com as leituras em placas para a quantificação de microrganismos psicotróficos se se realizar uma pré incubação de 18 horas a uma temperatura de 12.8 °C. No entanto, este procedimento torna-se um pouco difícil de executar tendo em conta a parca existência de estufas refrigeradas nos laboratórios que permitam a manutenção da temperatura referida [28].

**pH** A medição do pH do leite é um processo preliminar de verificação da qualidade do leite. O pH do leite, como já foi referido em 2.1.4.1, costuma oscilar entre os 6.6 e os 6.8, medidos a 20 °C, por isso valores obtidos fora desse intervalos indica contaminação microbiológica, assim como química.

Uma pré análise aos valores do pH do leite permite, de imediato, ter uma noção clara dos procedimentos a efetuar com a matéria prima, como demonstra a seguinte tabela 2.9.

Tabela 2.9: Vários cenários possíveis de acordo com o pH do leite [26].

pH	Medidas a efetuar de acordo com o valor do pH
< 6.45	Leite não recomendado para processamento do leite UHT. Leite muito instável após tratamento térmico e de pouca durabilidade
6.45 - 6.55	Risco de instabilidade após tratamento térmico e pouca durabilidade
6.55 - 6.65	Risco de pouca durabilidade
6.65 - 6.80	Leite com pH ótimo para prosseguir para UHT
> 6.80	Leite proveniente de animal com possível mastite.

**Acidez** Proceda-se à determinação da acidez do leite para avaliar o seu estado de conservação, pois um leite com valores de acidez fora dos valores normais, é impróprio para consumo direto e embora possa ser usado para produzir derivados.

O leite fresco normal não contém ácidos, mesmo assim ele apresenta uma acidez detetável pela técnica da titulação, sendo que esta acidez ocorre devido à existência de substâncias naturais como os fosfatos e citratos (minerais), a caseína e albumina (proteínas) e dióxido de carbono gasoso (gás carbónico) dissolvido. O termo acidez aparente não deve ser confundido com a acidez que se forma no leite pelo crescimento de bactérias (acidez real ou verdadeira).

A acidez titulável é devida à formação de ácido láctico proveniente do desdobramento da lactose pelos microrganismos existentes no leite e é o valor desta acidez que é fundamental para a avaliação da frescura do leite e controlo de diversas fases do fabrico de lacticínios fermentados como os queijos e iogurtes [16]. Assim sendo, a acidez do leite depende das condições de higiene em que este é mantido, da temperatura a que se encontra, pois temperaturas mais altas favorecem a atuação dos microrganismos, e como é óbvio da carga microbiana inicial do leite [4]. Também é possível encontrar leites com caráter alcalino devido à existência de bactérias que têm a capacidade de decompor a lactalbumina e transformá-la em amoníaco [25]. Uma acidez excessiva é considerada como um dos principais fatores para o leite apresentar uma estabilidade reduzida.

A acidez do leite pode ser determinada através de dois métodos que estão descritos na NP 470 de 1983 [33]. O método Dornic baseia-se num método volumétrico em que o titulante é uma solução aquosa de hidróxido de sódio, NaOH (aq),  $0.111 \text{ mol/dm}^3$  na presença de um indicador, a fenolftaleína enquanto que o método potenciométrico baseia-se, também na titulação com hidróxido de sódio  $0.111 \text{ mol/dm}^3$ , em que o final da titulação ocorre ao atingir o pH no ponto de equivalência,  $\text{pH} = 8.3$ . Ao titulante básico atribui-se a designação generalizada de solução de soda N/9 (nono normal), constituída por 4.445 gramas de hidróxido de sódio em 1000 gramas de água. Em ambos os métodos é utilizado o acidímetro de Dornic, figura 2.2.12.



Figura 2.2.12: Acidímetro de Dornic que corresponde a uma bureta graduada com ajuste automático do zero (permite continuar as titulações e evitar o contato do titulante com a atmosfera)- (1)- Bureta Graduada; (2)- Saída de NaOH; (3)- Reservatório de NaOH ( $0.111 \text{ mol/dm}^3$ ); (4)- Sistema de enchimento da a bureta com NaOH.

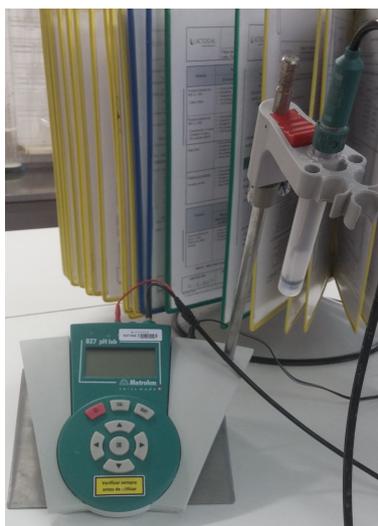


Figura 2.2.13: Medidor de pH 827 da Metrohm

À quantidade de hidróxido de sódio gasta, até se atingir a viragem da fenolftaleína ou atingir o pH no ponto de equivalência, corresponderá o grau de acidez do leite [4]. A percentagem em ácido láctico e os graus Dornic são duas escalas usadas para avaliar a acidez do leite, havendo outras, como os graus Soxhlet e graus Thorner [4]. Estas escalas relacionam-se através da tabela 2.10 [2].

Tabela 2.10: Relação entre as várias escalas de acidez [2, 26].

<b>°D</b>	<b>°SH</b>	<b>°Th</b>	<b>% Ácido láctico</b>
<b>1</b>	4/9	10/9	0.01
<b>0.9</b>	0.4	1	0.009
<b>2.25</b>	1	2.5	0.0225

O leite ao sair do úbere possui uma acidez de 0.15% a 0.16% em ácido láctico. Leites com acidez inferiores a 0.15% podem ser provenientes de animais com mastites ou então serem o resultado da adição de água ou produtos alcalinizantes enquanto que leites com percentagem de ácido láctico superiores a 16% resultam de leites com elevada carga microbiana [16]. A escala Dornic é a mais utilizada devido ao fato do seu método de determinação de acidez ser o mais rápido. Nesta escala um leite com 16 °D corresponde a ter 1,6 gramas de ácido láctico por litro de leite [4]. É importante salientar que os valores de acidez obtidos através do método Dornic são sempre superiores, cerca de 1.5 a 2 °D, aos obtidos pelo método potenciométrico, pois o método Dornic está associado à alteração da fenolftaleína de incolor para rosa e tal alteração só ocorre depois de se ter atingido o ponto de equivalência, por isso os valores de NaOH adicionados ao leite são superiores.

### 2.2.2 *Leites com baixas concentrações em lactose*

Devido ao fato de cada vez mais existirem indivíduos que não conseguem digerir totalmente, ou parcialmente, o açúcar principal do leite, a lactose, a Lactogal fabrica leites UHT especiais com valores de lactose muito inferiores em relação aos leites normais. O “0% Lactose” é um leite que contém quantidades inferiores a 0.01 gramas de lactose por 100 ml de leite ( 100 mg/l), sendo que este tipo de leite pode ser ingerido por pessoas que apresentem total intolerância à lactose e lhes permite assim o consumo de produtos lácteos sem as consequências da ingestão da lactose. Para pessoas que apresentem apenas uma ligeira intolerância à lactose, a Lactogal S.A. produz um leite denominado de “Digestão Fácil” que apresenta quantidades inferiores a 0.3 gramas de lactose por 100 ml (3.0 g/l) de leite. A intolerância a lactose, ou hipolactasia, é um problema de saúde para determinados consumidores do leite e por esse motivo é fundamental que todo o leite produzido contenha as quantidades de lactose previstas pelo rótulo [7].

#### 2.2.2.1 *Intolerância à Lactose*

A intolerância à lactose é uma condição muito comum em adultos de várias etnias, embora nos indivíduos de certas zonas de África e da Ásia se verifique com maior incidência [11]. Nos indivíduos provenientes do norte da Europa esta condição é menos verificada, assim como na população Americana branca e em duas tribos nómadas em África [7, 8, 17]. Nos descendentes de grupos étnicos, cujos adultos tenham consumido leite ao longo de gerações, esta desordem é verificada com menor incidência do que naqueles cujo leite não fez parte da sua dieta alimentar habitual. Este problema de saúde ocorre quando, por diferentes motivos, as células epiteliais dos intestinos deixam de produzir a quantidade de lactase suficiente para permitir a quebra das moléculas de lactose e convertê-las em glucose e galactose e permitir assim a absorção para a corrente sanguínea da lactose do leite e dos seus derivados [10].

As causas desta intolerância podem ser de vários tipos, pode verificar-se com o envelhecimento do adulto pois, devido à conseqüente alteração na dieta, verifica-se a ingestão de menores quantidades de produtos lácteos, conseqüentemente, o corpo pode deixar de produzir lactase suficiente para permitir a digestão da lactose, uma vez que está provado que a atividade da lactase diminui entre 5 a 10% em relação ao nascimento [7]. Existem também situações, raras no entanto, em que a criança já nasce com este problema, rejeitando logo de início o leite materno. Nestes casos o problema é genético tendo sido passado pelos pais, necessitando ambos de ter o gene da intolerância à lactose. Verifica-se no entanto que os bebés prematuros que nascem antes do terceiro trimestre de gestação, também apresentam esta dificuldade, pois os níveis de lactase no organismo só começam a ser significativos partir

desse trimestre [10].

Mas este problema pode também ocorrer através de gastroenterites, ou doença de Chron, ou mesmo como efeito secundário de algumas de intervenções cirúrgicas. No caso das gastroenterites verifica-se que os microrganismos atacam a porção pilosa da membrana do intestino delgado, podendo modificá-lo e assim alterar a atividade da lactase [10]. Nestes casos esta intolerância pode ser temporária e o corpo pode ter a capacidade de conseguir restaurar os níveis de produção da lactase normais que permitam a normal digestão da lactose. Esta problemática da intolerância a lactose não é exclusiva dos humanos e também se verifica noutros mamíferos.

Num organismo com intolerância à lactose, esta não consegue ser completamente processada nem absorvida no intestino delgado, e por esse motivo passa para o intestino grosso onde as bactérias da flora intestinal do cólon utilizam a lactose como fonte de energia e convertem-na em produtos tóxicos que dão origem a cólicas intestinais, flatulência e diarreias [7, 17]. À medida que o tempo vai passando, o problema vai agravando, pois a lactose não digerida vai dar origem a um aumento da pressão osmótica o que leva a um aumento de retenção de líquidos nos intestinos [8].

Os indivíduos com intolerância à lactose podem ter uma vida perfeitamente normal, apenas necessitam de realizar uma dieta mais controlada, evitando o consumo de produtos com este dissacarídeo. Não se verificam problemas consequentes da falta deste componente, pois para a formação dos cerebrosídeos ou das glicoproteínas é fundamental a presença da galactose, mas esta molécula também pode ser sintetizada no fígado a partir da glucose [14].

Por todos estes motivos, a quantificação da lactose é de extrema importância em várias áreas, mas representa um enorme desafio. A espectroscopia, a polarimetria, a gravimetria, a espectroscopia de infravermelho, a titulação, a cromatografia (HPLC e GLC) e os métodos enzimáticos são alguns dos processos que permitem a quantificação da lactose, mas a maior parte deles apresenta a desvantagem de serem métodos cujos tempo de análise são demorados, para além de serem extremamente caros, de difícil automação e de ser necessário pessoal com conhecimentos específicos para serem operados [12, 34]. Os métodos enzimáticos baseados nas deteções amperométricas apresentam-se como uma boa solução a esta problemática uma vez que permitem realizar análises a baixo custo, rápidas, com elevada seletividade e precisão e permitir a sua realização por um operador não especializado devido ao fato de ser de fácil manuseio [35].

Na unidade fabril da Lactogal, sediada na Tocha, o controlo dos níveis de lactose no leite eram realizados recorrendo ao valor crioscópico do leite que eram medidos através de um crioscópio representado na figura 2.2.14.



Figura 2.2.14: Crioscópio utilizado no laboratório de controlo da concentração de lactose no leite.

Através deste, era possível estimar o ponto final do processo de desdobramento da lactose em glucose e galactose uma vez que se verificava a diminuição do valor do ponto crioscópico à medida que ocorria o desdobramento. Considerava-se o valor de  $-0.730 \pm 0.005$  °C como valor crioscópico alvo para dar como terminado o processo de desdobramento para leites com concentrações de lactose inferiores a 3.0 g/l, enquanto que para leites abaixo dos 100 mg/l era considerado o fator tempo (35 horas de desdobramento) como sendo suficientes.

### 2.2.2.2 Biosensores

Um biosensor é um dispositivo analítico de pequeno tamanho que permite quantificar moléculas de interesse e o seu desenvolvimento só foi possível devido ao aumento da interdisciplinar entre as ciências, neste caso, entre a biologia e a eletrónica, que se tem verificado nestas últimas décadas. Um biosensor é um equipamento que combina um elemento biológico (ácidos nucleicos, anticorpos, microrganismos, tecidos orgânicos ou enzimas) capaz de detetar uma propriedade química, física ou biológica de um determinado analito de interesse e um transdutor eletrónico, que permite a tradução das interações existentes entre o analito e o bioelemento em sinais que podem ser mais facilmente medidos e quantificados. Os transdutores mais utilizados são de natureza eletroanalítica, devido ao fato de serem de fácil utilização, baratos e apresentarem elevada rapidez, podendo ser óticos, térmicos ou de massa. Dentro dos métodos de deteção eletroanalíticos destacam-se os transdutores amperométricos que são os mais utilizados pela investigação/indústria devido à sua elevada fiabilidade e sensibilidade associada ao baixo custo. A sua grande

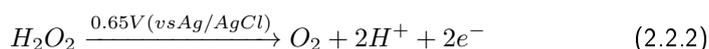
utilização pode ser explicada devido ao fato de terem sido estes os utilizados por Clark em 1956 quando se iniciou o estudo dos biosensores com a criação de um biosensor contendo a enzima glucose oxidase.

Os biosensores amperométricos são sensores electroquímicos baseados na medição do valor ou da densidade de corrente numa célula electroquímica quando se lhe é aplicado um potencial constante. A existência de partículas electroquimicamente ativas na solução da célula electroquímica dá origem à formação de uma densidade de corrente, já que são estas partículas que, ao sofrer oxidação ou redução na superfície do eléctrodo de trabalho, originam alterações na corrente que são proporcionais à concentração das mesmas. Durante a electrólise, o eléctrodo de trabalho pode ser utilizado como ânodo ou cátodo dependendo das características das substâncias de interesse e da voltagem aplicada. Podem-se dividir os biosensores amperométricos em 3 classes:

- biosensores que utilizam a medição direta da concentração de substratos ou produtos de uma reação enzimática;
- biosensores que utilizam substâncias (mediadores) que realizam a transferência de eletrões entre o centro ativo da enzima até ao eléctrodo;
- biosensores que utilizam a transferência direta de eletrões entre a enzima e o eléctrodo [36, 37].

A utilização de biosensores cobre uma grande variedade de aplicações, desde a indústria alimentar, à agricultura, ao ambiente e às análises clínicas [38, 39].

Os biosensores amperométricos utilizam enzimas que catalisam reações de oxidação/redução. As oxidases são enzimas de grande utilização nos biosensores que catalisam reações em que o oxigénio molecular funciona como aceitador de eletrões verificando-se a formação de moléculas de peróxido de hidrogénio, como está descrito na equação 2.2.1. O peróxido de hidrogénio, gerado pela atuação das oxidases (2.2.1), pode ser medido amperometricamente por oxidação através de um eléctrodo sólido, podendo este ser de platina ou de carbono vítreo, como está evidenciado na equação 2.2.2.



Para além das oxidases, as desidrogenases também são enzimas de grande aplicação nos biosensores, mas nestes o NADH é a espécie que se quantifica. Estas enzimas catalisam reações entre o substrato de interesse, que sofre oxidação por parte de uma molécula aceitadora de eletrões, que, geralmente, é a nicotinamida adenina

dinucleotídeo (NAD ) ou então a flavina-adenina dinucleotídeo (FAD). Neste caso concreto o substrato vai sofrer a ação conjunta da desidrogenase e da coenzima<sup>13</sup> NAD<sup>+</sup>.

O NAD é a principal coenzima que realiza a transferência de eletrões durante a oxidação de moléculas. Esta enzima possui duas formas, a oxidada o NAD<sup>+</sup>, cujo átomo de hidrogénio do anel possui carga positiva, e a reduzida, o NADH de carga neutra. O anel de nicotinamida do NAD<sup>+</sup> corresponde à sua parte reativa e durante a oxidação de um substrato, este aceita um ião de hidrogénio e dois eletrões (o que equivale a um ião hidreto) deste.

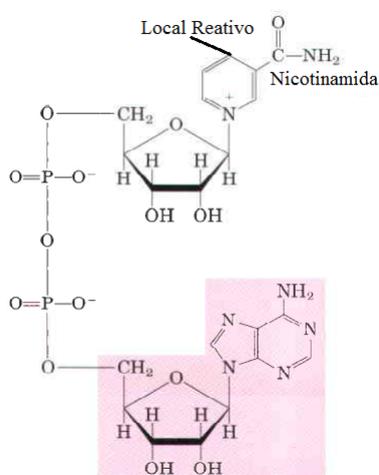


Figura 2.2.15: Molécula de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) [8, 40].

Durante as desidrogenações um átomo de hidrogénio do substrato é transferido diretamente para o NAD<sup>+</sup> enquanto que o outro aparece misturado no solvente sob a forma de protão. Os eletrões perdidos pelo substrato são transferidos para o anel de nicotinamida. Esta reação está descrita na equação 2.2.3 [7, 8].



A concentração de NADH é diretamente proporcional à concentração do analito de interesse e permite deste modo a sua quantificação [41].

Nos biosensores que utilizam as oxidases como componente biológica verifica-se a formação de vários compostos orgânicos como o ácido úrico e o ácido ascórbico que sofrem co-oxidação posterior levando a uma fraca seletividade, mas por sua

<sup>13</sup>Coenzimas são pequenas moléculas orgânicas, frequentemente derivadas de vitaminas, que se ligam às enzimas e que são fundamentais à atividade destas [7].

vez, utilizando as desidrogenases também se verificam os mesmos problemas. A utilização de substâncias que facilitam a transferência de elétrões, denominados de mediadores, tem se vindo a verificar como benéfica para a resolução destes problemas. Os mediadores podem ser naturais de características orgânicas (azul de metileno, fenazina, violeta de metila, alizarina amarela, entre outros) ou então de características inorgânicas como o ferricianeto [36, 37, 41].

Devido ao crescente problema da intolerância à lactose, cada vez mais a utilização de biosensores capazes de quantificar os níveis de lactose em alimentos tornou-se de extrema importância. Diversos biosensores de características amperométricas foram criados ao longo dos anos, podendo estes ser constituídos através da imobilização de mais do que uma enzima (três enzimas (beta-galactosidase, glucose oxidase e peroxidase) ou duas enzimas (beta-galactosidase e glucose oxidase) ou então por uma enzima apenas (galactase oxidase; oligossacarídeo desidrogenase ou celobiose desidrogenase) [41, 42]. A utilização da galactose oxidase em vez da glucose oxidase (mais comum) traz a vantagem de se conseguir obter um processo quantitativo independente da glucose. Tem se verificado que a presença da enzima beta-galactosidase no biosensor aumenta a sensibilidade do mesmo [41].

