

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação da metodologia no infravermelho com Transformada de
Fourier para análises do pH e ponto de congelamento em leite bovino**

Viviane Maia de Araújo

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens**

**Piracicaba
2009**

**Viviane Maia de Araújo
Zootecnista**

**Avaliação da metodologia no infravermelho com Transformada de Fourier para
análises do pH e ponto de congelamento em leite bovino**

**Orientador:
Prof. Dr. PAULO FERNANDO MACHADO**

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens**

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Araújo, Viviane Maia de

Avaliação da metodologia no infravermelho com Transformada de Fourier para análises de pH e ponto de congelamento em leite bovino / Viviane Maia de Araújo. - - Piracicaba, 2009.

52 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Transformada de Fourier 2. Infravermelho 3. Leite - Qualidade I. Título

CDD 637.1
A663a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*À minha querida avó Angelina
(in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Fernando Machado pela orientação e suporte durante todo o mestrado. Sem dúvida, os conhecimentos aqui adquiridos me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias pela orientação nas análises estatísticas.

A toda a equipe da Clínica do Leite, em especial à Cristiane e ao Laerte que me auxiliaram diretamente na execução do projeto.

A toda equipe do setor de Pesquisa & Desenvolvimento da Clínica do Leite, Carol, Luiz, José, Talita, Teodoro, Cíntia, Graziela, Beatriz e Fábio, que de alguma maneira auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho e por todos os momentos juntos.

À Aline e ao Augusto pelo companheirismo e pela participação direta e ativa na execução do experimento, interpretação das análises e formatação. A contribuição de vocês foi muito importante.

Ao Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais e irmãs, que apesar da distância estiveram sempre presente em minhas decisões, incentivando e dando força. Amo muito vocês.

Às minhas amigas (irmãs de coração) Michelle e Ellen pelo apoio em todas as horas e pelo convívio em família.

A todos os amigos que não mencionei, mas que participam de minha vida de forma especial, incentivando e fazendo parte de minha história.

*“Para cada esforço disciplinado há
uma retribuição múltipla”*

Jim Rohn.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Revisão bibliográfica	16
1.1.1 Monitoramento da qualidade do leite no Brasil.....	16
1.1.2 Qualidade físico-química do leite	17
1.1.2.1 pH.....	17
1.1.2.2 Ponto de congelamento.....	18
1.1.3 Metodologias para análises de pH e crioscopia	20
1.1.3.1 Metodologia de referência para análise de pH.....	20
1.1.3.2 Metodologia de referência para análise do ponto de congelamento	20
1.1.3.3 Metodologia no infravermelho com Transformada de Fourier	21
1.1.4 Correlação entre as metodologias	21
1.1.5 Conservação das amostras	22
Referências.....	23
2 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE CRU PARA DETERMINAÇÃO DO pH E DO PONTO DE CONGELAMENTO UTILIZANDO O INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	27
Resumo	27
Abstract	28
2.1 Introdução.....	28
2.2 Desenvolvimento.....	30
2.2.1 Material e Métodos	30
2.2.1.1 Coleta e conservação das amostras de leite.....	30
2.2.1.2 Análise laboratorial.....	31
2.2.1.3 Análise estatística.....	31
2.2.2 Resultados e Discussão	32
2.2.2.1 Efeito do bronopol	32

2.2.2.2 Efeito da temperatura e tempo de armazenamento	34
2.2.2.3 Avaliação da metodologia alternativa	37
2.3 Conclusões	38
Referências	39
3 CARACTERIZAÇÃO E VARIABILIDADE DO PONTO DE CONGELAMENTO NO LEITE DE TANQUES EM REBANHOS BRASILEIROS	41
Resumo	41
Abstract	41
3.1 Introdução	42
3.2 Desenvolvimento	43
3.2.1 Material e Métodos	43
3.2.1.1 Coleta das amostras de leite	43
3.2.1.2 Análise laboratorial	44
3.2.1.3 Análise estatística	44
3.2.2 Resultados e discussão	44
3.3 Conclusões	50
Referências	50

RESUMO

Avaliação da metodologia no infravermelho com Transformada de Fourier para análises do pH e ponto de congelamento em leite bovino