A utilização de biosensores para a quantificação de lactose em leites com baixos teores neste açúcar é um método inovador que foi introduzido na Lactogal recentemente, sendo que, anteriormente, todas as análises quantitativas do teor de lactose necessárias num determinado leite, eram enviadas para um laboratório externo (DSM) com sede na Alemanha, para serem efetuadas através do método de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), conseqüentemente, o tempo desde o momento da necessidade da análise até à vinda dos resultados era excessivo e não era possível a obtenção rápida de resultados. Estes procedimentos estavam de acordo com análises realizadas na DSM e encontravam-se validadas pelo Sistema de Gestão de Qualidade da Lactogal.

O Biomilk, 2.2.16 na página seguinte, é um dispositivo analítico e compacto que combina uma componente biológica com um tradutor amperométrico permitindo a quantificação de analitos de interesse. O biosensor é constituído por componentes eletroativos e por um componente biológico (enzima(s)) imobilizado que deteta alterações de corrente elétrica quando entra em contato com o analito. Para se proceder à análise, o equipamento necessita de registar o branco da medição, isto é, o sinal elétrico que existe na célula eletroquímica, existindo apenas um solvente denominado pelo distribuidor do equipamento de "Solução de Medida" dentro do copo de análise. A calibração do aparelho é efetuada através da adição de três quantidades específicas de reagentes de calibração que vão promover a ocorrência de reações redox. O biosensor vai medindo os sinais elétricos que vão sendo originados à medida que as concentrações em lactose dos reagentes de calibração aumentam. A partir da diferença de intensidades amperométricas registadas antes e depois da

adição da amostra, o equipamento calcula a variação de intensidade de corrente que correlaciona com a concentração de lactose.



Figura 2.2.16: Equipamento Biomilk fornecido pela Biolan MicroBiosensores

O biosensor está armazenado a uma temperatura que ronda os 4 °C, temperatura à qual a enzima contida no biosensor encontra-se inativa. Por esse motivo, antes de ser utilizado, o biosensor tem de ser previamente ativado para que a enzima possa trabalhar sob as melhores condições. Os valores da calibração do equipamento também são essenciais na execução do método pois se os resultados da reta de calibração não atingirem os valores mínimos de 0.9990 para o  $r$  (coeficiente de correlação de Pearson) e 6000 para o declive da reta de calibração esta não é considerada válida e tem de ser repetida [35].

Este equipamento analítico tem a capacidade de revelar o teor de lactose em 3 intervalos de concentração diferentes nos quais o procedimento a efetuar é praticamente igual, havendo alterações nas concentrações das soluções utilizadas para ativar e calibrar o aparelho, bem como as quantidades de amostra a introduzir durante a análise. O intervalo de quantificação mais baixo está compreendido entre 0 e os 200 mg/l e é o utilizado para analisar leites com valores de lactose inferiores a 0.01 gramas por 100 ml de leite, ou seja, uma concentração inferior a 100 mg/l. Para se analisar leites com teores de lactose inferiores a 3.0 gramas por 100 ml de leite (3.0 g/l) utiliza-se o intervalo de valores de 0 a 6.0 g/l [35].

## 2.3 *Controlo Estatístico*

Existem dois grandes tipos de Estatística, a Descritiva e a Inferencial. A Estatística Descritiva é composta por métodos que permitem a organização e compactação de informação. A utilização de gráficos e tabelas e o cálculo de variáveis descritivas como médias ( $\mu$ ), desvios padrão ( $\sigma$ ) e percentis fazem parte da estatística descritiva. Por seu lado na Estatística Inferencial são utilizados métodos que permitem retirar conclusões acerca de uma população através da análise de apenas uma pequena amostra dessa mesma população. Os dois tipos de estatística estão interligados pois é fundamental a utilização das ferramentas descritivas para organizar e sumariar a informação obtida antes de se poder aplicar as ferramentas da estatística inferencial [43].

O controlo estatístico faz parte da Estatística Inferencial e permite realizar uma análise mais simples de vários resultados experimentais, possibilitando ao utilizador a identificação dos parâmetros que realmente influenciam uma medição, desprezando os fatores secundários. Permite também a identificação de valores obtidos através de processos que por algum motivo não levaram à obtenção do valor mais correto. Qualquer trabalho experimental tem como objetivo fazer previsões com base em informação limitada e por essa razão se faz com frequência análises estatísticas para testar o resultado das experiências. Os métodos estatísticos são imensamente úteis na tomada de decisões sendo por isso usados em diferentes áreas como o Controle de Qualidade, Economia, Gestão e Ciências Sociais, para além de muitas outras.

Um objetivo comum em muitos estudos é verificar se os dados obtidos estão de acordo com determinadas previsões. Estas previsões são denominadas por hipóteses<sup>14</sup> sobre variáveis medidas no referido estudo. Os Testes de Hipóteses (ou testes de significância) fazem parte da estatística inferencial e são procedimentos que conduzem a tomadas de decisões com base na informação fornecida pelos dados de uma amostra, sobre aceitação ou não aceitação de determinada hipótese estatística que se coloca sobre uma população ao investigador. Quando se utiliza qualquer um destes testes assume-se que as medições efetuadas são independentes das restantes e também que uma medição não afeta o valor obtido durante a análise seguinte.

### 2.3.1 *Formulação de Hipóteses*

Um teste de hipóteses considera sempre duas afirmações acerca do valor de um determinado parâmetro da população em estudo: a hipótese nula ( $H_0$ ) e a hipótese alternativa ( $H_1$ ). A hipótese nula é aquela que é testada diretamente e é composta por uma afirmação de inexistência de diferença. Por seu lado, a hipótese alternativa

<sup>14</sup>Uma hipótese é uma afirmação sobre uma determinada população [44].

é constituída por uma contradição da hipótese nula. A formulação das hipóteses a testar tem de ser clara e bem definida para depois se poderem tirar conclusões finais aquando da utilização dos testes para a identificação da hipótese correta [45, 46].

A aplicação de um teste de hipóteses e consequente conclusão através da decisão de aceitação de  $H_0$  ou  $H_1$  depende dos resultados da aplicação do teste estatístico considerado, assim como de outros parâmetros importantes como o tipo de distribuição, simetria do teste (unilateral versus bilateral), o tipo de erros, o nível de confiança, o nível de significância e o valor prova. Através de uma análise cuidada a todos estes itens é possível interpretar de forma correta os resultados obtidos durante um procedimento experimental e assim tomar decisões de aceitação ou rejeição tendo como base uma ferramenta estatística.

Para se garantir a obtenção de estimativas corretas tem que se afiançar que existe:

- ausência de erro sistemático;
- erro aleatório normal;
- erro independente;
- ausência de valores discrepantes (outliers).

**Distribuições Estatísticas Contínuas** As distribuições estatísticas mais utilizadas na aplicação dos testes de hipóteses são a distribuição normal, a distribuição t de Student e a distribuição F de Fisher.

**Distribuição normal ou Gaussiana** Uma distribuição normal, ou também conhecida por Gaussiana, define-se como sendo uma distribuição contínua de probabilidade de uma variável aleatória e é a distribuição de probabilidade mais importante da análise estatística. Possui média  $\mu$  e variância  $\sigma^2$  positiva.

A função densidade de probabilidade de uma variável aleatória X normal é definida através da seguinte equação indicada na equação 2.3.1.

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (2.3.1)$$

Este tipo de distribuição possui as seguintes propriedades:

- distribuições normais são definidas através de dois parâmetros, a média ( $\mu$ ) e o desvio padrão ( $\sigma$ );
- a média, a moda e a mediana apresentam o mesmo valor;
- a curva tem forma de sino e os seus valores são simétricos em relação ao valor médio da distribuição;

- a área da curva é igual a um;
- a curva aproxima-se mais do eixo dos xx à medida que se afasta da média em ambos os lados, mas nunca toca o eixo
- no intervalo  $[\mu - \sigma ; \mu + \sigma]$  o gráfico curva para baixo, mas fora dele a curva é virada para cima como está indicado na figura 2.3.1.

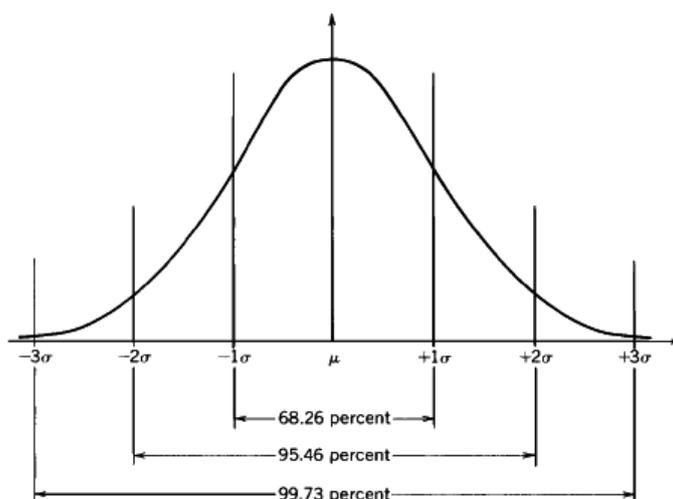


Figura 2.3.1: Função de distribuição normal. Sabe-se que neste tipo de distribuição o intervalo  $[\mu \pm \sigma]$  contém 68.26% das observações, o no intervalo  $[\mu \pm 2\sigma]$  possui 95.45% das observações, enquanto que o intervalo  $[\mu \pm 3\sigma]$  abrange 99.73% das observações [43].

No entanto através da utilização dos parâmetros  $\mu$  e  $\sigma$  é possível a obtenção de uma distribuição mais conveniente na qual a variável  $x$  é transformada noutra variável  $z$  de acordo com a relação indicada na equação 2.3.2. Nesta distribuição, denominada por distribuição normal padrão e conhecida por estatística  $z$ , a média é nula e o desvio padrão é igual a um [47].

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (2.3.2)$$

**Distribuição t-Student** A estatística  $z$  referida na página precedente é muito útil para quando se conhece o valor da variância ( $s^2$  ou  $\sigma^2$ ) da população, no entanto nos casos em que tal não se verifica, essa distribuição não pode ser utilizada. Nestes caso, se a amostra analisada tiver sido retirada de uma distribuição normal, é possível definir a estatística  $t$  de Student através da equação 2.3.3 com  $(n - 1)$  graus de liberdade, em que  $\bar{x}$  representa a média de uma amostra aleatória com  $n$  elementos

inferiores a cinquenta com um determinado valor de variância da amostra, retirada de uma população com média  $\mu$ .

A distribuição t-Student é muito utilizada para estimar intervalos de confiança relacionadas com o valor da estimativa central, deduzir conclusões estatísticas com base na comparação de estimativas e estimar a dimensão da amostra para obter uma certa precisão.

Desta forma a estatística retirada de uma distribuição normal é definida pela equação 2.3.3 e apresenta uma distribuição t-Student com  $(n-1)$  graus de liberdade.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad (2.3.3)$$

À medida que o número de elementos tende para infinito, a distribuição t-Student aproxima-se à função de distribuição normal como se pode verificar através as análise da figura 2.3.2. Considera-se que para amostras superiores a trinta amostras a distribuição z e t-Student têm igual forma.

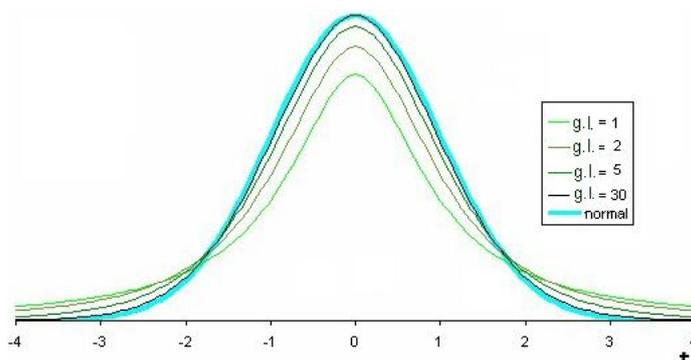


Figura 2.3.2: Distribuição t-Student. Verifica-se que à medida que vão aumentando os graus de liberdade (g.l.) da amostra, a distribuição t-Student apresenta uma forma cada vez mais parecida com a distribuição normal.

**Distribuição F** Quando se pretende verificar se duas amostras aleatórias e independentes foram retiradas de distribuições com igual variância é necessário a utilização da distribuição de Fisher para poder comparar as variâncias de cada uma. Sendo  $s_1^2$  e  $s_2^2$  as variâncias de cada uma das duas amostras independentes com tamanhos  $n_1$  e  $n_2$ , a estatística é dada pela expressão 2.3.4 e segue a distribuição F de Fisher/Snedecor. É de notar que o denominador possui  $(n-1)$  graus de liberdade e o numerador  $(n-1)$  graus de liberdade.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (2.3.4)$$

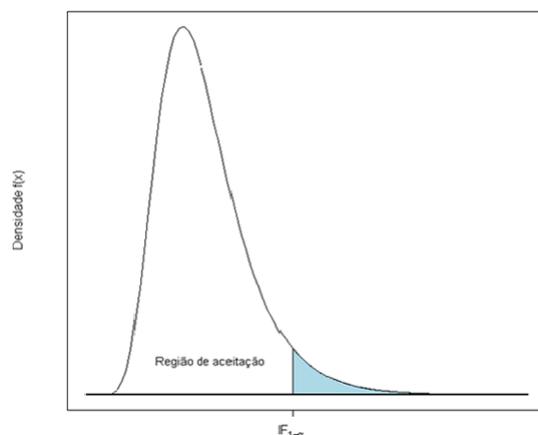


Figura 2.3.3: Distribuição F de Fisher onde está evidenciado a zona de aceitação da hipótese nula.

**Tipo de erros** Sendo o teste de hipóteses uma área da inferência estatística podem ocorrer sempre erros, uma vez que toda a análise é feita dos valores das amostras para a população. Ao confrontar as hipóteses  $H_0$  com  $H_1$  os erros podem ser de dois tipos:

- Erro de 1ª espécie (tipo I)- consiste em rejeitar  $H_0$  quando na realidade  $H_0$  é válida
- Erro de 2ª espécie (tipo II)- ocorre quando não se rejeita  $H_0$  quando na realidade  $H_0$  não é verdadeira.

A probabilidade de cometer um erro do tipo I é dada pela letra  $\alpha$ , e a probabilidade de efetuar um erro do tipo 2 denota-se pela letra grega  $\beta$ . O objetivo é sempre rejeitar  $H_0$  quando esta não é válida, de forma a evitar um erro do tipo I. Para facilitar a aplicação de um testes deve-se fixar o valor de  $\alpha$  antes de se dar início ao teste. Os valores mais comuns de  $\alpha$  são o 0.1, o 0.05 e o 0.01.

**Intervalo de Confiança, Nível de Significância e Nível de Confiança** Um intervalo de confiança (IC) é utilizado para indicar a fidedignidade de uma estimativa sobre um parâmetro de interesse. Todos os resultados obtidos fora do intervalo designado como sendo o de confiança para a estimativa em estudo correspondem a hipóteses rejeitadas.

O nível de significância, representado por  $\alpha$  e geralmente expresso em percentagem<sup>15</sup> corresponde à probabilidade máxima de ocorrência de um erro do tipo I e corresponde à área da região de rejeição no gráfico da distribuição de probabilidade associada (distribuição normal, t de Student ou F). As normas ISO aconselham a utilização de 0.05 como nível de significância padrão para a aplicação dos testes de

<sup>15</sup>Nível de significância=  $100\% \times \alpha$

hipóteses, no entanto o valor de 0.01 deve ser utilizado no caso de se querer obter conclusões com alto nível de confiabilidade.

Por seu lado o nível de confiança<sup>16</sup> reflete a probabilidade de de aceitação da hipótese correta. Um nível de confiança de 95% por exemplo indica que existe uma probabilidade de 95% do parâmetro em estudo estar correto e consequentemente uma probabilidade de 5% de se estar a cometer um erro do tipo I [47].

**Valor de Prova** A indicação do valor observado da estatística do teste, seguido da consulta de uma tabela para a procura de um valor crítico de modo a tirar conclusões, tem sido recentemente “substituído” pelo cálculo da probabilidade de se observar um valor igual ou mais extremo do que o observado, se a hipótese nula é verdadeira – chama-se a isto valor de prova ou valor-p ( p-value). Quanto menor for o p-value, menor é a consistência dos dados com a hipótese nula, pois o valor da probabilidade de tal ocorrer é muito baixa. Em regra um valor de prova inferior a 0.01 é uma forte evidência para a rejeição da  $H_0$  e aceitação de  $H_1$ , mas se for superior a 0.05 indica que a suposição implícita que  $H_0$  é verdadeira e por isso deve ser aceite. A zona compreendida entre o 0.05 e 0.01 para o valor de prova é considerada como uma zona de dúvida, e por esse motivo o teste estatístico terá de ser realizado de novo, mas agora com um nível de significância inferior, ou seja de 0.01 e só depois então se poderão tirar conclusões sobre a veracidade de  $H_0$  [40]. Este tipo de procedimento é usualmente o adotado quando se trabalha com softwares estatísticos de análises de dados, pois a informação a respeito do valor de prova está disponível de entre os resultados apresentados pelo computador.

**Simetria do Teste** Todos os testes aplicados ao dados obtidos podem ser de dois tipos no que diz respeito à simetria. Os testes unilaterais são aqueles em que apresentam a região de rejeição apenas de um dos lados da hipótese alternativa, ou seja nestes casos à hipótese nula estão associados termos como maior ou menor do que. No caso dos testes bilaterais, a região de rejeição aparece nos dois lados das caudas da distribuição e a estes testes estão associados os termos igual ou diferentes na afirmação a testar como hipótese nula.

**Procedimento Padrão** Um teste estatístico deve ser aplicado seguindo sempre um conjunto de passos que constituem o seu procedimento lógico. Desta forma deve-se seguir os passos enunciados nos seguintes pontos:

- identificação do problema em questão;
- escolher o teste apropriado a aplicar tendo em conta a distribuição estatística que melhor se enquadra;

<sup>16</sup>Nível de confiança=  $1-\alpha$  ou  $100 \times (1-\alpha)\%$

- escolher o valor para o tipo de erro I (geralmente o valor mais comum é o  $\alpha = 0.05$  mas o valor  $\alpha = 0.01$  deve ser utilizado sempre que a importância das decisões seja maior);
- enunciar a hipótese nula ( $H_0$ ) e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) de forma simples e concreta de forma a não deixar dúvidas;
- determinação do valor teste (TV) a partir da expressão matemática correspondente;
- comparar o valor obtido com a região de aceitação do teste de forma a tomar a decisão de aceitar ou rejeitar a  $H_0$  [43].

Se o valor teste calculado for inferior ou igual ao valor crítico, a  $H_0$  é aceite, se pelo contrário for superior terá que se voltar a realizar o teste estatístico, mas agora considerando uma probabilidade de erro inferior ao primeiro caso, ou seja um  $\alpha = 0.01$ . Se se continuar a verificar que o valor teste obtido continua a ser superior ao crítico  $H_1$  é considerada como válida e  $H_0$  rejeitada.