Objetivou-se com este trabalho avaliar a utilização da metodologia no infravermelho com Transformada de Fourier (ITF) na determinação do pH e ponto de congelamento (PC) no leite bovino. No primeiro estudo foram avaliados os efeitos das diferentes condições de conservação em amostras de leite para posterior análise do pH e do PC. Para tanto, foram coletadas, do tanque de 57 propriedades, amostras de três litros de leite. Cada amostra foi subdividida e transferida para 45 frascos de 40mL e distribuídas de acordo com a temperatura de armazenamento (-30°C - Congelado; 7°C - Resfriado; 25°C - Ambiente), idade da amostra (0, 3, 6 e 9 dias) e níveis de adição de água (0, 2, 4 e 6%). Foram adicionadas pastilhas de bronopol (Microtabs[®]) aos 44 frascos, sendo que um foi mantido sem adição do conservante para tratamento controle. Os resultados obtidos, considerando as diferentes condições de conservação das amostras, e ainda, o efeito da adição do bronopol, foram avaliados por comparação de médias. As metodologias (referência e alternativa) foram correlacionadas em função da idade da amostra para o PC por análise de regressão linear. A sensibilidade e a especificidade foram calculadas para avaliação do desempenho do equipamento MilkoScan[™] FT+ na detecção de água. A adição do bronopol não alterou as médias do pH, porém reduziu significativamente o PC. Para eliminação desse efeito, foram calculados fatores de correção para os resultados do PC nas duas metodologias empregadas nesse estudo. O aumento da temperatura de armazenamento reduziu significativamente as médias do pH e do PC em amostras com seis e nove dias de coleta. Não houve efeito significativo nas médias do pH e do PC com o aumento na idade da amostra a -30° e 7°C. As correlações entre as metodologias em função da idade da amostra para o PC foram altas e significativas. A sensibilidade e especificidade do equipamento MilkoScan[™] FT+ na detecção de água, em relação ao crioscópio eletrônico, foram de 90,9% e de 86,8%, respectivamente. No segundo estudo, objetivou-se caracterizar a atual situação do ponto de congelamento (PC) em rebanhos brasileiros, e avaliar o efeito da lactose e da contagem bacteriana total (CBT) sobre os resultados do PC. Foram analisados 137.443 dados por meio de estatística descritiva e de análise da variância, para caracterizar a atual situação do PC e para avaliação dos efeitos da lactose e da CBT sobre o PC. A média e o respectivo desvio-padrão do PC foi de -0,522 (0,011)°C, e, constatou-se que o percentual de amostras em conformidade com a Instrução Normativa nº 51 foi de 92,48%, enquanto que para amostras em não conformidade, com indicativo de adição de água ou de soluto, foi de 7,10% e 0,41% respectivamente. A lactose e a CBT influenciaram significativamente nos níveis do PC.

Palavras-chave: Conservação de amostras; Leite de tanques; pH; Ponto de congelamento; Transformada de Fourier

ABSTRACT

Evaluation of the methodology Fourier Transform Infrared for analysis of pH and freezing point in bovine milk

The objective of this study was to evaluate the use of the methodology Fourier Transform Infrared (FTIR) for determining the pH and freezing point (FP) in bovine milk. The first study evaluated the effects of different storage conditions on samples of milk for subsequent analysis of pH and the PC. For both, were collected from the tank of 57 properties, samples of three liters of milk. Each sample was divided and transferred to 45 vials of 40mL and distributed according to storage temperature (-30°C - Frozen, 7°C - Cold, 25°C - Environment), age of the sample (0, 3, 6 and 9 days) and levels of added water (0, 2, 4 and 6%). Tablets to bronopol (Microtabs[®]) were added to 44 bottles, of which one was maintained without addition of preservative for control treatment. The results, considering the different conditions of storage of samples, and the effect of adding bronopol were evaluated by comparison of means. The methods (reference and alternative) were correlated with age of the sample to the FP for linear regression analysis. The sensitivity and specificity were calculated to evaluate the performance of MilkoScan[™] FT+ equipment for detecting water. The addition of bronopol did not alter the average pH, but significantly reduced the FP. To combat this effect, were calculated correction factors for the results of the PC in the two methodologies employed in this study. Increasing the temperature of storage significantly reduced the average pH and the FP samples with six and nine days of collection. There was no significant effect on mean pH and the PC with the increasing age of the sample at -30°C and 7°C. The correlations between the methods depending on the age of the sample for the FP were high and significant. The sensitivity and specificity of the equipment MilkoScan[™] FT+ in the detection of water on the thermistor cryoscope were 90.9% and 86.8% respectively. While in the second study aimed to characterize the current state of the freezing point (FP) in Brazilian herds and Evaluated the effect of lactose and the total bacterial count (TBC) on the results of the FP. 137,443 data were analyzed using descriptive statistics and analysis of variance, to characterize the current state of the FP and to evaluated the effects of lactose and TBC on the FP. The mean and standard deviation of the FP was -0.522 (0.011)°C, and it was found that the percentage of samples in accordance with Normative Instruction n^o 51 was 92.48%, while for samples not in accordance with an indication of added water and solute was 7.10% and 0.41% respectively. The lactose and TBC significantly influenced the levels of PC.