### 2.3.2 Teste de Grubbs

O teste de Grubbs é um teste diagnóstico de identificação de valores extremos em observações amostrais, permitindo a identificação desses resultados que são designados por outliers. Neste teste é usada a distribuição z ou t-Student consoante o número de elementos que constituem a amostra para decidir a aceitação ou rejeição da hipótese nula. Existem outros testes estatísticos que permitem também o reconhecimento deste tipo de valores, como o Teste Q de Dixon, mas o Teste de Grubbs é considerado como o teste mais robusto para a identificação de outliers.

Para se aplicar este teste tem de se começar por determinar o valor médio, o desvio padrão das amostras e de seguida identificar os valores extremos que poderão ser os possíveis outliers. As hipóteses a testar,  $H_0$  e  $H_1$  indicam que  $x$  é outlier ( $H_0$ ) e  $x$  não é outlier ( $H_1$ ).

De seguida aplica-se as equações 2.3.5 e 2.3.6 respetivamente para o cálculo do valor teste G para o máximo e de G mínimo nas quais os valores de  $x_{max}$  e  $x_{min}$  correspondem aos valores suspeitos de serem outliers.

$$G_{max} = \frac{|x_{max} - \bar{x}|}{s_x} \quad (2.3.5)$$

$$G_{min} = \frac{|x_{min} - \bar{x}|}{s_x} \quad (2.3.6)$$

Para se verificar se os valores suspeitos são na realidade outliers o passo seguinte é comparar os valores obtidos para o  $G_{max}$  e  $G_{min}$  com o valor crítico de G na

tabela de valores respetiva (Anexo 1, Tabela 5) para um grau de significância de 0.05. Se nenhum dos valores calculados for superior ao valor crítico tabelado, então a amostra é validada e desta forma pode-se assumir a não existência de outliers na amostra obtida. Se pelo contrário algum dos valores calculados a partir das equações 2.3.5 e 2.3.6 for superior ao  $G_{\text{crítico}}$ , esse valor (máximo ou mínimo) é considerado como sendo disperso e é retirado da amostra inicial sendo o Teste de Grubbs realizado novamente. Se os valores de  $G$  calculados para os extremos continuarem a ser superiores aos tabelados, esses valores continuarão a ser retirados e o teste de novo repetido e assim sucessivamente até se poder considerar a amostra validada e garantir que não existe nenhum valor que influencie incorretamente o tratamento estatístico de forma à obtenção de erros do tipo I ou II [45].

### 2.3.3 Teste *t* emparelhado

O teste *t* emparelhado é usado para comparar duas médias populacionais relacionadas, quando se possui uma amostra com  $n$  elementos, aleatoriamente escolhida a partir de uma população com uma distribuição normal [46]. O teste *t* emparelhado é bilateral e tem como objetivo testar se duas médias, obtidas a partir da análise dos mesmo  $n$  elementos, em situações diferentes, são iguais. Se esse for o caso, então verifica-se que a diferença média entre os valores obtidos pelos dois métodos irá tomar um valor nulo [40, 45, 48]. Neste caso concreto, este teste e o ANOVA<sup>17</sup> serão usados para verificar a aplicação de um novo método de análise tendo como base um método de referência.

Tendo o teste *t* emparelhado como objetivo a comparação de duas médias, a hipótese nula refere exatamente essa condição, desta forma  $H_0$  é descrita através da equação 2.3.7 ou 2.3.8 que se seguem.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 \quad (2.3.7)$$

$$H_1 : \Delta=0 \quad (2.3.8)$$

Se pelo contrário a média da diferença entre os dos valores obtidos através de cada método são diferentes de zero, a  $H_1$  toma o seguinte aspeto da equação 2.3.9 ou da equação 2.3.10:

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \quad (2.3.9)$$

$$H_1 : \Delta \neq 0 \quad (2.3.10)$$

<sup>17</sup>ANOVA- Do inglês Analysis Of Variance.

Para se executar este teste tem de se elaborar uma tabela em que cada linha represente os valores individuais obtidos através da aplicação dos dois métodos diferentes ( $M_1$  e  $M_2$ ) e de seguida determinar a diferença numérica entre esses valores. Posteriormente é calculada a média dessas diferenças ( $\bar{d}$ ), a variância ( $s^2$ ) assim como os graus de liberdade ( $g.l. = n - 1$ ). O valor teste obtém-se através da expressão representada pela equação 2.3.11.

$$TV = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}} \quad (2.3.11)$$

A aceitação da  $H_0$  como válida verifica-se a partir da comparação dos valores do TV em relação aos valores críticos da tabela 1 do Anexo 1 [40, 45, 48].

### 2.3.4 Teste de Mandel

Aplica-se o Teste de Mandel para a verificação matemática da existência de linearidade entre duas amostras relacionadas. Através da aplicação deste teste pode-se ter uma noção clara do efeito que um determinado parâmetro exerce sobre a linearidade apresentada e assim pode-se verificar o efeito desse parâmetro no valor da variância do ajuste da reta obtida.

Este teste é baseado na suposição de que desvios relativamente grandes de valores linearmente relacionados são devidos à existência de não linearidade entre as amostras e esses desvios podem ser reduzidos através da seleção de um modelo de regressão mais adequado ou então da exclusão de determinados valores amostrais que permitem diminuir o valor da variância do ajuste e esses valores são considerados como sendo outliers. O teste de Mandel obedece a uma distribuição do tipo F, estando os valores críticos desta distribuição na tabela 2 e tabela 3 do Anexo 1 [43].

Para se poder aplicar este teste é necessário primeiramente identificar o possível valor correspondente a um outlier e de seguida calcular o respetivo valor teste pela equação 2.3.14 em que o parâmetro  $\Delta SS$  diz respeito à soma dos quadrados dos resíduos. O teste de Mandel é utilizado quando se pretende comparar a qualidade de ajuste de um modelo com  $p$  parâmetros e  $n$  pontos em relação a outro modelo com  $p - q$  parâmetros, em que  $q$  representa o número de parâmetros a remover. As hipóteses a testar estão apresentadas nas equações 2.3.12 e 2.3.13.

$$H_0 : s_{fit}^2(n - p) \leq s_{fit}^2(n - p - q) \quad (2.3.12)$$

$$H_1 : s_{fit}^2(n - p) > s_{fit}^2(n - p - q) \quad (2.3.13)$$

$$TV = \frac{\frac{\Delta SS}{q}}{s^2(n-p-q)} \quad (2.3.14)$$

### 2.3.5 Teste de Cochran

O teste de Cochran identifica a existência de diferenças significativas entre as variâncias de grupos de  $n$  amostras com  $k$  réplicas, através da inspeção das suas variâncias. Os  $n$  dados analisados têm de ter sido escolhidos aleatoriamente de uma população e estarem organizados de uma forma dicotómica. Como regra de decisão é utilizada uma tabela específica para este teste, a Tabela de Cochran [49].

Para se poder aplicar este teste é necessário começar por determinar a variância das  $k$  réplicas de cada  $n$  amostras, de seguida identificar o valor máximo de variância obtida e por fim calcular a soma de todas as variâncias de forma a poder aplicar a equação 2.3.15 para o cálculo do valor teste.

A hipótese nula,  $H_0$ , refere a existência de homogeneidade da variância entre as  $n$  amostras, ou seja a não existência de diferenças significativas entre os valores das variâncias. O valor teste (TV) é dado pela equação 2.3.15.

$$TV(n, k) = \frac{s_{Max}^2}{\sum s_k^2} \quad (2.3.15)$$

Mais uma vez é necessário recorrer às tabelas de valores críticos (ANEXO 1, Tabela 4) para fazer a comparação entre o valor de TV calculado e o  $T_{crítico}(0.05, n, k)$  e retirar as conclusões adjacentes [45, 46].

### 2.3.6 Análise de Variância de fator único

A análise de variância, mais conhecida por ANOVA, é uma das técnicas estatísticas mais utilizadas e descreve um grupo de procedimentos estatísticos desenvolvidos por Sir Ronald Fisher usado para identificar diferenças entre, pelo menos duas médias num conjunto de dados que possam ser introduzidos e usados em programas informáticos. O teste estatístico computorizado é baseado na distribuição F que consiste numa distribuição contínua e cujo valor teste é obrigatoriamente superior ou igual a zero [49].

A ANOVA de fator único é a forma mais básica de análise de variância e utiliza-se para testar a veracidade da  $H_0$  numa situação envolvendo  $k$  amostras independentes com  $n$  amostras. A  $H_0$  afirma que todas as médias populacionais são iguais, enquanto que  $H_1$  evidencia a existência de pelo menos um valor de média diferente das outras  $k$  amostras. No entanto, no caso de  $H_1$  ser válida não é possível identificar qual das médias difere das outras [46].

Através da aplicação da ANOVA a variabilidade total da amostra ( $SS_T$ ) é devida nas suas duas componentes, a variabilidade entre grupos ( $SS_A$ ) e na variabilidade

dentro dos grupos ( $SS_{pe}$ ) de acordo com as equações 2.3.16 e 2.3.17. A variabilidade entre os grupos é importante como medida da variância entre as várias amostras, sendo esta a variabilidade afetada pela introdução de um fator externo (fator em estudo, A). A variabilidade dentro dos grupos é atribuída a fatores externos ao investigador, não podendo por isso ser controlado por ele, sendo considerada a variabilidade puramente aleatória ou erro residual.

$$SS_T = SS_A + SS_{pe} \quad (2.3.16)$$

$$s_T^2 = s_A^2 + s_{pe}^2 \quad (2.3.17)$$

A hipótese nula ( $H_0$ ) a testar refere que a dispersão devida ao fator A é inferior à dispersão devida a fatores aleatórios, o que indica a não influência do fator A nos resultados obtidos (equação 2.3.18). Por seu lado  $H_1$ , representada pela equação 2.3.19 conduz à conclusão de que o fator em estudo altera os resultados obtidos.

A estatística teste (TV) será a indicada na equação 2.3.20, em que os valores de  $SS_A$  e  $SS_{pe}$  são obtidos de acordo com as equações indicadas na tabela 2.11.

$$H_0 : s_a^2 \leq s_0^2 \quad (2.3.18)$$

$$H_1 : s_a^2 > s_0^2 \quad (2.3.19)$$

$$TV = \frac{s_a^2}{s_0^2} \leq F_{\alpha(n-1, n(k-1))}^u \quad (2.3.20)$$

Tabela 2.11: Tabela de fórmulas fundamentais para a obtenção do valor teste (TV) da ANOVA

Variabilidade	SS	g.l.	$\sigma^2$
Entre níveis	$SS_a = k \cdot \sum_{i=1}^n (\bar{x}_i - \bar{X})^2$	$n - 1$	$s_a^2 = \frac{SS_a}{(n-1)}$
Dentro dos níveis	$SS_{pe} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$n(k - 1)$	$s_{pe}^2 = \frac{SS_{pe}}{n(k-1)}$
Total	$SS_T = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^k (x_{ij} - \bar{X})^2$	$n \times k - 1$	$s_T^2 = \frac{SS_T}{(\sum_{i=1}^n k_i - 1)}$

Os parâmetros  $n_i$ ,  $\bar{x}_i$  e  $s_i^2$  representam o tamanho da amostra (número de níveis), a média e a variância da  $i$ -nésima amostra respetivamente, por seu lado  $\bar{X}$  representa a grande média e  $k$  o número de réplicas por nível.

O TV é de seguida comparado com o valor crítico do teste retirado da distri-

buição F (Anexo 1, Tabela 2 ( $\alpha = 0.01$ ) e Tabela 3 ( $\alpha = 0.05$ ) tendo em conta os graus de liberdade do numerador ( $n - 1$ ) e do denominador ( $n(k - 1)$ ) [44, 46].

Através da aplicação da ANOVA fator único também é possível estimar-se a variabilidade puramente aleatória (repetibilidade do equipamento), aplicando a equação 2.3.21 e de seguida determinar o coeficiente de variação com 2.3.22.

$$s_{pe} = \sqrt{SS_{pe}} \quad (2.3.21)$$

$$\%CV = 100 \times \frac{s_{pe}}{\mu} \quad (2.3.22)$$

A aplicação da ANOVA fator único tem de cumprir os seguintes pressupostos:

- cada amostra foi aleatoriamente escolhida da população normal padrão;
- as amostras são independentes umas das outras;
- tem de existir homogeneidade de variância entre as k amostras analisadas.

Se algum destes pressupostos for violado a confiabilidade do teste é gravemente afetada [46, 49].

### 2.3.7 Correlação e regressão

Duas medições obtidas nos mesmos  $n$  indivíduos estão associados se alguns valores de uma variável tendem a ocorrer mais frequentemente com alguns valores da segunda variável do que com outros valores dessa variável. A forma mais simples para analisar a relação entre duas variáveis quantitativas medidas nos mesmos  $n$  indivíduos é a utilização de gráficos de dispersão, mas para se ter uma ideia mais clara da possível relação entre as variáveis deve-se utilizar métodos estatísticos como o coeficiente de correlação e o método dos mínimos quadrados [50].

#### 2.3.7.1 Coeficiente de Correlação de Pearson

A correlação permite a comparação entre duas variáveis, dentro de uma mesma população, de modo a determinar a existência de alguma relação entre elas. No entanto a correlação não explica a razão pela qual essa relação existe, apenas indica a existência da mesma. As variáveis são representadas no eixo dos xx e eixo dos yy e, se dessa representação resultar um conjunto de pontos alinhados, pode-se afirmar que entre essas variáveis existe uma relação linear.

Permite também identificar a intensidade de relação entre as variáveis estudadas, em que um valor de r nulo indica a não existência de relação entre as variáveis, mas se tomar o valor +1 ou -1 significa que as duas variáveis representam na perfeição uma relação linear.

No entanto este método não é o mais indicado para prever uma relação matemática entre as duas variáveis, sendo neste caso a Regressão Linear o método mais apropriado [48, 45, 40].

O coeficiente de correlação de Pearson,  $r$  é calculado através da expressão representada na equação 2.3.23 e relaciona os desvios entre os valores obtidos e o valor médio de cada medição, sendo por isso uma medida adimensional que varia entre -1 e +1 [48, 45, 40].

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2(y - \bar{y})^2}} \quad (2.3.23)$$

### 2.3.7.2 Regressão Linear

A regressão linear é o método estatístico mais popular em todo o mundo. Existem várias formas de regressão (linear, não linear, simples, múltipla, paramétrica, não paramétrica, etc), mas a que se vai aprofundar devido ao seu interesse neste caso é a linear [44].

A correlação linear descreve uma relação entre variáveis contínuas, a regressão é um método estatístico que avalia a forma como uma variável independente influencia os resultados da variável dependente, sendo possível a formulação de uma relação matemática entre as elas. Ao contrário do coeficiente de correlação, a regressão linear tem como requisito prévio a existência de pelo menos uma variável independente.

Para se poder aplicar este método é necessário obedecer a alguns pré requisitos essenciais para garantia de obtenção de resultados corretos:

- os valores da variável independente (aqueles cujo analisador controla e que se assumem como estando corretos, não possuindo qualquer tipo de erro) têm de ser colocados no eixo dos  $x$  enquanto que no eixo dos  $y$  são colocados os valores correspondentes à variável dependente;
- a população em estudo tem de possuir distribuição normal (por esse motivo é muita vez utilizada a função logarítmica para normalizar a população em estudo e permitir a utilização do método da regressão linear);
- tem de se verificar homogeneidade da variância.

Aliada a estes pressupostos é fundamental que a regressão linear só seja utilizada no caso de existir uma correlação significativa entre as variáveis, verificada através do valor do coeficiente de correlação de Pearson [45, 48].

A regressão linear consiste no desenho de uma reta, através do método dos

mínimos quadrados<sup>18</sup>. Desta forma a equação da reta de regressão (2.3.24) toma o seguinte aspeto:

$$y = b_0 + b_1x \quad (2.3.24)$$

na equação 2.3.24,  $b_1$  e  $b_0$  são respetivamente o declive da reta e a ordenada na origem e são obtidos através das equações 2.3.25 e 2.3.26 [45, 48].

$$b_1 = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (2.3.25)$$

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n} \quad (2.3.26)$$

Após o cálculo de  $b_1$  e de  $b_0$ , aplica-se a expressão do valor teste, para ambos os valores, que de seguida é comparado com o valor crítico retirado da distribuição t-Student com  $(n - 2)$  número de graus de liberdade e a um nível de significância de 0.05 ou 0.01.

$$TV(b_0) = \frac{|b_0 - 0|}{\sigma_{b_0}} \quad (2.3.27)$$

$$TV(b_1) = \frac{|b_1 - 0|}{\sigma_{b_1}} \quad (2.3.28)$$

As conclusões obtidas através da aplicação do teste t emparelhado são menos fiáveis do que as obtidas pelo método em cima descrito, pois como se baseia numa média de diferenças pode levar a conclusões erradas e por esse motivo as conclusões obtidas através da aplicação da reta de regressão linear com o método dos mínimos quadrados vão sobrepor-se às obtidas pelo teste t emparelhado.

**Regressão linear multivariada** Embora existam imensos problemas envolvendo apenas uma única variável, na maior parte dos casos reais o que se verifica é o aparecimento de diversas. O modelo estatístico para a Regressão Linear Multivariada responde a problemas em que os dados observados não se resumem a um conjunto de valores, mas sim a  $k + 1$  variáveis.

O método dos mínimos quadrados, referenciado no ponto 2.3.7.2, pode ser utilizado para estimar os coeficientes de uma equação que descreva o modelo de regressão linear respetivo.

Para um problema com  $k$  predictores (variáveis), o modelo da regressão linear multivariada pode ser escrito através da equação 2.3.29. A variável  $Y$  pretende

<sup>18</sup>O método dos mínimos quadrados consiste na obtenção da reta que melhor se aproxime de todos os  $n$  pontos do gráfico. Para que isso ocorra é escolhida a reta que minimiza a soma dos quadrados dos resíduos, ou seja, das diferenças entre os valores estimados e os observados

predizer-se em função das outras restantes variáveis ( $X_1$  a  $X_k$ ), onde os parâmetros desconhecidos são representados por  $\beta$  e o valor  $\epsilon$  designa o erro aleatório.

O objetivo é estimar os valores dos mínimos quadrados ( $b_0, b_1, \dots, b_k$ ) correspondentes aos parâmetros desconhecidos  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_k$  de modo a obter a equação 2.3.30 que corresponde à equação de resposta e onde  $\hat{Y}$  é o valor previsto dos  $Y$  valores dados de  $X_1$  a  $X_k$ .

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \epsilon \quad (2.3.29)$$

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 X_1 + \dots + b_k X_k \quad (2.3.30)$$

Fazendo  $x_i = X_i - \bar{X}$  aliado ao facto de que  $b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}_1 - \dots - b_k \bar{X}_k$ , pode-se reescrever a equação de resposta de acordo com a expressão seguinte.

$$\hat{Y} = \bar{Y} + b_1 x_1 + \dots + b_k x_k \quad (2.3.31)$$

Para simplificar as fórmulas, as observações também podem ser expressas como desvios dos valores das médias correspondentes, isto é, através da definição matemática que indica que  $x_{im} = X_{im} - \bar{X}_i$  e  $y_m = Y_m - \bar{Y}$ . Desta forma os valores estimados dos  $k + 1$  parâmetros do modelo linear multivariado  $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \epsilon$ , pode ser obtido por meio da resolução de um conjunto de  $k + 1$  equações lineares. As equações referidas estão representadas de seguida:

$$b_1 \sum x_{1m}^2 + b_2 \sum x_{1m} x_{2m} + \dots + b_k \sum x_{1m} x_{km} = \sum x_{1m} y_m$$

$$b_1 \sum x_{1m} x_{2m} + b_2 \sum x_{2m}^2 + \dots + b_k \sum x_{2m} x_{km} = \sum x_{2m} y_m$$

$$\vdots$$

$$b_1 \sum x_{1m} x_{km} + b_2 \sum x_{2m} x_{km} + \dots + b_k \sum x_{km}^2 = \sum x_{km} y_m$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}_1 - b_2 \bar{X}_2 - \dots - b_k \bar{X}_k$$

Muitas vezes verifica-se um excesso do número de variáveis existentes num determinado modelo e por esse motivo é necessário selecionar as variáveis que mais influem na resposta final em detrimento das que pouco alteram a resposta, de forma a simplificar a equação de regressão. Para isso utilizam-se as matrizes de correlação entre as variáveis e a resposta obtida de modo a verificar quais as que possuem maior correlação com a resposta. Assim as mais influentes no processo são manti-

das na equação de regressão. Através de uma matriz de  $R^2$  consegue-se também quantificar a dependência da resposta em relação a determinada variável.

A resolução destas equações de forma simultânea apresenta-se como sendo complicada e envolve a aplicação da álgebra matricial. Mas através de um programa estatístico são facilmente resolvidas de forma a estimar os preditores pretendidos de forma correta, eficaz e acima de tudo rápida [43, 51, 52].

A partir do momento em que as variáveis mais influentes estão identificadas aplica-se um software estatístico apropriado de forma a poder obter uma tabela das estatísticas importantes como os somatórios, os somatório dos quadrados, os valores correspondentes ao produto entre as variáveis assim como a média de cada variável. Com o conhecimento destes valores é possível determinar os coeficientes de  $b_1$  a  $b_k$  que fazem parte da equação de regressão multivariada referida [43].

### 2.3.8 Cartas de Controle

As Cartas de Controlo (também conhecidas por Cartas de Shewhart), são a ferramenta principal no controlo estatístico da qualidade e permitem a análise de dados obtidos durante as inspeções aos produtos de forma a evidenciar e a distinguir as causas normais<sup>19</sup> e causas especiais<sup>20</sup> que dão origem a produtos defeituosos. Desta forma, o seu estudo, permite evidenciar alterações fora de controlo, assim como evitar falsos alarmes e evidenciar a necessidade de reavaliar todo o processo.

Através de métodos estatísticos é possível sintetizar um grande conjunto de dados recolhidos sobre o desenrolar de um determinado processo sendo que este reconhece sempre a existência de uma variação aleatória. A sua análise permite a identificação de variações que realmente afetam o desenvolvimento de todo o processo, sendo as denominadas anteriormente por causas especiais.

As Cartas de Controlo ainda hoje são usadas da maneira com Shewhart as desenvolveu nos Laboratórios Bell em 1928. Existem dois tipos de Cartas de Controlo, uma relativamente à posição (X-Chart) e outra relativamente à amplitude (R-Chart) [53].

**X-Chart** As X-Chart são constituídas por 5 linhas horizontais paralelas entre si, a Linha Superior de Controlo (UWL) e Linha Inferior de Controlo (LWL) que correspondem aos valores limites em que tudo parece normal (nos quais os limites de confiança são estabelecidos a 95%), a Linha Média (CL) que corresponde ao valor mais provável. A Linha Superior de Ação (UAL) e a Linha Inferior de Ação (LAL) são calculadas com os limites de confiança a 99%. É em função destas linhas que se

<sup>19</sup>As causas comuns são provocadas por variáveis de menor importância, mas cujos efeitos geralmente são crónicos, sendo de difícil diagnóstico e difíceis de remediar [43].

<sup>20</sup>As consequências observadas são devidas à entrada de uma variável nova de grande importância, por esse motivo o diagnóstico torna-se mais simples, assim como uma ação de remediação para a causa observada [43].

considera a alteração verificada como sendo aleatória ou sendo uma modificação das condições do processo e que tal fato tem de ser verificado. Para se desenhar uma X-Chart devem-se seguir as normas ISO 3534-1: 2006, ISO 3534-2:2006, a norma ISO 7870-1:2007, ISO 8258:2004 e ISO 7966:20047 que descrevem os seguintes passos [53]:

- o item de controle (característica a ser medida) tem de ser escolhido e realizadas  $k$  réplicas,
- o item escolhido deve ser medido em ocorrências sucessivas, sendo os valores que se obtêm a amostras em estudo ( $N = n x k$ );
- a média e o desvio padrão devem ser calculados através das equações e os valores máximos e mínimos identificados;
- o valor da média e os valores máximos e mínimos da amostra devem ser colocados na carta de controle;
- calcular as linhas limite de controlo para uma X-Chart e verificar se o processo está a decorrer sob controlo;
- se se observar um comportamento fora de controlo ou tendencioso as causas dos desvios devem ser analisadas e corrigidas [43, 53].

Deste modo para se determinar a Linha Média ( $\bar{X}$ ) para  $n$  amostras com  $k$  réplicas utiliza-se a equação 2.3.32, as Linhas de Controlo Superior (UWL) e Inferior (LWL) são obtidas através da equação 2.3.34. Com a equações 2.3.35 calcula-se as Linhas Superior Ação (UAL) e Inferior (LAL) e de seguida é elabora-se o gráfico com as linhas referidas e os dados amostrais. O passo seguinte é verificar a existência de alguma das situações consideradas como anómalas enumeradas no ponto 2.3.8.

$$CL = \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (2.3.32)$$

$$s_{\bar{x}_i} = \frac{s_r}{\sqrt{k}} \quad (2.3.33)$$

$$WL = CL \pm t_{0.05(n-1)}^b \times s_{\bar{x}_i} \quad (2.3.34)$$

$$AL = CL \pm t_{0.01(n-1)}^b \times s_{\bar{x}_i} \quad (2.3.35)$$

Um processo considera-se como sendo estável de acordo com o referenciado na Norma ISO 7966:2004 se se encontrar sob controlo estatístico e não der origem a

uma causa detetável não natural do processo. Desta forma ao se efetuar a análise a uma carta de controlo o que se procura são pontos que se encontrem fora dos limites de controlo dos gráficos. Assim sendo, um processo é considerado como não sendo estável se se verificar pelo menos um dos seguintes itens:

- um valor fora da AL;
- dois ou mais valores sucessivos fora da mesma linha de aviso (WL);
- em cinco valores seguidos verificarmos a ocorrência de quatro na zona intermédia;
- seis valores sucessivos com a mesma tendência crescente ou decrescente;
- numa sucessão de oito valores verificar que todos eles se encontram na zona intermédia do gráfico, sem ocorrerem na zona central;
- verificar que nove valores sucessivos se encontram numa das zonas centrais;
- ocorrência de catorze valores em ziguezague;
- quinze valores sucessivos em ambas as faixas centrais [54].

**R-Chart** As R-Chart são constituídas por 4 linhas horizontais paralelas entre si a Linha Central de Amplitudes ( $CL_R$ ), a Linha de Ação superior de Amplitudes ( $UAL_R$ ), a Linha de Aviso Superior de Amplitudes ( $UWL_R$ ) e a Linha de Ação Inferior de Amplitudes ( $LAL_R$ ). No caso da  $LAL_R$ , esta só aparece nas R-Charts se existirem mais de seis réplicas. Para se poder construir uma R-Chart deve-se determinar os limites de controlo através das equações 2.3.36, 2.3.37, 2.3.38 e 2.3.39:

$$CL_R = \bar{R} = \frac{\sum R_i}{n} \quad (2.3.36)$$

$$UAL_R = D_4 \bar{R} \quad (2.3.37)$$

$$UWL = \bar{R} + \frac{2}{3}(UAL_R - CL_R) \quad (2.3.38)$$

$$LAL_R = D_3 \bar{R} \quad (2.3.39)$$

Sendo que os valores  $D_3$  e  $D_4$  são obtidos a partir da tabela 6 do Anexo 1 e que dependem do número de réplicas efetuadas por amostra.

Numa R-Chart o que se procura são situações que estejam relacionadas com a precisão do processo, e desta forma, são consideradas como situações não conformes aquelas que:

- possuam um valor acima da  $UAL_R$ ;
- dois valores sucessivos acima da  $UWL_R$ ;
- sete ou mais valores sucessivos com a mesma tendência;
- sete ou mais valores consecutivos abaixo da  $CL_R$ .



## Capítulo 3

### *Procedimentos e materiais*

Este capítulo pretende referir as metodologias usadas para a recolha dos dados essenciais para a elaboração deste trabalho assim como todos os materiais necessários para a sua execução. Todos os parâmetros analíticos e métodos abordados de seguida foram previamente referidos no Capítulo 2. Todas as metodologias foram usadas dentro dos laboratórios de controlo de qualidade existentes na unidade fabril da Lactogal na Tocha, sempre com o maior rigor no que diz respeito a possíveis contaminações microbiológicas de acordo com a ISO 7212 de 2007 [55].

São ainda referidos o tratamento de resultados (a descrição da base de dados), alguns conceitos e notações que utilizámos neste trabalho.

#### **3.1 *Leite cru***

Todo o material utilizado durante todos os procedimentos foi devidamente esterilizado para garantir que não existisse contaminação do leite durante o momento da análise o que iria levar a falsos positivos. Durante a preparação dos reagentes e execução das técnicas foi garantida o máximo de esterilização através da utilização de uma chama do bico de Bunsen ou da utilização da câmara de fluxo laminar para garantir a não contaminação microbiológica das amostras assim como dos reagentes por elementos exteriores.

### 3.1.1 Contagem de microrganismos a 30 °C

Para se efetuar a contagem de microrganismos a 30 °C são necessárias várias placas de Petri, pipetas de vidro de 1 cm<sup>3</sup>, solução de Ringer<sup>1</sup> e meio de cultura MPCA<sup>2</sup>.

O método a realizar esta descrito na norma NP 459 de 1985 [20], na ISO 4833 de 2013 [56] e na ISO 6887 parte 4 de 2003 [57]. O procedimento para a contagem de microrganismos em placas foi efetuado de acordo com as normas referida e é considerado o método de referência para a contagem de microrganismos.

As amostras foram homogeneizadas num vortex e de seguida diluídas através da adição de uma solução salina inócua, solução de Ringer. Estas diluições estão representadas na figura 3.1.1 e foram efetuadas até à diluição -6 de modo a garantir que, pelo menos numa das placas de Petri se consiga obter uma contagem de microrganismos entre 30 e 300 colónias por ml de leite analisado. Entre cada diluição foi sempre feita uma agitação vigorosa no vortex.

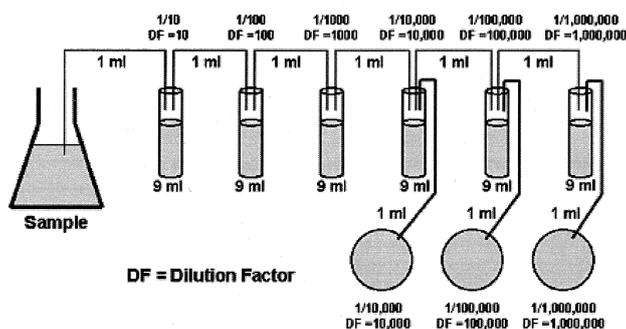


Figura 3.1.1: Diluição de amostras para análises microbiológica [26].

Depois de se efetuarem as diluições, foram retirados, de cada tubo de ensaio 1 cm<sup>3</sup> de amostra com uma pipeta de vidro e colocados em em placas de petri. De seguida acrescentou-se às placas um meio nutritivo específico para o leite, o MPCA e foram deixadas em repouso até solidificarem completamente. A placas já solidificadas foram então colocadas numa estufa a 30±1 °C durante 72 horas a incubar em estufas fornecidas pela Memert. Ao fim desse tempo contaram-se as colónias visíveis e determinou-se desta forma a carga microbiana existente na amostra analisada tendo em conta a diluição efetuadas. As amostras foram analisadas com pelo menos 3 diluições e em duplicado.

<sup>1</sup>Composição da solução de Ringer para leites e derivados: Cloreto de sódio (2.25g), cloreto de potássio (0.105 g), cloreto de cálcio (0.12g) hidrogenocarbonato de sódio (0.05g), água destilada 1000g

<sup>2</sup>Composição do MPCA: Peptona trísica de caseína (5.0 g), extrato de levedura desidratado (2.5g), glucose anidra (1.0g), ágar-ágar (12 a 18 g) água destilada (1000g)

### 3.1.2 D-COUNT

O equipamento usado é o modelo D-Count da Chemuxez distribuído pela Biomériux, assim como todos os reagentes utilizados (ChemSol A28, ChemChrome V14, CS14, Diluent II, CSR, IsoRed, Cleaning 5 e ChemSol S). Antes de ser utilizado para verificar a contaminação microbológica do leite cru, deve ser, como todos os equipamentos analíticos, previamente limpo e calibrado com o reagente específico (Solução Standart) indicado no manual do equipamento.

Todo o procedimento realizado está de acordo com o documento fornecido pelo laboratório responsável pela patente do equipamento.

O reagente ChemSol A antes de ser utilizado necessitou de um aquecimento num banho a  $37 \pm 2$  °C durante pelo menos 10 minutos. De seguida dos frascos contendo as amostras de leite cru a analisar foram retirados 100 µl de leite que foram de seguida colocados no interior de tubos de ensaio de 20 ml de uso específico do D-Count, tendo sido efetuadas amostras em triplicado. Do frasco de ChemSol A, inicialmente colocado no banho a 37 °C, foram retirados 900 µl de reagente e adicionados aos tubos de ensaio contendo as amostras de leite. Os tubos foram de seguida rolhados e os seus conteúdos foram homogeneizados no vortex e colocados num banho a  $37 \pm 2$  °C durante  $20 \pm 3$  minutos a incubar.

Os reagentes utilizados durante a análise foram preparados e colocados nos locais específicos correspondentes na zona de análise do D-Count, nPara além dos reagentes, foi necessário também colocar as soluções de lavagem, ChemSol S e Cleaning 5, nos locais adequados. No caso da ChemSol S o local correto é fora da zona de análise, enquanto que o Cleaning 5 foi colocado dentro.

Depois de se ter esgotado o período de incubação, os tubos de ensaio foram retirados do banho, novamente agitados vigorosamente no vortex e foram lhes retirados a tampa. Os tubos foram colocados então no local correto da zona de análise do D-Count e deu-se início à análise (figura 3.1.2).

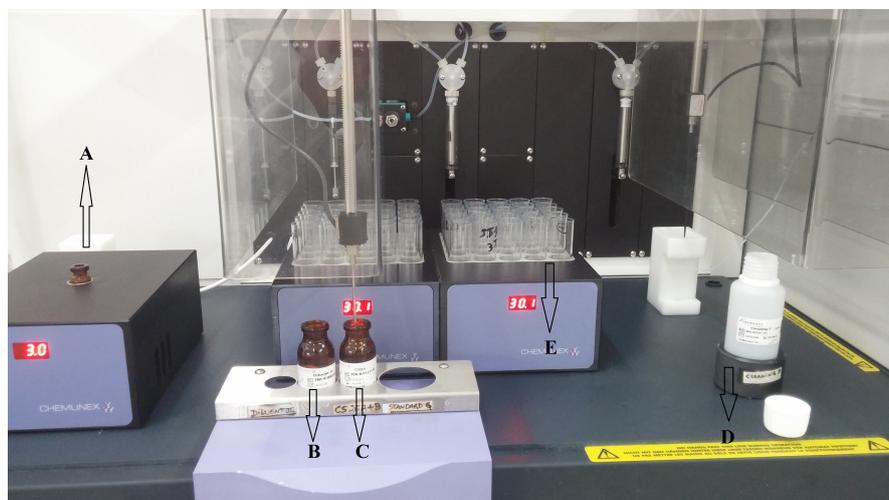


Figura 3.1.2: Distribuição de um dos reagentes utilizados pelos tubos de ensaio contendo o leite cru a analisar. (A)- ChemChromV14; (B)-Diluent II + CSR + IsoRed; (C)- CS14; (D)- Cleaning 5; (E)- Amostras a analisar

### 3.1.3 Prova do álcool

Para se efetuar este teste foi necessário proceder de acordo com a norma NP 453 [24] de 2002 que descreve todo o procedimento a ser efetuado. Para realizar esta prova foi necessário introduzir 5 ml de leite a analisar no interior de um tubo de ensaio esterilizado e de seguida adicionou-se 5 ml de álcool etílico a 80% (% v/v) com o auxílio de uma pipeta graduada ou de um dispensador automático. O tubo de ensaio foi então rolhado e invertido duas vezes. Se não se verificou a formação de coágulos, significa que o leite se encontrava apto a ser usado como matéria prima, se se verificou a formação de coágulos, foi necessário repetir o procedimento descrito nas linhas anteriores, utilizando álcool etílico a 75%. Nesta situação se foi verificado novamente a formação de coágulos o leite não foi aceite pela unidade fabril, mas se não coagulou este é aceite, mas com a indicação que coagulou a 80%. Por vezes há dificuldade de deteção da ocorrência dos coágulos, para isso sempre que houve dificuldade em concluir que houve ou não formação de coágulos, vazou-se o conteúdo do tubo de ensaio para uma caixa de Petri, agitou-se o recipiente vagarosamente, efetuando movimentos circulares, e retiraram-se as conclusões com mais clareza de acordo com o referido na secção 2.2.1.2 na página 28.

### 3.1.4 Teste da resazurina

O método realizado está descrito na norma NP 455 de 1983 [32]. A solução de resazurina foi preparada a partir de pastilhas de soluto fornecidas por Lovibond House e dissolvidas em 50 cm<sup>3</sup> de água destilada, conforme o descrito na embalagem.

Depois de preparada a solução foi colocada num frasco de vidro fosco e guardada no frio, tendo uma validade de dois dias. Para se realizar a prova da resazurina introduziram-se 10 cm<sup>3</sup> de leite a testar num tubo de ensaio com 1 cm<sup>3</sup> de solução de resazurina e, de seguida, o tubo foi rolhado e invertido duas vezes. O tubo foi então colocado num banho a 37± 0,5°C ao abrigo da luz durante 60 minutos. Passado esse tempo, o tubo de ensaio foi retirado do banho e com a ajuda do comparador Lovibond (figura 2.2.11) anotou-se o grau correspondente à cor obtida.

### 3.1.5 *Medição do pH do leite*

Para um leite ser aceite nos postos de receção da Lactogal é necessário que o leite possua um pH entre 6.6 e 6.8, para tal a medição do pH é um dos controlos primários. Antes de se efetuar a medição o medidor de pH deve ser limpo com uma primeira passagem de água destilada, seguida de álcool e por fim a limpeza do mesmo com papel absorvente. Estes cuidados devem-se ao fato do vidro ser um bom adsorvente e poder ter ao redor da membrana de vidro vestígios de leite que vão dar origem a erros e tempos elevados de leitura do equipamento.

O medidor de pH utilizado foi o 827 pH Lab da Metrohm (figura 2.2.13) foi calibrado de acordo com as instruções fornecidas pelo próprio equipamento com duas soluções tampão de pH 4 e pH 7 fornecidas pela AppliChem Panreac. Só depois de calibrado foi utilizado para medir o pH das amostras de leite.