Keywords: Bulk tank; Freezing point; Fourier Transform; pH; Preservation of samples

1 INTRODUÇÃO

O setor leiteiro brasileiro vem passando por grandes mudanças nos últimos anos. A implantação da Instrução Normativa 51 (IN-51), do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), foi um marco para a concretização de novas condutas dentro da cadeia produtiva do leite. Para atender a demanda por análises a partir da nova legislação, foi criada a Rede Brasileira de Laboratórios para o Controle da Qualidade do Leite (RBQL). Esses laboratórios necessitam de equipamentos eletrônicos modernos para análises rápidas e precisas, possibilitando analisar um grande número de amostras. A IN-51 permite que outros métodos de controle operacional sejam utilizados para as análises, desde que sejam conhecidos os seus desvios e correlações em relação aos respectivos métodos de referência. Isso porque as metodologias de referência possuem limitações quanto à capacidade analítica dos aparelhos, por serem mais laboriosos. Parâmetros de composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite cru, são amplamente analisados pelos laboratórios da RBQL por meio de equipamentos eletrônicos que utilizam metodologias no Infravermelho. Para as análises do pH e ponto de congelamento, isso ainda é pouco utilizado, mas existe uma demanda crescente por essas análises, tanto para controle de qualidade das indústrias processadoras quanto para fiscalização do MAPA. O primeiro é um parâmetro utilizado na verificação da acidez do leite e na garantia da qualidade da conservação das amostras que chegam aos laboratórios e o segundo é internacionalmente aceito para detecção de fraude por aguagem. Ambas são características que podem causar impacto no rendimento de produtos processados, e conferem significativos prejuízos as indústrias, por isso o interesse em monitorá-los. Atualmente existe o equipamento MilkoScanTM FT+ (FOSS) capaz de analisar em uma única amostra parâmetros de composição, uréia, ácidos graxos, pH e ponto de congelamento. A precisão e a velocidade no fornecimento dos resultados são expressamente superiores ao método convencional. Sendo isso possível, pois a metodologia empregada é a espectrometria no infravermelho com Transformada de Fourier (ITF), no qual, espectrofotômetros empregam a operação matemática conhecida como Transformada de Fourier para calcular espectros obtidos a partir de

um interferograma. Alguns países já vêm utilizando a metodologia com sucesso. No Brasil, a metodologia ITF ainda não é praticada pelos laboratórios de qualidade do leite e para fazer parte da rotina, é importante que se conheça seu desempenho nas condições brasileiras. No país a conservação das amostras se faz necessária, pois normalmente demoram mais de 48 horas para chegar até os laboratórios. Por isso são utilizados artifícios específicos como temperatura de armazenamento, tempo entre coleta e análise (idade da amostra) e ainda conservantes químicos (bronopol). Com base no exposto, objetiva-se com este trabalho avaliar a metodologia no infravermelho com Transformada de Fourier (ITF) para determinação do pH e ponto de congelamento (PC) do leite cru em amostras sob diferentes condições de conservação. Os objetivos específicos são: 1) avaliar os efeitos do bronopol, da temperatura de armazenamento e idade da amostra sobre os resultados de pH e ponto de congelamento, analisados pelas metodologias de referência e alternativa (ITF) em amostras de leite cru bovino; 2) caracterizar a atual situação do PC em rebanhos brasileiros e verificar o efeito da lactose e da contagem bacteriana total sobre os resultados do PC.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Monitoramento da qualidade do leite no Brasil

No final do ano de 1996, criou-se o “Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL)” caracterizado por um conjunto de medidas, visando à melhoria da qualidade do leite produzido no Brasil. Juntamente ao PNMQL foi implementada a Instrução Normativa nº 51 (IN 51) de 18/09/2002, aprovada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que fixa requisitos mínimos a serem observados para produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite A, B, C, pasteurizado e cru refrigerado (BRASIL, 2002b). Este fato tem provocado grandes mudanças positivas no setor leiteiro no Brasil, sendo uma delas o monitoramento da qualidade do leite por meio de análises laboratoriais. Para atender a demanda de análises, a partir da nova legislação, a Instrução Normativa nº. 37 (IN 37) instituiu a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), que tem

como objetivo realizar análises oficiais para fiscalização de amostras de leite cru, coletadas em propriedades rurais e nas indústrias processadoras (BRASIL,2002a).

Outro fator que vem impulsionando essa demanda por análises são as indústrias processadoras, as quais estão mais competitivas para atender ao mercado nacional e internacional. Para isso, criaram os programas de pagamento por matéria-prima de melhor qualidade no intuito de obter maiores rendimentos industriais e incremento na vida de prateleira dos produtos (MARTINS et al., 2004). Cada indústria estabelece seus próprios requisitos, que normalmente são mais criteriosos do que os fixados pela legislação.

Dentre as análises exigidas pela IN 51 inclui-se a contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), teores de proteína, gordura e lactose além da presença de inibidores e ponto de congelamento do leite (BRASIL,2002b). Essas análises são realizadas através de metodologia analítica oficial aceita pelo MAPA.

Os laboratórios possuem equipamentos modernos para análises rápidas e precisas, capazes de gerar um grande número de resultados por hora. Os equipamentos são aferidos, para confiabilidade e precisão nos resultados oficiais fornecidos, de acordo com recomendações da International Dairy Federation (IDF, 1999).

Atualmente, oito laboratórios são credenciados, localizados estrategicamente por todo o território nacional, além de um laboratório de referência que monitora a qualidade das análises efetuadas pelos demais, mediante programa de controle intra e interlaboratorial.

1.1.2 Qualidade físico-química do leite

1.1.2.1 pH

A análise de pH é utilizada para verificação da acidez no leite, para sua determinação são quantificados os prótons de hidrogênio livres. Existe uma relação

inversa entre os valores de pH e acidez do leite (SILVA; TORRES, 1995). Esse parâmetro pode ser utilizado com o objetivo de verificar o estado de conservação das amostras de leite armazenadas (BRASIL et al., 1999).

O valor do pH do leite fresco, oriundo de boas amostras, encontra-se entre 6,6 – 6,7. Se este valor for menor que 6,4, pode ser indicativo de amostras mal conservadas e que seus resultados poderão ser imprecisos. (FOSS, 2008).

Quando o leite encontra-se ácido não resiste aos tratamentos térmicos geralmente utilizados pelas indústrias (FREIRE et al., 2006). Todos os fenômenos fermentativos, processos de formação da manteiga, precipitação de proteínas e o resultado da pasteurização, dependem do pH do leite, sendo este, portanto, um parâmetro de grande importância na tecnologia do leite (PEREIRA et al., 2000).

1.1.2.2 Ponto de congelamento

A crioscopia do leite corresponde à medição do ponto de congelamento como forma de detectar fraude por adição de água. O ponto de congelamento é determinado, principalmente, pelos elementos solúveis do leite, em especial a lactose. O valor normal da crioscopia é de $-0,531\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($-0,550\text{ }^{\circ}\text{H}$), para um leite com 12,5% de extrato seco total, 4,75% de lactose e 0,1% de cloretos (SANTOS; FONSECA, 2007).

O ponto de congelamento pode ser expresso em graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$) ou graus Hortvet ($^{\circ}\text{H}$). Julius Hortvet, durante a década de 20, foi o pioneiro na utilização da avaliação da temperatura de congelamento do leite para detectar fraudes por adição de água. Durante a década de 60, um grande estudo americano serviu de base para fixar os padrões de referência para esta característica. Para tal, utilizou-se a escala Hortvet, gerando grande confusão ao se pensar que ela era semelhante à escala Celsius. Hoje se sabe que amostras de leite avaliadas pela escala Hortvet geram resultados 3,7% maiores que aqueles avaliados pela escala Celsius (LORENZETTI, 2006). Para conversão entre as escalas $^{\circ}\text{C}$ e $^{\circ}\text{H}$ utiliza-se as seguintes fórmulas: $^{\circ}\text{C}=0,96418^{\circ}\text{H}+0,00085$ / $^{\circ}\text{H}=1,03711^{\circ}\text{C}-0,00085$ (SANTOS; FONSECA, 2007).

A relativa constância do ponto de congelamento do leite, sua variação proporcional à quantidade de substância adicionada, aliadas à relativa facilidade de sua determinação, quando comparadas com outras propriedades coligativas das soluções, fizeram com que o ponto de congelamento do leite se tornasse o método universalmente aceito para a constatação de fraude por adição de água (BRASIL et al., 1999).