### 3.1.6 *Determinação da acidez do leite*

Para se determinar a acidez do leite utilizaram-se dois métodos, o primeiro é o método Dornic que se baseia na determinação da acidez através da titulação ácido base tendo como indicador a fenolftaleína em que a mudança de cor de incolor para rosa dá como terminada a titulação e o segundo o método potenciométrico que utiliza o valor do pH no ponto de equivalência (pH=8.3) como valor de pH alvo para cessar a titulação.

#### 3.1.6.1 *Determinação da acidez através do método Dornic*

O método a realizar está descrito na norma NP 470 de 1983 [33]. Para se determinar a acidez do leite transferiu-se 10 cm<sup>3</sup> de leite cru a analisar para o interior de um erlenmeyer e adicionaram-se cinco gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 0.2%. De seguida procedeu-se à titulação do leite com uma solução de NaOH de concentração 0.111 M contida dentro de um acidímetro de Dornic (figura 2.2.12).

Enquanto se procedia à titulação o erlenmeyer era constantemente agitado com movimentos circulares até se verificar a alteração de cor da fenolftaleína de incolor

para rosa. O volume de NaOH gasto indicado na escala da bureta corresponde à acidez do leite analisado em °D.

### 3.1.6.2 Determinação da acidez pelo método potenciométrico

O método a realizar está descrito na norma NP 470 de 1983 [33]. A acidez do leite pode ser determinada de acordo com o procedimento indicado na norma referida ou então através da utilização de um potenciômetro, neste caso do 877 Titrino Plus da Metrohm (figura 3.1.3).



Figura 3.1.3: Sistema automático integrado (Potenciômetro Titrino Plus 877) para determinação do grau de acidez em amostras de leite

No primeiro caso, para utilizar um eletrodo, como o da figura 3.1.4, para dar indicação do pH no ponto de equivalência ( $\text{pH}=8.3$ ) da titulação usa-se uma solução de NaOH 0.111M como titulante num acidímetro de Dornic.



Figura 3.1.4: Eléctrodo Testo

Quando o ponto de equivalência era atingido dava-se como terminada a titulação e a acidez do leite correspondia ao valor de NaOH gasto durante a realização da mesma. Para se proceder à análise da acidez do leite com o potenciômetro, transferiam-se 10 cm<sup>3</sup> de leite para o interior de um copo contendo um agitador magnético, e dava-se início ao programa específico, previamente instalado e testado, para a determinação da acidez em graus Dornic. Quando era atingido o valor do pH no ponto de equivalência (pH=8.3) a titulação terminava e no visor do potenciômetro era apresentado o valor da acidez do leite analisado em °D.

Todos os equipamentos utilizados foram calibrados, de acordo com as instruções dos fornecedores, utilizando duas soluções tampão de pH 4 e pH 7, fornecidos pela AppliChem Panreac.

## 3.2 *Biomilk*

O método utilizado para a quantificação da lactose em leites com reduzido teor neste dissacarídeo é relativamente recente, data de 2013 e foi implementado na Lactogal no período que decorreu este projeto, tendo sido desenvolvido e aplicado no decorrer do mesmo. Para além da implementação do método também foi realizada a formação aos colaboradores da empresa que iriam de futuro trabalhar com o equipamento.

Durante o meu estágio foram analisados vários lotes de leites 0% lactose assim como leites com teores reduzidos de lactose, para garantir o controle de qualidade dos mesmo no que diz respeito as concentrações em lactose de cada tipo de leite.

### 3.2.1 *Análise de leites com concentrações reduzidas de lactose*

O equipamento de leitura de lactose é denominado por Biomilk (figura 2.2.16), foi fornecido pela Biolan MicroBiosensores assim como o eletrodo de trabalho (Biosensor) e todos os reagentes utilizados para preparar as soluções. Os reagentes fornecidos estão todos sob a forma de sólido e para serem utilizados têm de ser preparados na laboratório sob a forma de solução aquosa, de acordo com as instruções do fabricante. O reagente principal para todo o desenvolvimento do método é denominado de Standart Material (SM) e teve de ser preparado com 24 horas de antecedência antes de ser utilizado, assim como o biosensor.

Os reagentes RCLAC 1 e RCLAC 2 são os padrões de calibração do equipamento que são utilizados para verificar a correta relação entre o padrão de lactose conhecido e o sinal instrumental fornecido. Estes reagentes, que se encontram inicialmente no estado sólido, tiveram de ser hidratados com SM e de seguida prepararam-se as soluções usadas durante a ativação e calibração do biosensor e do equipamento. Como se pretende analisar dois intervalos bem distintos de concentração em lactose é necessário a utilização de soluções padrão com concentrações em lactose diferentes para cada caso, de forma a obter duas curvas de calibração distintas, uma para a concentração máxima de 200 mg/l e a outra para uma concentração máxima de 6.0 g/l, cujos valores estão indicados nas tabelas 3.1 e 3.2.

### 3.3. TESTES ESTATÍSTICOS

## CAPÍTULO 3. PROCEDIMENTOS E MATERIAIS

Tabela 3.1: Preparação das soluções utilizadas para a quantificação da lactose em leites com concentração em lactose inferior a 200 mg/l

	<b>Preparação das soluções</b>
<b>Padrão de Medida</b>	7.5 ml de SM 2.0 ml de RCLAC 1 0.5 ml de RCLAC 2
<b>Padrão de Calibração LAC 1</b>	4.0 ml de SM 1.0 ml de RCLAC 1
<b>Padrão de Calibração LAC 2</b>	9.5 ml de SM 0.5 ml de RCLAC 2

Tabela 3.2: Preparação das soluções utilizadas para a quantificação da lactose em leites com concentração em lactose inferior a 6 g/l

	<b>Preparação das soluções</b>
<b>Padrão de Medida</b>	8.3 ml de SM 0.2 ml de RCLAC 1 1.5 ml de RCLAC 2
<b>Padrão de Calibração LAC 1</b>	4.9 ml de SM 1 0.1 ml de RCLAC
<b>Padrão de Calibração LAC 2</b>	8.5 ml de SM 1.5 ml de RCLAC 2

Os valores de calibração de  $r$  e  $m$  obtidos durante a mesma foram superiores aos valores mínimos exigidos pelo equipamento ( $r > 0.9990$  e  $m > 6000$ ) e por esse motivo pode-se dar início à quantificação da lactose existente nas amostras de leite.

Para se proceder à análise de uma amostra teve de se realizar um passo prévio denominado por “Pré-Tratamento”. No caso dos valores de lactose estarem dentro dos intervalos de 0-6 g/L foi necessário também efetuar o passo de “Diluição” antes de se realizar o pré-tratamento da amostra. Para se efetuar a diluição da amostra teve-se que misturar 1 mL de leite a analisar com 9 mL de SM e agitar bem, só depois se pode realizar o pré-tratamento da amostra que consistia na introdução de 5 mL de amostra num tubo de pré-tratamento, seguido de agitação até que a amostra e o carvão do interior do tubo estivessem bem misturado. Após o pré-tratamento as amostras de leite com baixo teor em lactose foram analisadas num período máximo de duas horas, pois depois desse período deixavam de ser viáveis para análise. Foram realizadas sempre três réplicas de cada amostra.

### 3.3 Testes Estatísticos

Como já foi referido na secção 2.3 na página 43, os testes estatísticos são uma ferramenta da estatística inferencial que permitem a verificação de conjeturas efetuadas acerca de dados experimentais retirados durante um estudo. Através da aplicação

### 3.3. TESTES ESTATÍSTICOS CAPÍTULO 3. PROCEDIMENTOS E MATERIAIS

destes testes pode-se afirmar a veracidade de uma observação, tendo como aliado um suporte matemático forte. Todas as conclusões retiradas da aplicação dos testes seguintes estão de acordo com os pontos 2.3 e 2.3.1 sendo que os valores críticos são retirados das tabelas respectivas do Anexo 1.

#### **3.3.1 Avaliação de valores discrepantes**

**Teste de Grubbs** Para a identificar a existências de valores discrepantes de posição (outliers de posição) aplica-se o Teste de Grubbs aos dados amostrais. A veracidade da  $H_0$  depende do valor do TV (equação 2.3.2 na página 49) calculado em relação ao valor crítico de Grubbs retirados da tabela específica que se encontra no ANEXO A. Se  $TV < T$  crítico, considera-se  $H_0$  como válida, ficando os dados amostrais validados no que diz respeito a outliers, caso contrário, o valor suspeito de ser outlier é retirado e aplica-se de novo a expressão do cálculo do TV para o teste de Grubbs. Os dados amostrais só ficam validados quando se verificar a veracidade de  $H_0$ .

**Teste de Cochran** A aplicação do Teste de Cochran permite verificar a homogeneidade de variância dos dados amostrais através da inspeção de outliers de dispersão. Um conjunto de dados amostrais possui homogeneidade da variância se se verificar que o TV calculado for inferior ao T crítico obtido a partir da distribuição F como já foi referido no ponto 2.3.5 na página 52

A aplicação deste teste é de extrema importância para a aplicabilidade de testes como a ANOVA cujos pressupostos de aplicação exige a homogeneidade da variância.

**Teste de Mandel** O Teste de Mandel permite a identificação de outliers de variância que ocorrem durante o ajuste da reta de regressão entre valores de duas amostras relacionadas. O cálculo do TV (equação 2.3.14) e posterior comparação com o valor crítico indicado na Tabela 3, Anexo 1, retirado da distribuição F. A exclusão deste tipo de valor discrepante permite a obtenção de modelos de ajuste entre variáveis com maior rigor.

#### **3.3.2 Comparação direta de resultados**

**ANOVA** A Análise de Variância permite verificar a influência que determinado fator em estudo tem sobre os resultados obtidos em  $k$  amostras independentes com  $n$  amostras. A variabilidade da amostra é decomposta na variabilidade resultante da introdução do fator em estudo e na variabilidade puramente aleatória. Através do output de programas informáticos é possível determinar a variabilidade puramente

### 3.3. TESTES ESTATÍSTICOS CAPÍTULO 3. PROCEDIMENTOS E MATERIAIS

aleatória, que corresponde à repetibilidade de medições, assim como o coeficiente de variação se se aplicar as equações referidas nos pontos 2.3.21 e 2.3.22 na página 54.

**Teste t emparelhado** Quando se pretende comparar duas médias obtidas a partir da análise dos mesmos  $n$  elementos por meio de dois métodos distintos pode-se utilizar o teste t emparelhado. A veracidade da  $H_0$  leva à conclusão que os dois métodos aplicados durante as análises levam a resultados estatisticamente concordes sendo por isso equivalentes. A aplicação da equação indicada no ponto 2.3.11 na página 51 permite o cálculo do TV. A posterior comparação com o valor crítico retirado da distribuição t-student bilateral (Tabela 1, Anexo 1) permite a verificação da concordância entre os valores obtidos a partir da aplicação de um método de análise novo em relação ao método de referência.

**Regressão Linear** A Regressão Linear ou também conhecida por função de recuperação permite averiguar se determinado método de análise referência pode ser substituído por outro procedimento. A comparação dos valores dos parâmetros  $b_0$  e  $b_1$  obtidos através da aplicação do métodos dos mínimos quadrados com os valores de referencia 0 e 1, permite o cálculo do TV (equações 2.3.27 e 2.3.28 na página 56, respetivamente). Os valores críticos deste método seguem uma distribuição t-Student bilateral (Anexo 1, Tabela 1). Para se poder aplicar este método estatístico é necessário a análise das mesmas  $n$  amostras utilizando os procedimentos a analisar.

**Regressão Multivariada** Através da aplicação da regressão multivariada é possível a obtenção de equações que permitem uma relação entre as  $k$  variáveis (predictores) e a resposta verificada (2.3.29). Através da elaboração de uma matriz de correlação entre as variáveis é possível identificar quais são os predictores mais influentes no valor da resposta, e de seguida, através de modelação informática, é possível a obtenção da equação que relaciona os predictores com a resposta.

**Cartas de controle** Para se poder elaborar uma carta de controlo é necessário a análise de  $n$  amostras com  $k$  réplicas num determinado intervalo de tempo. De seguida são aplicadas as equações referidas no ponto 2.3.8 na página 58 para a obtenção das linhas central, de aviso e ação, superiores e inferiores.

3.3. TESTES ESTATÍSTICOS CAPÍTULO 3. PROCEDIMENTOS E MATERIAIS

## Capítulo 4

# *Resultados e discussão*

Neste capítulo pretende-se apresentar os resultados apurados durante o estágio nos laboratórios da Lactogal assim como os dados obtidos através da aplicação das ferramentas da qualidade aos valores obtidos experimentalmente.

### 4.1 *Leite cru*

#### 4.1.1 *Repetibilidade do Titrino Plus 877*

O Titrino Plus 877 é utilizado para medir a acidez de um leite em °D e começou a ser utilizado durante a minha presença nos laboratórios da Lactogal S.A.. Por essa razão foi necessário analisar parâmetros como a repetibilidade (calculando a variabilidade puramente aleatória, o coeficiente de repetibilidade) e a sua aplicabilidade para substituir o método de referência já descrito no ponto 2.2.1.2 na página 33.

O Titrino Plus 877 iria ser utilizado de futuro para medir a acidez tanto do leite cru como do leite como produto acabado, e por esse motivo foi determinada a acidez, em °D, consoante o descrito em 3.1.6.2, de amostras iguais de ambos os tipos de leite sob a mesmas condições para avaliar unicamente o fator equipamento. Os valores obtidos durante as medições efetuadas estando compilados nas tabelas 4.1 e 4.2. Os parâmetros de repetibilidade, para ambos os tipos leites, foram calculados utilizando alguns dos testes estatísticos referenciados na secção 2.3 na página 43.

Tabela 4.1: Acidez (°D) de 2 amostras de leite UHT “Celta Meio Gordo” do mesmo lote com 5 réplicas

Amostras	Réplicas				
	1	2	3	4	5
<i>Celta 1</i>	14.2	14.1	14.1	13.9	13.9
<i>Celta 2</i>	13.9	13.7	14.0	14.0	13.8

Tabela 4.2: Acidez (°D) de 2 amostras de leite cru iguais com 5 réplicas

Amostras	Réplicas				
	1	2	3	4	5
<b>Cru 1</b>	13.5	13.6	13.5	13.5	13.6
<b>Cru 2</b>	13.7	13.6	13.7	13.5	13.5

O teste de Grubbs foi aplicado a todos os valores obtidos durante a análise tendo-se constatado que, em todos os casos, o valor crítico para 5 réplicas (1.72), retirado da tabela 1 do anexo A, era superior ao TV do  $G_{max}$  e  $G_{min}$  calculado (através das equações 2.3.5 e 2.3.6) estando por isso as amostras validadas no que diz respeito a outliers.

Para se averiguar a possibilidade de utilização da ANOVA, teve que se verificar primeiramente a existência de homogeneidade da variância e para isso utilizou-se o Teste de Cochran, desta forma determinou-se o valor de TV ( 2.3.15 na página 52) para os dados recolhidos para o leite cru (0.77) e para o Celta (0.51). Tendo-se verificado que ambos os valores eram inferiores ao valor crítico (0.91) a um grau de significância de 0.05 para 2 amostras com 5 réplicas, retirado da tabela 2 do anexo A ,as amostras encontravam-se validadas para a aplicação da ANOVA.

A avaliação ANOVA dos resultados permitiu obter um valor de teste TV = 3.66 que corresponde ao valor de prova de 0.092, sugerindo deste modo que a hipótese nula é válida. Assim sendo, com base nestes resultados conclui-se que eles são estatisticamente concordantes e respectiva incerteza aleatória é de 0.13. Com base nesta estimativa da dispersão (0.13), as amostras com estimativas centrais 14.04 (Celta 1) e 13.88 (Celta 2) são obtidas com incertezas relativas (%CV ) da ordem de 1%.

No que concerne aos dados obtidos pela análise do leite cru também se pode afirmar que a hipótese nula é válida (TV= 1.38, com valor prova de 0.27), sendo o valor da incerteza aleatória de 0.08. Os dados obtidos para a análise da acidez do leite cru levaram a um valor de média e desvio padrão de 13.5(0.1) e 13.6(0.1) respetivamente para as amostras Cru 1 e Cru 2. As incertezas relativas associadas a cada medição foram de 0.6% para ambas as amostras analisadas.

#### 4.1.2 Repetibilidade do eletrodo Testo

O eletrodo Testo é específico para medir o pH de produtos lácteos usado no processo de Controlo da Qualidade e pretende-se determinar a repetibilidade do equipamento quando é utilizado durante o método de determinação da acidez do leite em °D. Foram analisados assim 2 tipos de leites distintos, leite “Celta sem Lactose Meio Gordo” e leite cru, tendo-se obtido os valores evidenciados nas tabelas 4.3 e 4.4.

Tabela 4.3: Acidez ( $^{\circ}$ D), obtida com o elétrodo Testo, de 2 amostras de leite UHT “Celta sem Lactose Meio Gordo” iguais com 5 réplicas

Amostras	Réplicas				
	1	2	3	4	5
<b>Celta 1</b>	13.5	14.0	14.0	13.5	14.0
<b>Celta 2</b>	13.5	14.0	13.5	14.0	14.0

Tabela 4.4: Acidez ( $^{\circ}$ D), obtida com o elétrodo Testo, de 2 amostras de leite cru iguais com 5 réplicas

Amostras	Réplicas				
	1	2	3	4	5
<b>Cru 1</b>	14.0	14.0	13.5	14.0	13.5
<b>Cru 2</b>	13.5	13.5	14.0	13.5	14.0

Aplicando o teste de Grubbs referido verificou-se a não existência de outliers nos valores medidos, pois os valores obtidos para o referido teste foram inferiores ao valor crítico de Grubbs (1.72). No que concerne à aplicação do Teste de Cochran constatou-se que os valores obtidos de TV para o leite cru e Celta eram iguais a 0.50 e inferiores ao valor crítico (0.91).

Tendo-se verificado a existência de homogeneidade procedeu-se à aplicação da ANOVA fator único para cada conjunto de amostras, sendo o valor de 100% em ambas as amostras. A variabilidade puramente aleatória foi de 0.27 para ambas as amostras Celta e Cru e os valores das incertezas relativas para ambas as determinações foram também determinados, sendo estes da ordem dos 2%. Assim sendo para o leite Celta sem Lactose Meio Gordo os valores médios e os desvios padrão para as amostras Celta 1 e 2 foram iguais a 13.8(0.3) e para as amostras de leite cru os valores foram de 13.7(0.3) para ambas. O valor prova obtido durante a aplicação das duas ANOVAs revelou um valor de 100%, o que indica que o fator em estudo não influi nos resultados obtidos.

#### 4.1.3 Comparação de métodos (Testo vs Titrino)

Um dos métodos de referência para a determinação da acidez do leite em  $^{\circ}$ D é a utilização de um elétrodo para determinar o ponto final da titulação ao se atingir o pH de 8.3. Neste caso o que se pretendia verificar era se os valores de acidez obtido pelo método referência, utilizando um elétrodo TESTO, eram estatisticamente concordantes com os obtidos através do uso do potenciômetro Titrino Plus 877, sendo esta a hipótese nula a estudar. Assim sendo foram analisados 12 amostras de leite tendo-se obtido os valores indicados na tabela 4.5.

Tabela 4.5: Acidez(°D) de 12 amostras de leite cru obtidas pelo método de referência (elétrodo TESTO) e pelo Titrino Plus 877

<b>Amostra</b>	<b>Elétrodo Testo</b>	<b>Potenciómetro Titrino</b>
<b>01</b>	13.8	14.2
<b>02</b>	14.0	14.1
<b>03</b>	14.0	14.1
<b>04</b>	14.0	13.9
<b>05</b>	14.0	13.9
<b>06</b>	13.8	13.9
<b>07</b>	14.0	13.7
<b>08</b>	13.8	14.0
<b>09</b>	13.8	14.0
<b>10</b>	14.0	13.8
<b>11</b>	14.0	14.0
<b>12</b>	13.8	13.7

A aplicação do teste t emparelhado levou à obtenção de um valor teste de 0.44, sendo o valor de prova de 0.667, superior portanto a 0.05, o que indica a aceitação de  $H_0$  como válida.

A aplicação da função de recuperação levou à obtenção dos valores de 16.13(6.65) e -0.16(0.48) respetivamente para  $b_0$  e  $b_1$ . Ao se realizar a comparação com os respetivos valores de referência  $b_0 = 0$  e  $b_1 = 1$  os valores teste obtidos foram de 2.43 e 2.42 respetivamente. Tendo em conta o valor crítico obtido pela distribuição t-Student bilateral, com um nível de significância de 0.05 e com 10 g.l., foi inferior (2.23) ao TV em ambos os casos, mas a um nível de 0.01 o valor crítico (3.17) já se apresentava superior, indicando que a hipótese nula considerada era válida. Os valores prova obtidos foram de 0.04 que se encontram no intervalo de dúvida [0.01;0.05], mas como se encontram mais próximos do limite máximo, permitem assumir a validade de  $H_0$ . Assim sendo, aos dois métodos analisados não são atribuídos erros nem sistemáticos nem proporcionais, sendo por isso estatisticamente concordantes.

#### 4.1.4 D-Count

O “D-Count”, como já foi referido na secção 2.2.1.1 na página 24, é um equipamento de citometria de fluxo utilizado para a determinação quantitativa da contaminação do leite. Pretendia-se avaliar parâmetros como a variabilidade puramente aleatória e o coeficiente de variação do equipamento, assim como efetuar a comparação dos resultados obtidos através deste método em relação ao método de referência utilizado mencionado em 2.2.1.1.

#### 4.1.4.1 Repetibilidade

Para avaliar a repetibilidade do equipamento foram analisados 2 amostras de um mesmo leite tendo sido efetuadas 7 réplicas sob as mesmas condições de forma a que a único fator a estudar fosse o equipamento. Os valores obtidos encontram-se compilados na tabela 4.6.

Tabela 4.6: Contagem de microrganismos de 2 amostras de leite cru com 7 réplicas

<i>Réplicas</i>	$\times 10^4$ (UFC/ml)	
	<i>Amostra 1</i>	<i>Amostra 2</i>
<b>01</b>	3.97	3.82
<b>02</b>	3.64	4.47
<b>03</b>	4.29	3.73
<b>04</b>	4.11	3.84
<b>05</b>	4.73	4.32
<b>06</b>	3.87	3.85
<b>07</b>	4.70	3.91

O teste de Grubbs foi aplicado aos valores compilados da tabela 4.6 tendo sido calculados os valores de  $G_{max}$  e  $G_{min}$  para cada amostra. Verificou-se que o valor  $G_{min}$  para a amostra 1 e 2 foram de 1.33 e 0.91, respetivamente e os de  $G_{max}$  foram 1.32 para a amostra 1 e 1.69 para a amostra 2. Visto que o valor crítico de Grubbs, obtido a partir da análise da Tabela 1 do anexo A, para duas amostras com sete réplicas é de 2.02, ou seja superior, pode-se afirmar que não existem outliers na amostra analisada.

A viabilidade de aplicação da ANOVA foi testada com a aplicação do Teste de Cochran para a verificação da homogeneidade da variância. Tendo em conta que o valor teste obtido (0.68) foi inferior ao valor crítico retirado da tabela 2 do Anexo A, para 2 amostras com 7 réplicas (0.85), comprovou-se a aplicabilidade da ANOVA fator único.

A aplicação da ANOVA aos dados amostrais revelou um TV de 0.68, sendo o valor prova de 0.32, indicando portanto a veracidade da hipótese nula, sendo os resultados obtidos estatisticamente concordantes. As amostras das estimativas centrais  $4.19 \times 10^4$  ( $4.13 \times 10^3$ ) e  $3.99 \times 10^4$  ( $2.84 \times 10^3$ ) UFC/ml para a amostra 1 e 2, respetivamente, foram obtidas com incertezas relativas da ordem dos 9%. A incerteza puramente aleatória associada foi de  $3.55 \times 10^3$ .

#### 4.1.4.2 Comparação métodos: Placas vs "D-Count"

No sentido de se proceder à comparação entre os valores obtidos para a contaminação do leite cru utilizando a citometria de fluxo (D-Count) e o método de referência foram analisadas 80 amostras de leite, simultaneamente, pelos 2 processos.

Aplicou-se a função logaritmo<sup>1</sup> aos valores obtidos através dos dois métodos, valores esses compilados na tabela 4.7 de forma a facilitar a normalização da distribuição.

Tabela 4.7: Contagem da contaminação microbiana de várias amostras de leite.

	Log (Placas)	Log (D-Count)		Log (Placas)	Log (D-Count)		Log (Placas)	Log (D-Count)
<b>a.01</b>	6.83	7.34	<b>a.28</b>	6.81	7.11	<b>a.55</b>	5.07	5.39
<b>a.02</b>	6.15	5.86	<b>a.29</b>	6.82	7.04	<b>a.56</b>	4.59	4.83
<b>a.03</b>	5.40	4.76	<b>a.30</b>	6.66	7.00	<b>a.57</b>	4.80	5.36
<b>a.04</b>	5.82	5.36	<b>a.31</b>	6.79	7.28	<b>a.58</b>	5.93	6.30
<b>a.05</b>	7.47	7.75	<b>a.32</b>	6.92	7.31	<b>a.59</b>	5.65	5.16
<b>a.06</b>	7.57	7.79	<b>a.33</b>	6.72	7.23	<b>a.60</b>	5.59	5.50
<b>a.07</b>	7.26	7.73	<b>a.34</b>	6.60	6.64	<b>a.61</b>	4.23	4.23
<b>a.08</b>	7.08	7.67	<b>a.35</b>	6.65	6.47	<b>a.62</b>	6.58	6.90
<b>a.09</b>	6.11	6.45	<b>a.36</b>	6.57	6.65	<b>a.63</b>	5.07	5.29
<b>a.10</b>	6.88	7.24	<b>a.37</b>	6.35	6.59	<b>a.64</b>	4.93	5.36
<b>a.11</b>	6.56	7.04	<b>a.38</b>	6.26	6.66	<b>a.65</b>	5.34	5.80
<b>a.12</b>	4.57	4.30	<b>a.39</b>	6.40	6.25	<b>a.66</b>	4.15	4.11
<b>a.13</b>	4.84	4.49	<b>a.40</b>	6.41	5.97	<b>a.67</b>	4.66	5.03
<b>a.14</b>	4.79	4.40	<b>a.41</b>	4.83	4.79	<b>a.68</b>	4.75	4.98
<b>a.15</b>	4.75	4.62	<b>a.42</b>	5.09	4.75	<b>a.69</b>	4.25	4.71
<b>a.16</b>	4.48	4.49	<b>a.43</b>	4.36	4.20	<b>a.70</b>	4.54	4.56
<b>a.17</b>	4.60	4.49	<b>a.44</b>	4.70	4.49	<b>a.71</b>	5.69	6.28
<b>a.18</b>	4.49	4.36	<b>a.45</b>	4.61	5.04	<b>a.72</b>	4.86	4.19
<b>a.19</b>	4.53	4.56	<b>a.46</b>	4.85	4.72	<b>a.73</b>	4.74	4.98
<b>a.20</b>	4.52	4.10	<b>a.47</b>	5.20	5.13	<b>a.74</b>	5.33	5.57
<b>a.21</b>	4.54	4.39	<b>a.48</b>	4.11	3.85	<b>a.75</b>	3.69	3.73
<b>a.22</b>	4.71	4.66	<b>a.49</b>	5.36	5.82	<b>a.76</b>	4.59	4.96
<b>a.23</b>	4.53	4.47	<b>a.50</b>	4.83	4.64	<b>a.77</b>	4.66	4.97
<b>a.24</b>	5.15	4.91	<b>a.51</b>	4.75	4.52	<b>a.78</b>	5.21	5.26
<b>a.25</b>	4.94	4.78	<b>a.52</b>	4.85	4.91	<b>a.79</b>	4.50	4.58
<b>a.26</b>	4.62	4.58	<b>a.53</b>	4.15	4.00	<b>a.80</b>	4.69	4.94
<b>a.27</b>	4.49	4.29	<b>a.54</b>	5.40	5.61			

A  $H_0$  a testar refere a concordância estatística entre os dois métodos de contagem aplicados. Desta forma e, por aplicação da equação 2.3.11 na página 51, obteve-se um valor teste de 2.07 e um valor prova de 4.2% que, embora se encontre no intervalo de dúvida está mais próximo do limite superior, e assim o teste apoia a veracidade da  $H_0$  ou seja, os métodos utilizados são equivalentes. Para confirmar esta constatação, o TV obtido foi comparado com os valores críticos da distribuição t-Student (retirados da tabela 5 do Anexo A) para o teste com 79 g.l., a um grau de significância de 0.05 (1.99) e a um grau de significância de 0.01 (2.64), sendo por isso a  $H_0$  considerada como válida considerando o menor grau de significância.

<sup>1</sup>Nos processos biológicos é muitas vezes aplicada a função logarítmica aos valores obtidos para facilitar a normalização da distribuição e posterior aplicabilidade dos testes estatísticos [44].

Aplicando de seguida a função de recuperação verificou-se que as estimativas obtidas para  $b_0$  e para  $b_1$  são, respetivamente de  $-0.55(0.19)$  e  $1.12(0.03)$ . Ao se calcular os valores de TV respetivos verificou-se que estes (3.00 e 3.44, respetivamente) eram superiores aos valores críticos retirados da distribuição t-Student com 78 g.l. com um grau de significância de 0.05 (1.99) e 0.01 (2.64), sendo o valor de prova de 0.64%, inferior a 1%, logo a  $H_0$  não pode ser aceite como válida, sendo a hipótese alternativa (os dois métodos não são concordantes) considerada como sendo verdadeira.

O gráfico que descreve a reta de regressão obtida para os dados da tabela 4.7 na página anterior possui um coeficiente de correlação de 0.966 e encontra-se na figura 4.1.1.

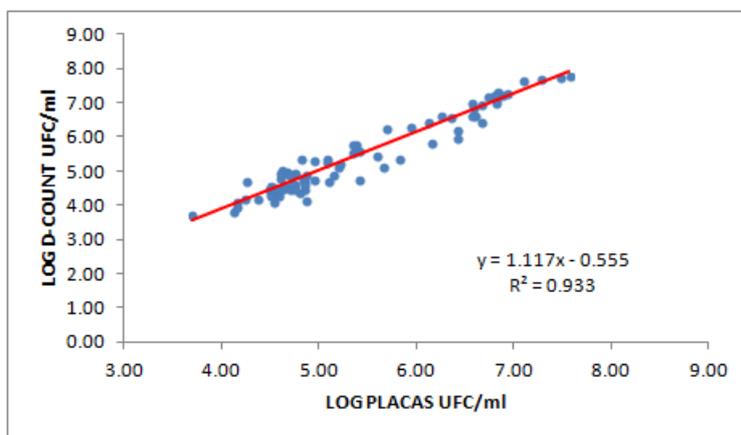


Figura 4.1.1: Reta de Regressão de Log(D-Count) em função de Log(Placas) para 80 amostras

Ao se realizar a análise ao gráfico de barras dos resíduos representado pela figura 4.1.2, verificou-se a existência de alguns valores discrepantes em relação aos restantes que poderiam ser um indício destes valores serem outliers. Através da aplicação do Teste de Mandel para rejeição de outliers, os valores correspondentes às amostras a.02, a.03, a.04, a.35, a.40, a.57, a.59, a.69, a.71 e a.72 foram retiradas da amostragem inicial e a função de recuperação foi aplicada de novo, agora apenas para 70 amostras.

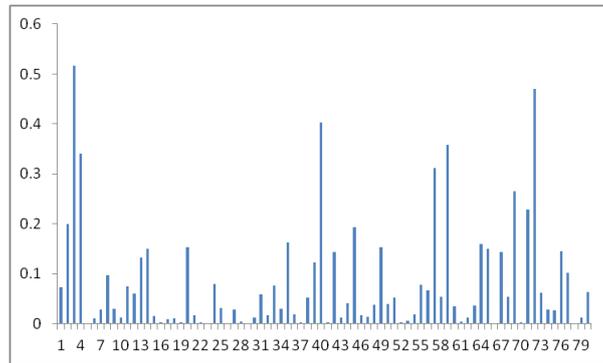


Figura 4.1.2: Gráfico de barras dos resíduos obtidos pelo método dos mínimos quadrados para as 80 amostras

Após a exclusão dos valores indicados observou-se um aumento no coeficiente de regressão da reta, tendo este passado de 0.966 para 0.983, o que indica que a alteração efetuada surtiu efeito e que os valores aproximam-se mais da reta.

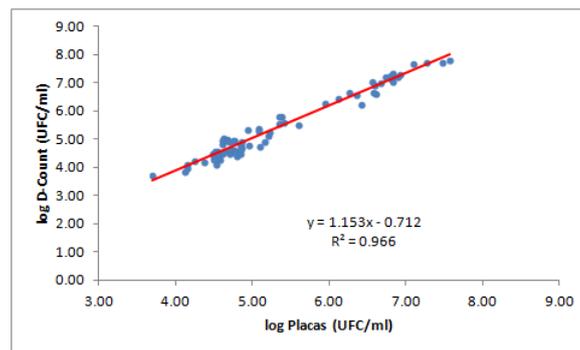


Figura 4.1.3: Reta de Regressão para 70 amostras

Os parâmetros obtidos para  $b_0$  e  $b_1$  foram de  $-0.71(0.14)$  e  $1.15(0.03)$  respectivamente e os TV respectivos de 4.99 e 5.82. Sendo os valores críticos para o teste t-student bilateral com 68 g.l. inferiores ao TV a um nível de significância de 0.05 e 0.01 (2.00 e 2.65, respectivamente), a  $H_0$  teve de ser novamente rejeitada. Ao se realizar uma nova análise ao gráfico de colunas dos resíduos representado na figura 4.1.4, não se verificou a existência de grandes discrepâncias entre os valores e desta forma foi considerado que não existiriam mais outliers. Conseqüentemente concluiu-se que os dois métodos não eram estatisticamente concordantes e que assim sendo teria de se efetuar uma correção aos valores obtidos pelo equipamento de citometria de fluxo, D-Count, através da aplicação da equação 4.1.1:

$$\log(\text{placas}) = \frac{\log(\text{D-Count}) + 0.71}{1.15} \quad (4.1.1)$$

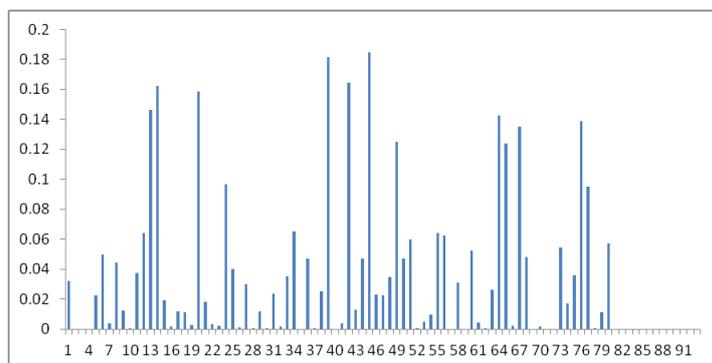


Figura 4.1.4: Gráfico de colunas dos resíduos das 70 amostras

#### 4.1.5 Estimativa rápida do grau de contaminação

Pretendia-se avaliar a possibilidade de se poder detetar rapidamente o grau de contaminação do leite através de outros parâmetros da qualidade de determinação mais expedita. Para isso foram analisadas os parâmetros “resazurina”, “pH”, “acidez”, contagem em “placas” e Contagem através do “D-Count” de diversas amostras de leite. É importante referir que todas as amostras analisadas, que possuíam elevados valores de contaminação microbiana (a maior parte deles acima de  $0.5 \times 10^6$ ), foram propositadamente acidificados para se poder realizar o estudo pretendido. Para isso as amostras de leite foram mantidas a temperaturas entre os 2 °C e os 10 °C (temperatura ótima de desenvolvimento das bactérias psicotróficas, como referido na secção 2.1.5.2 na página 18) durante o tempo necessário para a ocorrência de acidificação.

Os resultados obtidos para este estudo encontram-se na tabela 4.8. .

Tabela 4.8: Resultados obtidos na avaliação da qualidade do leite ao longo de 12 dias de trabalho.

<i>Data</i>	<i>Amostras</i>	<i>Resazurina</i>	<i>pH</i>	<i>Acidez (°D)</i>	<i>Placas ×10<sup>6</sup> (UFC/ml)</i>	<i>D-count</i>
22-01-15	<b>01</b>	5.5	6.76	18	6.80	4.00
	<b>02</b>	6.0	6.77	17	5.30	3.40
	<b>03</b>	3.5	6.75	18	7.20	3.50
3/2/2015	<b>04</b>	6.0	6.79	16	0.01	0.05
	<b>05</b>	5.5	6.80	16	0.02	0.05
	<b>06</b>	5.5	6.80	16	0.03	0.07
	<b>07</b>	5.5	6.80	17	0.14	0.12
	<b>08</b>	5.5	6.82	16	0.04	0.04
5/2/2015	<b>09</b>	5.5	6.76	17	0.50	0.36
	<b>10</b>	4.5	6.73	20	11.2	4.80
	<b>11</b>	5.0	6.75	18	3.20	4.70
6/2/2015	<b>12</b>	4.5	6.68	18	16.0	
	<b>13</b>	6.0	6.81	18	0.10	
9/2/2015	<b>14</b>	5.5	6.73	19	1.70	
	<b>15</b>	4.5	6.73	20	3.50	
	<b>16</b>	6.0	6.77	16	0.01	
19-02-15	<b>17</b>	5.5	6.78	17	0.02	
	<b>18</b>	6.0	6.78	17	0.09	
	<b>19</b>	5.5	6.79	17	0.09	
	<b>20</b>	6.0	6.81	17	0.02	
20-02-15	<b>21</b>	5.5	6.77	17	2.60	
	<b>22</b>	5.5	6.78	17	0.10	
	<b>23</b>	5.0	6.78	17	0.36	
24-03-15	<b>24</b>	5.0	6.79	18	2.15	
	<b>25</b>	5.0	6.79	18	1.36	
	<b>26</b>	5.5	6.80	17	1.25	
	<b>27</b>	5.0	6.79	18	1.95	
7/5/2015	<b>28</b>	5.5	6.76	16	0.23	0.67
8/5/2015	<b>29</b>	5.0	6.76	16	0.85	2.00
	<b>30</b>	5.0	6.75	17	3.80	8.00
20-05-15	<b>31</b>	5.0	6.76	16	0.49	1.86
	<b>32</b>	6.0	6.78	18	0.33	0.29
	<b>33</b>	6.0	6.75	17	0.21	0.37
	<b>34</b>	6.0	6.74	15	0.01	0.01
21-05-15	<b>35</b>	3.0	6.77	17	8.40	12.4
	<b>36</b>	4.0	6.79	19	3.20	8.70
	<b>37</b>	5.0	6.76	18	1.60	5.30
	<b>38</b>	6.0	6.74	16	0.02	0.03

De acordo como os resultados da tabela 4.8, pretendia-se descrever o grau de contaminação do leite (parâmetros Placas e D-Count) através dos restantes predictores, resazurina, pH e acidez.