Pequenas quantidades de água adicionadas ao leite fazem o ponto de congelamento aproximar-se de zero grau Celsius. Ponto de congelamento acima de $-0,512^{\circ}\text{C}$ sugere alguma adição de água, enquanto que leite com ponto de congelamento acima de $-0,507^{\circ}\text{C}$ é considerado adulterado. Já a diminuição do ponto de congelamento abaixo de $-0,531^{\circ}\text{C}$ indica adulteração pela adição de sacarose, soro de queijo, urina, conservantes ou outros solutos (LORENZETTI, 2006). O ponto de congelamento é um dos parâmetros analíticos de precisão utilizados para determinar a integridade da matéria-prima. Como mencionado anteriormente, o ponto de congelamento é um valor diretamente ligado ao extrato seco do leite, mais especificamente em relação à presença, maior ou menor, de lactose e cloretos. Em virtude disto, o mesmo é utilizado como um dos critérios para desclassificação nas empresas processadoras (BECHI, 2004).

O ponto de congelamento pode sofrer influência da fase de lactação, estação do ano, clima, latitude, alimentação e raça (SANTOS; FONSECA, 2007). Estudos realizados por Henno et al., (2008) também constataram que o ponto de congelamento não é inteiramente constante e sofre influência de fatores relacionados à variação no ambiente, gerenciamento e raça.

A legislação europeia tem estabelecido que o leite de vaca para consumo humano deve dispor de valores para o ponto de congelamento não superior a $-0,520^{\circ}\text{C}$ (EUROPEAN COMMUNITY, 1992). No entanto, dada a variação possível, determinou ainda, que esse leite deve ter uma estreita relação com a média dos valores do ponto de congelamento para cada região (EUROPEAN COMMUNITY, 1997). Nos Estados Unidos, a legislação estabelece que esse valor não seja superior a $-0,510^{\circ}\text{C}$ (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2002). E no Brasil a IN 51 estabelece o limite máximo aceitável de $-0,512^{\circ}\text{C}$ para o índice crioscópico do leite cru (BRASIL, 2002b).

1.1.3 Metodologias para análises de pH e crioscopia

1.1.3.1 Metodologia de referência para análise de pH

Os processos que avaliam o pH são colorimétricos ou eletrométricos. Os primeiros são processos de aplicação limitada, pois as medidas são aproximadas e indiretas. Nos processos eletrométricos, empregam-se potenciômetros especialmente adaptados que permitem uma determinação direta, simples e precisa do pH (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

1.1.3.2 Metodologia de referência para análise do ponto de congelamento

O método crioscópico *thermistor* é recomendado pelos padrões da International Dairy Federation (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2002) como referência para determinação do ponto de congelamento do leite. Nesse método, a amostra é rapidamente resfriada a alguns graus abaixo do seu ponto de congelamento, sob constante agitação. A vibração resultante ocasiona um desequilíbrio térmico no interior da amostra, fazendo com que a solução libere calor de fusão. A temperatura sobe até atingir o ponto de congelamento, permanecendo constante por algum tempo. Este tempo é denominado *plateau*, durante o qual se faz a leitura do ponto de congelamento (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Atualmente, os crioscópicos eletrônicos são amplamente utilizados na determinação do índice crioscópico ou ponto de congelamento. As soluções para calibração do equipamento geralmente utilizadas são as de cloreto de sódio e de sacarose, podendo ser utilizada também a água. A calibração do equipamento fornece uma referência confiável ao circuito eletrônico do crioscópio para que os resultados, dentro da faixa de calibração, sejam válidos. Recomenda-se que sejam realizadas três medições para cada amostra. Os resultados dos testes devem ser próximos, com uma tolerância de mais ou menos 0,002°C ou 0,002°H (Hortvet), conforme a especificação do aparelho (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

1.1.3.3 Metodologia no infravermelho com Transformada de Fourier

A metodologia no Infravermelho com Transformada de Fourier (ITF) vem sendo utilizada para determinação de diversas análises em alimentos (CHE MAN; SETIOWATY, 1999; KOCA et al., 2007; ROOS et al., 2007). Segundo ARAÚJO (2007), até o início dos anos 80, a maioria dos instrumentos para análise na região do infravermelho era do tipo dispersivo, baseados em redes de difração. Com o surgimento dos equipamentos interferométricos, a utilização da operação matemática conhecida como Transformada de Fourier, que calcula espectros obtidos a partir de um interferograma, aumentou significativamente.