Atendendo que há omissão de resultados em algumas amostras (omissão de valor

D-Count em dezasseis amostras designadas de a.12-a.27), realizaram-se dois tipos de avaliações: em primeiro lugar avaliou-se a relação dos preditores (resazurina, pH e acidez) com a resposta Placas e em segundo lugar a relação dos mesmos preditores com a resposta D-Count.

#### 4.1.5.1 Resposta obtida com as placas

Usando os resultados obtidos no método da contagem “Placas” e efetuado a avaliação direta através da matriz de correlação, obteve-se os resultados da tabela 4.9:

Tabela 4.9: Avaliação da resposta obtida com o método das placas através da matriz de correlação

<i>correlação</i>	<i>resazurina</i>	<i>pH</i>	<i>Acidez</i>
<i>pH</i>	0.224		
<i>Acidez</i>	-0.411	-0.313	
<i>Placas</i>	-0.600	-0.562	0.413

Através da análise aos valores da tabela 4.9 verificou-se que a resposta “Placas” estava simetricamente correlacionada com os valores da “resazurina” (-0.600) e com o “pH” (-0.562) mas diretamente relacionado com a “Acidez” (0.413), sugerindo que as contagens obtidas nas placas serão tanto maiores quanto menor for o pH e o índice obtido com a resazurina e maior o seu grau de acidez.

Atendendo aos resultados da tabela de  $R^2$ , constatou-se que estas relações são relativamente fracas - os preditores “resazurina” e “pH” apenas conseguiam descrever cerca de 36.0% e 31.5% (cerca de 1/3) da informação contida na resposta “Placas” enquanto que a acidez descrevia somente 17.0% (cerca de 1/6) desta.

As relações mais relevantes encontradas anteriormente (resazurina-Placas e pH-Placas), tabela 4.9, encontram-se representadas na figura (4.1.5).

Constatou-se, através da análise da figura 4.1.5 a baixa dependência da resposta (contagens nas placas) com os preditores testados.

Ao efetuar a modelação da resposta “Placas” com base nos três preditores estudados conseguiu-se encontrar um modelo parcimonioso que apenas depende de dois preditores (resazurina e acidez) com a capacidade de descrever apenas 39.0% da informação.

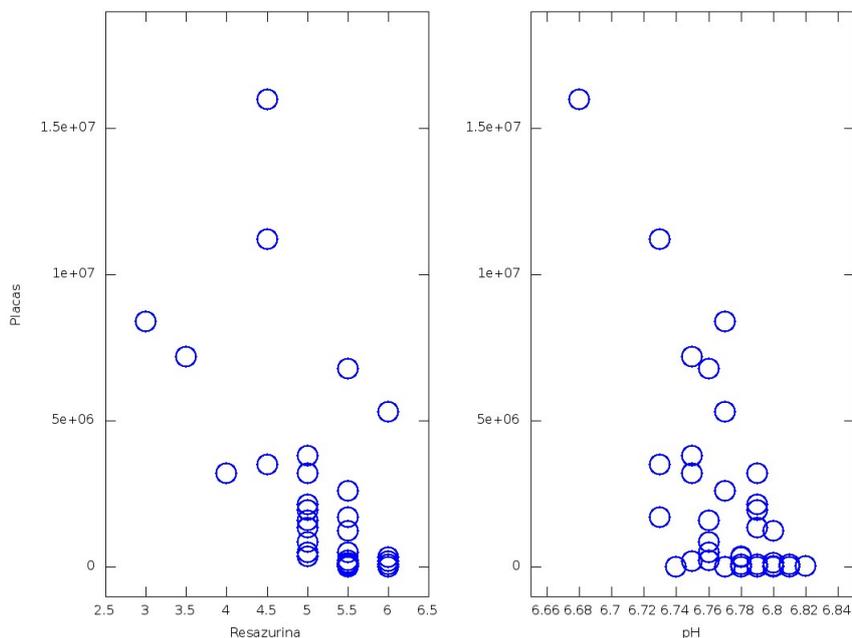


Figura 4.1.5: Representação dos preditores mais correlacionados com a resposta “Placas”: do lado esquerdo a relação com o índice de resazurina e do lado direito a relação com o valor do pH.

O modelo encontrado permite a obtenção da equação 4.1.2:

$$\text{Placas}/10^6 = 0.76 \times [\text{acidez}] - 2.07 \times [\text{resazurina}] \quad (4.1.2)$$

onde se verificou que as contagens nas placas dependiam diretamente da “acidez” e de forma simétrica da “resazurina”. Aos valores dos coeficiente determinados estão associados erros de 0.11 e 0.38 para os preditores “acidez” e “resazurina”, respetivamente.

Este baixo valor de descrição pode ser devido ao fato de se ter utilizado o método de referencia padrão para a contagem de microrganismos em vez do método específico para a quantificação de bactérias psicotróficas, que neste momento são as que originam maiores preocupações. De acordo com a bibliografia consultada, para se realizar a contagem de bactérias psicotróficas era necessário uma estufa a uma temperatura de 12.8 °C, a qual não existia nos laboratórios da Lactogal na Tocha.

#### 4.1.5.2 Resposta obtida com D-Count

Usando os resultados obtidos no método da contagem “D-Count”, efetuando a avaliação direta através da matriz de correlação obteve-se os resultados da tabela 4.10:

Tabela 4.10: Avaliação da resposta obtida com o método da contagem D-Count através da matriz de correlação.

<b>Correlação</b>	<b>resazurina</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>
<b>pH</b>	0.082		
<b>Acidez</b>	-0.434	-0.199	
<b>D-Count</b>	-0.763	-0.140	0.481

Através da análise à tabela 4.10 verificou-se que a resposta “D-Count” estava simetricamente correlacionada com os valores da “resazurina” (-0.763) e com o “pH” (-0.140) mas diretamente relacionado com a “Acidez” (0.481), sugerindo que as contagens obtidas nas placas serão tanto maiores quanto menor for o pH e o índice obtido com a resazurina e maior o seu grau de acidez.

Atendendo aos valores de  $R^2$ , verificou-se que estas relações eram relativamente fracas - os preditores “resazurina” e “acidez” apenas conseguiam descrever cerca de 58.1% e 23.1% (cerca de 2/3 e 1/4) da informação contida na resposta “D-Count” enquanto que o “pH” descrevia somente 2.0% (cerca de 1/50) desta.

As relações mais relevantes encontradas anteriormente (resazurina-D-Count e pH-D-Count), tabela 4.10, estão representadas na figura 4.1.6.

Ao analisar a figura 4.1.6, verificou-se a baixa dependência da resposta (“D-Count”) com os preditores testados.

Ao efetuar a modelação da resposta “D-Count” com base nos três preditores estudados conseguiu-se encontrar também um modelo parcimonioso que apenas dependia de dois preditores (resazurina e acidez) mas com a capacidade de descrever cerca de 60.0% da informação (~ 2/3 da informação contida na resposta D-Count).

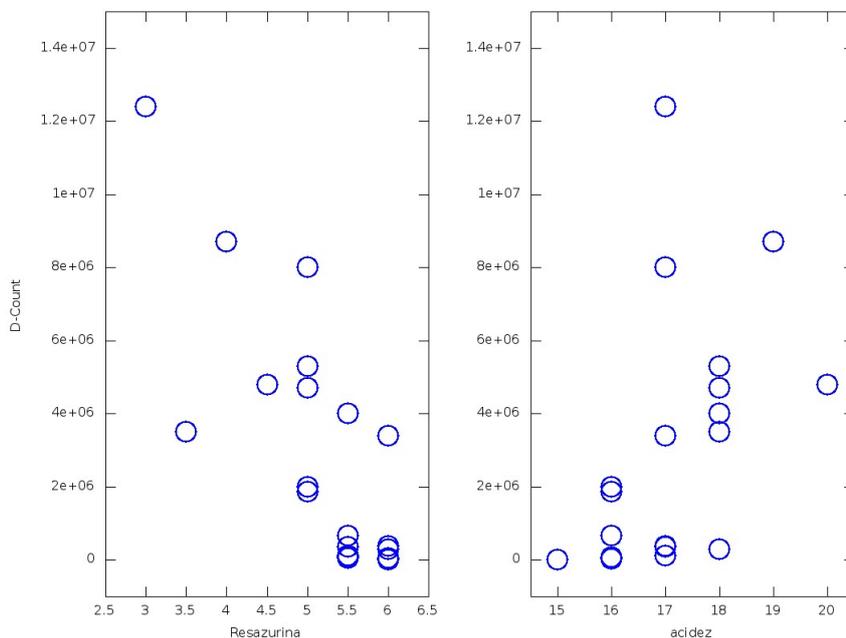


Figura 4.1.6: Representação dos preditores mais correlacionados com a resposta “D-Count”: do lado esquerdo a relação com o índice de resazurina e do lado direito a relação com o índice de acidez.

O modelo encontrado permite relacionar os preditores através da equação 4.1.3:

$$\text{D-Count}/10^6 = 0.94 \times [\text{acidez}] - 2.48 \times [\text{resazurina}] \quad (4.1.3)$$

onde as contagens obtidas com o D-Count dependiam diretamente da “acidez” e de forma simétrica da “resazurina”. Aos valores dos coeficiente determinados estão associados erros de 0.12 e 0.40 para os preditores “acidez” e “resazurina”, respetivamente.

Pode-se concluir então que ambos modelos revelavam a dependência direta com a combinação de resultados “acidez” e “resazurina” e como tal estas duas variáveis deviam ser exploradas, num trabalho futuro, no sentido de poderem servir de rápidos preditores para avaliar o grau de contaminação do leite, embora a presença de falsos positivos durante a realização do trabalho tenha sido um fator bastante presente durante o mesmo.

## 4.2 Biomilk

### 4.2.1 Repetibilidade do Biomilk

Para se proceder à avaliação da repetibilidade do Biomilk foram analisadas, no mesmo dia e à mesma hora, 5 amostras de um mesmo lote de leite “0% Lactose” com 5 réplicas cada. Os valores obtidos estão na tabela 4.11 e o primeiro passo a tomar foi a verificação da existência de outliers através da aplicação do Teste de Grubbs. Sendo o valor crítico de Grubbs para 5 amostras e 5 réplicas de 1.71 (tabela 1, Anexo 1), detetou-se a existência de um outlier mínimo na amostra 2 ( $1.73 > T_{\text{Crítico}}$ ). Assim sendo, o valor suspeito de ser outlier (60) foi retirado da amostra e o Teste de Grubbs foi aplicado novamente, tendo-se verificado que os valores mínimos e máximos de Grubbs calculados eram inferiores ao valor crítico para 4 réplicas. Desta forma a amostra 2 foi validada também apenas com 4 réplicas enquanto que as restantes amostras permanecem com 5 réplicas. A tabela final de valores a serem testados pelos procedimentos estatísticos seguintes está em 4.12.

Tabela 4.11: Resultados da análise de 5 amostras do mesmo lote de leite com 5 réplicas. Todos os valores indicados têm como unidade de concentração o mg/l.

Amostras	Réplicas				
	1	2	3	4	5
<b>01</b>	71	76	61	76	72
<b>02</b>	69	70	72	60	69
<b>03</b>	71	60	64	71	73
<b>04</b>	76	64	76	72	69
<b>05</b>	77	71	72	68	63

Tabela 4.12: Valores de [Lactose] em mg/l válidos para determinação da repetibilidade

Amostras	Réplicas				
	1	2	3	4	5
<b>01</b>	71	76	61	76	72
<b>02</b>	69	70	72	69	
<b>03</b>	71	60	64	71	73
<b>04</b>	76	64	76	72	69
<b>05</b>	77	71	72	68	63

Para se calcular a repetibilidade de um equipamento utilizou-se a ANOVA fator único e, conseqüentemente, o teste de Cochran teve de ser aplicado previamente para verificar a homogeneidade da variância. O TV obtido foi de 0.31 enquanto que o valor crítico (tabela 2, Anexo A) foi de 0.54. Desta forma confirmou-se a existência de homogeneidade de variância e a possibilidade de aplicar a ANOVA.

A avaliação ANOVA dos resultados permitiu obter um valor de teste  $TV = 0.40$  que corresponde ao valor de prova de 0.81, sugerindo deste modo que a hipótese

nula é válida. Assim sendo, com base nestes resultados conclui-se que eles são estatisticamente concordantes e respetiva incerteza aleatória é de 5.1.

Os valores das estimativas centrais e correspondentes valores de incerteza associado são de 71.2 (6.1), 70(1.4), 67.8(5.5), 71.4(5.1) e 70.2(5.2) para as amostras 1, 2, 3 4, e 5, respetivamente.

#### 4.2.2 Comparação de métodos: DSM vs Biomilk

O método aplicado na DSM era considerado como sendo o de referência pelo Departamento da Qualidade da Lactogal, e o que se pretendia verificar era se o novo equipamento, Biomilk, levava a resultados estatisticamente concordantes com os da DSM. Sendo assim foram analisadas 15 amostras de leites com baixo teor em lactose pelo Biomilk e os valores obtidos foram comparados com aqueles obtidos pelos laboratórios da DSM com a utilização de um HPLC durante a análise das mesmas 15 amostras. Os valores obtidos estão na tabela 4.13.

Tabela 4.13: Valores de concentração de lactose, em mg/l, de 12 amostras de leite distintas analisadas pelo método de referência (DSM) e pelo Biomilk, método a testar

Amostras	Lactose ( mg/l )	
	DSM ( M1 )	Biomilk ( M2 )
<b>01</b>	2012	2600
<b>02</b>	3922	4000
<b>03</b>	3395	3300
<b>04</b>	42.90	61.50
<b>05</b>	44.40	68.50
<b>06</b>	40.70	62.50
<b>07</b>	100.0	78.00
<b>08</b>	1790	1940
<b>09</b>	2790	3168
<b>10</b>	4150	4582
<b>11</b>	38.40	62.50
<b>12</b>	52.20	98.00
<b>13</b>	57.10	84.00
<b>14</b>	65.90	99.00

Para a verificação de concordância estatística entre os dois métodos utilizaram-se os dois processos estatísticos descritos em 2.3.3 na página 50 e 2.3.7.2 na página 55.

O primeiro método estatístico a ser usado foi o Teste t emparelhado para verificar a veracidade de  $H_0$ , que afirma que os dois métodos são estatisticamente concordantes. Através da aplicação deste teste obteve-se um valor TV de 2.29 que ultrapassa o respetivo valor crítico previsto pela distribuição t-student bilateral (Tabela 5, Anexo A) com 13 g.l. (2.18) a um grau de significância de 0.05. O respetivo valor de prova deu 0.039, o que indica estar dentro da zona de dúvida estatística (0.01-0.05). Tendo em conta que este valor se aproxima mais do limite superior

(0.05) tudo indica que haverá alguma probabilidade extra para a hipótese nula seja válida. Tal constatação foi comprovada pela obtenção do valor crítico, para um grau de significância de 0.01, de 3.01 superior ao TV (2.29).

Considerando agora a abordagem através da função de recuperação as estimativas obtidas são  $b_0 = 44(63)$  e  $b_1 = 1.059(0.031)$  e ao fazer a comparação com os respectivos valores de referência  $b_0 = 0$  e  $b_1 = 1$ , obteve-se os valores de teste de 0.70 e 1.91. Dado que estes são inferiores aos valores críticos previstos pela distribuição t-student bilateral (Tabela 5, Anexo A) a 0.05 confirma-se a veracidade da hipótese nula em ambos os casos, ou seja, não existem contribuições erros sistemáticos aditivos nem proporcionais, evidenciando uma vez mais que não existem diferenças significativas entre os dois métodos. A reta de regressão obtida e representada na figura 4.2.1 revela um ótima concordância entre os valores fornecidos pelos dois equipamentos sendo o coeficiente de correlação (R) de 0.995.

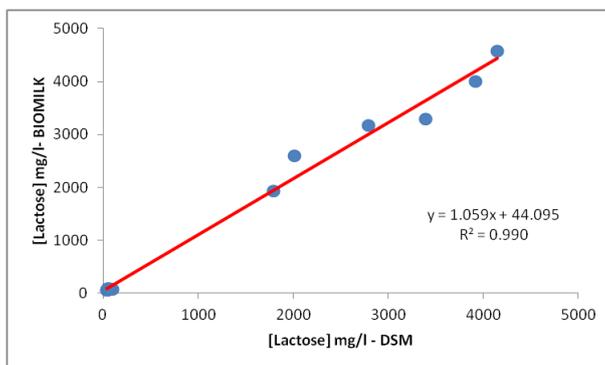


Figura 4.2.1: Retas de Regressão que relaciona os valores do teor em lactose em mg/l obtido através dos métodos de referência (DSM) e o Biomilk.

### 4.2.3 Acompanhamento da produção de leites com concentração em lactose inferior a 100 mg/l

Durante o mês de Março de 2015 foram analisados todos os lotes do leite “0% Lactose” produzidos nas instalações fabris da Lactogal. Este leite possui na sua rotulagem a informação de que o seu teor em lactose é inferior a 100 mg/l. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 4.14.

Tabela 4.14: [Lactose] mg/l de lotes de leite produzidos no mês de Março.

<b>Lotes</b>	<b>Réplicas</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>01</b>	95	87	89
<b>02</b>	60	51	52
<b>03</b>	98	88	83
<b>04</b>	47	32	40
<b>05</b>	77	65	63
<b>06</b>	97	92	85
<b>07</b>	72	63	65
<b>08</b>	60	49	53
<b>09</b>	75	82	69
<b>10</b>	130	111	123
<b>11</b>	110	122	111
<b>12</b>	74	63	69
<b>13</b>	81	90	82
<b>14</b>	82	95	87
<b>15</b>	67	72	70
<b>16</b>	94	84	90
<b>17</b>	85	76	71
<b>18</b>	77	72	70
<b>19</b>	82	77	73

Através dos passos referenciados na secção 2.3.8 na página 58 obteve-se a X-Chart e a R-Chart apresentadas respetivamente pelos gráficos 4.2.2 e 4.2.3.

Tendo em conta que apenas um dos lotes analisados ultrapassou a UWL do gráfico 4.2.2, e de acordo com o definido como situação anómala no ponto 2.3.8 na página 58, pode-se afirmar que, as alterações identificadas, devem-se apenas a causas comuns, no que diz respeito à R-Chart não detetado nenhum valor acima da UWL, sendo que o processo analisado foi considerado como estando “estatisticamente controlado” não sendo necessário efetuar nenhuma alteração.

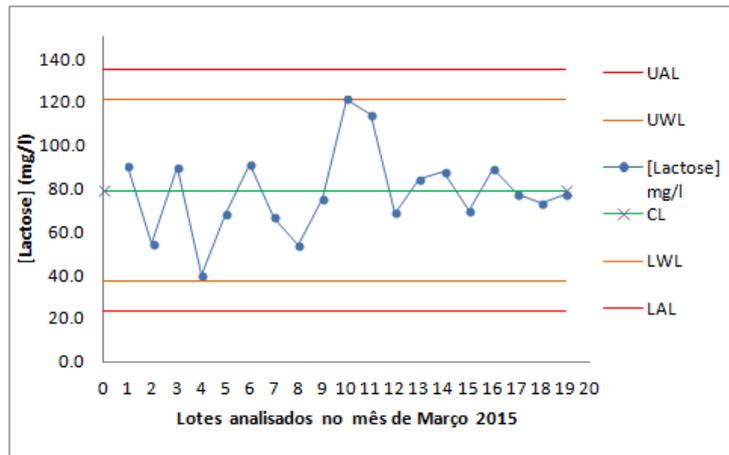


Figura 4.2.2: Na carta de controlo relativa à posição verifica-se que todos os pontos correspondentes às produções analisadas se encontram dentro das normas consideradas como sendo um processo sob controlo.

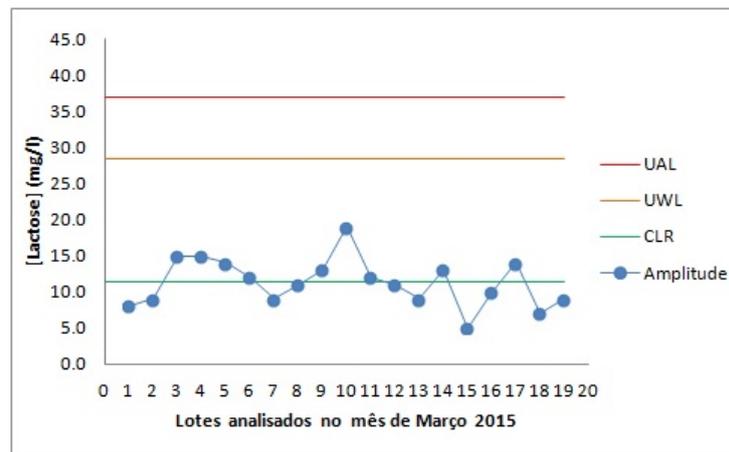


Figura 4.2.3: A carta de controlo de amplitudes revela que a produção do leite analisado durante o mês de Março está estatisticamente sob controlo, pois todos os valores são inferiores à Linha Superior de Aviso.



## Capítulo 5

### *Conclusões*

Tendo em conta o estudo dos equipamentos utilizados para medir a acidez do leite, o Potenciômetro Titrino Plus 877 e o eletrodo Testo, pode-se garantir o bom funcionamento de ambos, tanto na sua utilização para a medição da acidez de leite cru, como de produto acabado. No caso do Titrino Plus para análise de leite cru verificou-se uma variabilidade puramente aleatória de 0.08 e um coeficiente de erro médio de 0.60%. No caso da análise do leite Celta a variabilidade puramente aleatória foi de 0.13°D e o coeficiente de erro médio de 1.0%, valores estes bastante aceitáveis. Relativamente ao eletrodo Testo a variabilidade puramente aleatória foi de 0.27°D tanto para o leite cru como para o leite Celta, tendo-se verificado valores de 2.0% e 1.9% para o valor do coeficiente de erro para o leite cru e leite Celta respetivamente. Em ambos os casos a variabilidade para médias triplicadas diminui sempre em relação ao valor para o ensaio único, como era de esperar, tanto na análise do leite cru como do leite Celta, para ambos os equipamentos testados. Ao se realizar a comparação entre os valores obtidos através do Titrino e do Testo, concluiu-se que os valores de acidez determinado por cada um deles são estatisticamente concordantes, podendo o potenciômetro Titrino Plus 877 ser utilizado para a determinação da acidez em °D tanto para leite cru, como para leite como produto acabado em vez do método de referência com a utilização do eletrodo Testo.

O equipamento de citometria de fluxo, D-Count, foi testado para verificar a sua aplicabilidade na contagem microbiana de leite cru, tendo se concluído que, embora ele apresente bons valores de repetibilidade (sendo a variabilidade puramente aleatória de  $3.55 \times 10^{+03}$  e o coeficiente de erro médio de 8.7%) os valores obtidos através da sua aplicação não são estatisticamente concordantes com aqueles obtidos através da aplicação do método de referência (contagem em placas de MPCA a 30°C) e por esse motivo não poderá ser usado, pelo menos de forma direta, para verificar a contaminação quantitativa do leite cru. Para ser utilizado é necessário

aplicar o fator de correção referido na equação 4.1.1 na página 82.

No que diz respeito ao controlo de qualidade efetuado ao leite cru que entrava na unidade fabril conseguiu-se obter duas equações (a equação 4.1.2 na página 86 e 4.1.3 na página 88) que permitem a estimativa rápida da contaminação microbológica do mesmo, utilizando os parâmetros de resposta que mais relacionados estavam com os valores da contagem microbiana, sendo esses o grau de resazurina e a acidez do leite em °D. No entanto as equações criadas, em ambos os casos, possuem ainda baixos valores de concordância entre todos os valores obtidos experimentalmente, sendo que no primeiro caso apenas descrevem 39% da informação e no segundo caso 60%. A percentagem de 39% obtida através do método de referência pode ser explicada devido ao fato da flora microbiana existente no leite ser maioritariamente psicotrófica e o método utilizado para a contagem microbiana não ter sido o adequado para este tipo de bactérias devido à não existência de uma estufa a 12.8°C. Para além disso verificou-se a ocorrência de um grande número de falsos positivos e falsos negativos, sendo por isso necessário mais estudos sobre esta matéria, mas neste caso utilizando-se o material necessário para a contagem de flora psicotrófica para tentar aumentar o valor de concordância entre os dados.

Relativamente ao controlo de qualidade aplicado a leites com baixo teor em lactose conclui-se que o Biomilk apresentava um valor de variabilidade puramente aleatória de 5.1 mg/l e um coeficiente de erro médio de 7.3%, apresentando por isso bons valores de repetibilidade. Ao se efetuar a comparação estatística entre os resultados obtidos com o Biomilk e os obtidos utilizando o método de referência (HPLC) pode-se constatar que ambos os métodos eram estatisticamente concordes, o que significa que Biomilk poderá ser utilizado para realizar a quantificação da lactose sem ser necessário o envio de amostras para laboratórios externos. As cartas de controlo elaboradas (figura 4.2.2 e figura 4.2.3 na página 93) durante o acompanhamento de uma produção de leite com baixo teor em lactose, durante um mês, levou à conclusão que todo o processo estava a decorrer dentro dos parâmetros previstos.

# Bibliografia

- [1] W. Haasnoot M. Van der Spiegel, P. Sterrenburg and H. J. van der Fels Klerx. Towards a decision support system for control of multiple food safety hazards in raw milk production. *Trends in Food Science and Techonology*, 34:137–145, 2013.
- [2] Tetra Pak Processing Systems A B. *Manual de Industrias Lácteas*. Mundi-Prensa Libros, S.A., 2003.
- [3] CT 32 (DGFCQA). Norma portuguesa 472 de 1987. Technical report, Instituto Portugues da Qualidade, 1987.
- [4] M.L.Arruba Behmer. *Tecnologia do Leite*. Livraria Nobel, 1977.
- [5] José E. de Castro e Costa. *Noções práticas de leite e lacticínios*. Junta Nacional dos Produtores Lácteos, 1966.
- [6] Lúcia Medeiros. Classificação do leite na produção. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 4, 2008.
- [7] Johm L. Tymoczko Jeremy M. Berg and Lubert Stryer. *Bioquímica*. Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.
- [8] David L. Nelson and Michael M. Cox. *Lehninger, Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, 2008.
- [9] A. Noomen A. Jelleman y M. A. J. S. van Boekel P. Walstra, T.J. Geursts. *Ciencia de la Leche y Tecnologia de los produtos Lácteos*. Editorial Acribia, 1975.
- [10] Pieter Walstra and Robert Jenness. *Química y Física Lactológica*. Chapman and Hall, 1994.
- [11] Alan H. Varnam and Jane P. Sutherland. *Milk and Milk Produts. Techology, Chemistry and Microbiology*. Chapman and Hall, 1994.

- [12] S. Campuzano M. A. Ruiz A. J. Reviejo F. Consuelo, M. Gamella and J. M. Pingarron. An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58:7141 – 7148, 2010.
- [13] F. Vieira de Sá. *Do úbere à fábrica de lacticínios*. Livraria Clássica Editora, 1999.
- [14] F.M. Luquet. *Do úbere à fábrica de lacticínios*. Publicações Europa-América, 1999.
- [15] CT 32 (DGFCQA). Norma portuguesa 467 de 1985. Technical report, Instituto Portugues da Qualidade, 1983.
- [16] Patrick Francis Keating. *Introduccion a la Lactologia*. Noriega Editores, 1999.
- [17] James M. Jay. *Modern Food Microbiology*. An Aspen Publicationl, 2000.
- [18] Maurílio Lopes Maritins e Maria Cristina Dantas Vanetti Cládia Lúcia de Oliveira Pinto. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *C. Tecnológica Alimentar*, 26:645 – 651, 2006.
- [19] Rafaella Belchior Brasil. Leite instável não Ácido e fatores que afetam a estabilidade do leite. Master's thesis, Universidade Federal de Goiás, 2013.
- [20] CT 32 (DGFCQA). Norma portuguesa 459 de 1985. Technical report, Instituto Portugues da Qualidade, 1983.
- [21] Paul V. Attfield Thusitha S. Gunasekera and Duncan A. Veal. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3):1228–1232, 2000.
- [22] B. Ferrari J. Piper P.V Attfield D.A. Veal, D. Deere. Flourescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*, 243:191–210, 2000.
- [23] Chemunex. *M3 Instrumentation Training Manual of Flow Cytometry*.
- [24] CT 32 (DGFCQA). Norma portuguesa 453 de 2002. Technical report, Instituto Portugues da Qualidade, 2002.
- [25] Antonino Godedy Mur. *Modernas técnicas aplicadas. Análisis de la Leche*. Editorial DOSSAT, 1966.
- [26] Tetra Pak. *The Role of Raw Milk Quality in UHT Production*.

- [27] Maria Edi Rocha Ribeiro et al Viviam Fischer. Leite instável não Ácido:um problema solucionável. *Rev. Bras. Saúde Prod. Animal*, 13:838–848, 2012.
- [28] Jose Espejo Serrano. Estudio comparado de tres metodos para catalogar la calidad microbiologica de la leche cruda en zonas de clima calido. *Archivos de zootecnia*, 26:271, 1977.
- [29] Maria Luísa Pinto. Pesquisa de leite em pó reconstituído. *Revista Portuguesa de Farmácia*, 1964.
- [30] John O'Brien, Ian Wilson, Terry Orton, and François Pognan. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17):5421–5426, 2000.
- [31] Guerin, Mondido, McClenn, and Peasley. Application of resazurin for estimating abundance of contaminant-degrading micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 32(5):340–345, 2001.
- [32] CT 32 (DGFCQA). Norma portuguesa 455 de 1983. Technical report, Instituto Portugues da Qualidade, 1983.
- [33] CT 32 (DGFCQA). Norma portuguesa 470 de 1983. Technical report, Instituto Portugues da Qualidade, 1983.
- [34] M. J. F. Rebelo R. J. M. Lourenço, M. L. M. Serralheiro. Development of a new amperometric biosensor. *Portugal Electrochimica Acta*, 21:171 – 177, 2003.
- [35] Biolan Microbiosensors. *New low cost, fast, simple, specific and accurate technology for lactose detection in dairy products*.
- [36] S.V.Dzyadevych et al. Amperometric enzyme biosensors:past, present and future. *IRBM*, 29:171–180, 2008.
- [37] Asha Chaubey and B.D. Malhotra. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17:441–456, 2002.
- [38] Ana Rita Dantas Balsem ao. Construção de um biosensor para o doseamento de ureia baseado na inibição enzimática da amidase de pseudomonas aeruginosa com recurso a um elétrodo seletivo de iões amónio. Master's thesis, Instituto Politéctico de Lisboa, 2008.
- [39] Jo ao Victor Bueno Kozan. Microsensor para glicose integrado a cateter. Master's thesis, Universidade de São Paulo, 2007.
- [40] Glen McPherson. *Statistics in Scientific Investigation*. Springer-Verlag, 1990.

- [41] Mamas Prodromidis and Miltiades I. Karayannis. Enzyme based amperometric biosensors for food analysis. *Electroanalysis*, 14(4):241–261, 2002.
- [42] Mehmet Mutlu. *Biosensors in Food, Processing, Safety and Quality Control*. Taylor and Francis Group, 2011.
- [43] Joseph M. Juran and A. Blanton Godfrey. *Juran's Quality Handbook*. McGraw-Hill, 1998.
- [44] George Casella and Roger L. Berger. *Statistical Inference*. Thomson Learning, 2002.
- [45] James E. De Muth. *Basic Statistics and Pharmaceutical Statistical Applications*. Chapman and Hall, 2006.
- [46] Ron Larson and Betsy Farber. *Estatística Aplicada*. Prentice Hall, 2004.
- [47] Edite Manuela Fernandes. *Estatística Aplicada*. Universidade do Minho, 1999.
- [48] Sonia Vieira. *Introdução a Bioestatística*. Editora Campus, 1981.
- [49] David J. Sheskin. *Handbook of Parametric and Non Parametric Statistical Procedures*. Chapman and Hall/CRC, 2004.
- [50] David S. Moore and George P. McCabe. *Introduction to the Practice of Statistics*. W.H. Freeman and Company, 1996.
- [51] Bento José Ferreira Murteira. *Análise Exploratória de Dados- Estatística Multivariada*. McGraw-Hill, 1999.
- [52] Thomas P. Ryan. *Modern Regression Methods*. A.Wiley, 1997.
- [53] Bernardo F. E. Lins. Ferramentas básicas da qualidade. *Ciência da Informação*, 22:181–185, 1993.
- [54] Jorge L. G. F. S. Costa Pereira. Controlo de qualidade: Diagnóstico estatístico de processos por estimativas diretas. *Sociedade Portuguesa de Química*, 101:40–43, 2006.
- [55] Microbiology of food and animal feeding stuffs- general requirements and guidance for microbiological examinations. Technical report, International Standard, 2007.
- [56] Iso 4833-1:2013- microbiology of the food chain- horizontal method for the enumeration of microorganisms, part 1. Technical report, International Standard, 2013.

- [57] Microbiology of food and animal feeding stuffs- preparations of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examinations, part 4. Technical report, International Standard, 2003.



Parte I

Anexos

---

Tabela 5.1: Valores críticos da distribuição t-Student bilareral.

$\nu$	$\alpha$				$\nu$	$\alpha$				$\nu$	$\alpha$			
	0.10	0.05	0.02	0.01		0.10	0.05	0.02	0.01		0.10	0.05	0.02	0.01
2	2.92	4.30	6.96	9.92	12	1.78	2.18	2.68	3.05	24	1.71	2.06	2.49	2.80
3	2.35	3.18	4.54	5.84	13	1.77	2.16	2.65	3.01	26	1.71	2.06	2.48	2.78
4	2.13	2.78	3.75	4.60	14	1.76	2.14	2.62	2.98	30	1.70	2.04	2.46	2.75
5	2.02	2.57	3.36	4.03	15	1.75	2.13	2.60	2.95	35	1.69	2.03	2.44	2.72
6	1.94	2.45	3.14	3.71	16	1.75	2.12	2.58	2.92	40	1.68	2.02	2.42	2.70
7	1.89	2.36	3.00	3.50	17	1.74	2.11	2.57	2.90	50	1.68	2.01	2.40	2.68
8	1.86	2.31	2.90	3.36	18	1.73	2.10	2.55	2.88	60	1.67	2.00	2.39	2.66
9	1.83	2.26	2.82	3.25	19	1.73	2.09	2.54	2.86	80	1.66	1.99	2.37	2.64
10	1.81	2.23	2.76	3.17	20	1.72	2.09	2.53	2.85	100	1.66	1.98	2.36	2.63
11	1.80	2.20	2.72	3.11	22	1.72	2.07	2.51	2.82	$\infty$	1.64	1.96	2.33	2.58

Tabela 5.2: Valores críticos da distribuição de Fisher-Snedcor ( $\alpha = 0.01$ )

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39	99.40	99.42	99.43	99.45
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35	27.23	27.05	26.87	26.69
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.37	14.20	14.02
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.89	9.72	9.55
6	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.72	7.56	7.40
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.47	6.31	6.16
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.67	5.52	5.36
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.11	4.96	4.81
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.71	4.56	4.41
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.40	4.25	4.10
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.16	4.01	3.86
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	3.96	3.82	3.66
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.80	3.66	3.51
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.67	3.52	3.37
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.55	3.41	3.26
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.46	3.31	3.16
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.37	3.23	3.08
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.30	3.15	3.00
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.23	3.09	2.94
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.12	2.98	2.83
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	2.99	2.85	2.70
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.84	2.70	2.55

Tabela 5.3: Valores críticos da distribuição de Fisher-Snedcor unilateral ( $\alpha = 0.05$ )

$\nu_1 \backslash \nu_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.226	2.151	2.071
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.165	2.089	2.007
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.092	2.015	1.932

Tabela 5.4: Valores críticos para o teste de Cochran

$m = \text{número de réplicas da estimativa de cada variância}$								
$n$	2	3	4	5	6	7	10	$\infty$
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8010	0.5000
3	0.9969	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6167	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5017	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4214	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3682	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3259	0.1429
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2439	0.1000
20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1357	0.0500
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.0958	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0745	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0520	0.0167

Tabela 5.5: Valores críticos para o teste de Grubbs ( $\alpha = 0.05$ )

<i>n</i>	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>G</i>	1.15	1.48	1.71	1.89	2.02	2.13	2.21	2.29	2.34
<i>n</i>	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>G</i>	2.41	2.46	2.51	2.55	2.54	2.62	2.65	2.68	2.71
<i>n</i>	21	22	23	24	25	30	35	40	50
<i>G</i>	2.73	2.76	2.78	2.80	2.82	2.91	2.98	3.04	3.13
<i>n</i>	60	70	80	90	100	110	120	130	140
<i>G</i>	3.20	3.26	3.31	3.35	3.38	3.42	3.44	3.47	3.49

Tabela 5.6: Valores críticos para a X-Chart e R-Chart de acordo com a norma ISO 8258:2004

Réplicas (m)	$A_2$	$D_3$	$D_4$	$d_2$
2	1.880	0.000	3.267	1.128
3	1.023	0.000	2.574	1.693
4	0.729	0.000	2.282	2.059
5	0.577	0.000	2.114	2.326
6	0.483	0.000	2.004	2.534
7	0.419	0.076	1.924	2.704
8	0.373	0.136	1.864	2.847
9	0.337	0.184	1.816	2.970
10	0.308	0.223	1.777	3.078