Os interferômetros são constituídos de um divisor de feixes (beam splitter), um espelho fixo e outro móvel. A radiação proveniente da fonte passa através do divisor de feixes, que transmite metade do feixe para o espelho móvel e a outra metade para o espelho fixo. Estes dois feixes são refletidos nos dois espelhos e recombinados de forma construtiva ou destrutiva no “beam splitter”, dependendo da posição do espelho móvel em relação ao espelho fixo. O feixe resultante passa através da amostra, onde ocorrem as absorções, e prossegue até o detector. Após o interferograma ser detectado e armazenado, aplica-se a Transformada de Fourier, de modo a converter os dados.

1.1.4 Correlação entre as metodologias

Atualmente, a metodologia no infravermelho faz parte da rotina dos laboratórios de qualidade do leite. A Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier, no entanto, é uma tecnologia mais recente, que visa melhorar a eficiência nos resultados das análises. Na literatura, são poucos os trabalhos que comparam o uso da ITF com a metodologia de referência para as análises do ponto crioscópico e pH do leite. Em trabalho conduzido na Espanha, realizado por Sánchez et al. (2007), a

metodologia ITF foi avaliada para análises do ponto de congelamento em leite de cabras, sendo comparado à metodologia de referência sob diferentes condições de conservantes químicos e adição de água nas amostras. Os resultados desse trabalho foram favoráveis à utilização da nova metodologia. No Brasil essa metodologia para análises de leite ainda não foi implementada.

1.1.5 Conservação das amostras

Em muitos países, a adição de conservantes se faz necessária. No Brasil, em função do grande número de fazendas e da extensão territorial, torna-se inviável a coleta e análise em 48 horas, recorrendo-se à utilização de conservantes no processo (CASSOLI, 2005).

Como estratégias de conservação tem-se utilizado, principalmente, a adição de conservantes químicos associados ao abaixamento da temperatura da amostra. O bronopol é um conservante amplamente utilizado na conservação de amostras para análises de composição e contagem de células somáticas (MONARDES et al., 1996; GONZALO et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2005). A sua concentração na conservação das amostras para análises do ponto de congelamento foi avaliada em leite de cabra (SÁNCHEZ et al., 2007). No Brasil o bronopol (Microtabs[®]) é utilizado na forma de pastilhas contendo 8mg de bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) e 0,3mg de natamicina (D&F CONTROL SYSTEMS, 2009).

Além do bronopol, o abaixamento da temperatura das amostras é, também, um fator importante na conservação da mesma (SÁNCHEZ et al., 2005). Segundo Cassoli (2005), é importante a manutenção constante da temperatura durante o transporte das amostras, evitando-se o congelamento ou o aquecimento. Sem o uso do conservante químico, recomenda-se que as amostras sejam refrigeradas e não ultrapassem temperaturas superiores a 4°C (SÁNCHEZ et al., 2005; SIERRA et al., 2006).

O tempo decorrido entre a coleta da amostra e sua análise influencia diversos resultados. Segundo Sierra et al. (2006), o tempo recomendado é de até quatro dias

para análises de CCS. Foram reportados, por Meyer (2003) e Cassoli (2005), resultados precisos para teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e CCS, até sete dias após a coleta das amostras, independentemente da temperatura de armazenamento, desde que conservadas com bronopol.

O grande interesse em conhecer os efeitos da conservação das amostras sobre os resultados, dos diversos parâmetros, está em poder utilizar uma única amostra para realização das análises e, com isso, melhorar a logística no procedimento de coleta.

Em análises do ponto de congelamento, esses efeitos ainda são poucos investigados. Segundo Sánchez et al. (2007), a utilização do conservante bronopol não interfere nos resultados das análises em leite de cabras. Nesse estudo os efeitos de temperatura e idade da amostra não foram investigados. Ainda não existem na literatura trabalhos que avaliem esses efeitos sobre o ponto de congelamento e pH do leite cru.

Referências

ARAÚJO, T.P. **Emprego de espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos para a análise de tetraciclinas em leite bovino**. 2007. 96 p.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

BECCHI, C.S. Estudo do índice crioscópico do leite tipo B in natura produzido na bacia leiteira do Vale do Taquarí, RS. **Acta Scientiae Veterinarie**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 161-162, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 18/04/2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 abr. 2002a. Seção I, p. 3.

_____. Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002b. Seção I, p. 13-22.

BRASIL, L.H.A.; BONASSI, I.A.; BACCARI JUNIOR, F.; WECHSLER, F.S. Efeito da temperatura ambiental da densidade e ponto de congelamento do leite de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n.3, p. 333-337, set. 1999.

CASSOLI, L.D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. 2005. 46 p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

CHE MAN, Y.B.; SETIOWATY, G. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to determine free fatty acid contents in palm olein. **Food Chemistry**, Davis, v. 66, p. 109-114, Nov. 1999.

D&F CONTROL SYSTEMS. **MicrotabsII**. Disponível em: <http://browse.uk-plc.net/Companies/Sampling_Solutions_Ltd/products/Broad_Spectrum_Microtabs_II.htm> Acesso em: 06 abr. 2009.

EUROPEAN COMMUNITY. Council Regulation (EC) no.2597/1997 of 18 December 1997. Laying down additional rules on the common organization of the market in milk and milk products for drinking milk. **Official Journal of European Community**, Washington, v. 351, p. 13–15, 1997.

_____. Council Directive 92/46/ECC of 16 June 1992. Laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. **Official Journal of European Community**, Washington, v. 268, p. 1–32, 1992.

FREIRE, M.F.; CORTEZ, M.A.S.; SILVA, A.C.O.; RISTOW, A.M.; KASNOWSKI, M. C.; CORTEZ, N.M.S. Características físico-químicas do leite cru refrigerado entregue em uma cooperativa no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 13, n. 2, p. 71-75, agosto 2006.

FOSS: pH measurement. Disponível em: <<http://www.foss.dk/Extras/SearchResults.aspx?search=ph%20measurement>> Acesso em: 10 nov. 2008.

GONZALO, C.; BOIXO, J.C.; CARRIEDO, J.A.; SAN PRIMITIVO, F. Evaluation of rapid somatic cell counters under different analytical conditions in ovine Milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 11, p. 3623-3628, June 2004

HENNO, M.; OTS, M.; JÕUDU, I.; KAART, T.; KÄRT, O. Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. **International Dairy Journal**, Londres, v. 18, p. 210-215, Aug. 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em: <<http://www.inia.gov.br/html/>>. Acesso em: 15 dez. 2008.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk and milk products**: definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. Brussels, 1999. 12 p. (IDF Standard, 128A).

_____. **Milk**: determination of freezing point. Thermistor cryoscope method (reference method). Brussels, 2002. 12 p. (IDF Standard 108/ISO 5764).

KOCA, N.; RODRIGUEZ-SAONA, L.E.; HARPER, W.J.; AWAREZ, V.B. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for monitoring short-chain free fatty acids in swiss cheese. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 90, n. 8, p. 3503-3603, abr. 2007.

LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotóxicos no leite cru de dois Estados da região sul**. 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MARTINS, P.C.; YAMAGUCHI, I.C.T.; ARCURI, B.B.; ARCURI, E.F. Pagamento por qualidade no Brasil: motivações e obstáculos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: UPF Editora, 2004. p. 87-104.

MEYER, P.M. **Fatores não nutricionais que afetam as concentrações de nitrogênio uréico no leite**. 2003. 131 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagem) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MONARDES, H.G.; MOORE, R.K.; CORRIGAN, B.; RIOUX, Y. Preservation and storage mechanisms for raw milk samples for use in milk-recording schemes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 2, p. 151-154, 1996.

PEREIRA, D.B.C.; OLIVEIRA, L.L.; COSTA JÚNIOR, L.C.G.; SILVA, P.H.F. da. **Físico-química do leite e derivados**: métodos analíticos. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora, 2000. 190 p.

ROOS, A.P.W.; VAN DEN BIJGAART, H.J.C.M.; HORLYK, J.; JONG, G. Screening for subclinical Ketosis in dairy cattle by Fourier Transform Infrared Spectrometry. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 90, n. 4, p. 1761-1766, Dec. 2007.

SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; CORRALES, J.C.; LA FE, C.; MORALES, C.T. Evaluation of the Milkoscan FT 6000 milk analyzer for determining the freezing point of goat's milk under different analytical conditions. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 90, n. 7, p. 3153-3161, Mar. 2007.

SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; CORRALES, J.C.; MORALES, C.T.; CONTRERAS, A.; GONZALO, C. Influence of storage and preservation on Fossomatic cell count and composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 9, p. 3095-3100, June 2005.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: MANOLE, 2007. 314 p.

SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; LUENGO, C.; CORRALES, J.C.; MORALES, C.T.; CONTRERAS, A. GONZALO, C. Temperature effects on Fossomatic cell counts in goats milk. **International Dairy Journal**, Londres, v. 16, p. 385-387, Apr. 2006.

SILVA, P.H.F.; TORRES, K.F. Acidez, pH e efeitos tampão no leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 296, p. 33-41, nov. 1995.

2 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE CRU PARA DETERMINAÇÃO DO pH E DO PONTO DE CONGELAMENTO UTILIZANDO O INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Resumo

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar os efeitos das diferentes condições de conservação em amostras de leite bovino para posterior análise do pH e do ponto de congelamento (PC) utilizando a metodologia do Infravermelho com Transformada de Fourier. Para tanto, foram coletadas, do tanque de 57 propriedades, amostras de três litros de leite. Cada amostra foi subdividida e transferida para 45 frascos de 40mL e distribuídas de acordo com a temperatura de armazenamento (-30°C - Congelado; 7°C – Resfriado; 25°C - Ambiente), idade da amostra (0, 3, 6 e 9 dias) e níveis de adição de água (0, 2, 4 e 6%). Foram adicionadas pastilhas de bronopol (Microtabs[®]) aos 44 frascos, sendo que um foi mantido sem adição do conservante para tratamento controle. O pH e o PC foram determinados pela metodologia de referência por meio do potenciômetro (QUIMIS[®]) e do crioscópio eletrônico (ITR[®]) e pela metodologia alternativa usando o equipamento MilkoScanTM FT+ (FOSS). Os resultados obtidos em cada metodologia, considerando as diferentes condições de conservação das amostras, e ainda, o efeito da adição do bronopol, foram avaliados por comparação de médias. As metodologias (referência e alternativa) foram correlacionadas em função da idade da amostra para o PC por análise de regressão linear. A sensibilidade e a especificidade foram calculadas para avaliação do desempenho do equipamento MilkoScanTM FT+ na detecção de água. A adição do bronopol não alterou as médias de pH, porém reduziu significativamente o PC. Para eliminação desse efeito, foram calculados fatores de correção para os resultados do PC nas duas metodologias empregadas nesse estudo. O aumento da temperatura de armazenamento reduziu significativamente as médias de pH e do PC em amostras com seis e nove dias de coleta. Não houve efeito significativo nas médias de pH e do PC com o aumento na idade da amostra a -30° e 7°C. As correlações entre as metodologias em função da idade da amostra para o PC foram altas e significativas. A sensibilidade e especificidade do equipamento MilkoScanTM FT+ na detecção de água, em relação ao crioscópio eletrônico, foram de 90,9% e de 86,8%, respectivamente.

Palavras-chave: Conservação de amostras; Leite de tanques; Ponto de congelamento.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the effects of different storage conditions on samples of bovine milk for later analysis of pH and freezing point (FP) using the methodology of the Fourier Transform Infrared. Thus, samples of three liters of milk were collected from 57 bulk tank properties. Each sample was divided and transferred to 45 vials of 40mL and distributed according to storage temperature (-30°C - Frozen, 7°C - Cold, 25°C - Environment), age of the sample (0, 3, 6 and 9 days) and levels of added water (0, 2, 4 and 6%). Tablets of bronopol (Microtabs[®]) were added to 44 bottles, of which one was maintained without addition of preservative treatment to control. The pH and PC were determined by the reference methods using the potentiometer (QUIMIS[®]) and the thermistor cryoscope (ITR[®]) and the alternative methodology using equipment MilkoScan[™] FT+ (FOSS). The results for each method, considering the different conditions of storage of samples, and the effect of adding bronopol were evaluated by comparison of means. The methods (reference and alternative) were correlated with age of the sample to the PC via linear regression analysis. The sensitivity and specificity were calculated to evaluate the performance of MilkoScan[™] FT+ for detecting water. The addition of bronopol did not alter the average pH, but significantly reduced the PC. To combat this effect, were calculated correction factors for the results of the PC in the two methodologies employed in this study. Increasing the temperature of storage significantly reduced the average pH and the PC samples with six and nine days of collection. There was no significant effect on mean pH and the PC with the increasing age of the sample at -30°C and 7°C. The correlations between the methods depending on the age of the sample for the PC were high and significant. The sensitivity and specificity of the equipment MilkoScan[™] FT+ in the detection of water, in relation the thermistor cryoscope, were 90.9% and 86.8% respectively.

Keywords: Bulk tank; Freezing point; Preservation of samples

2.1 Introdução

O pH e o ponto de congelamento (PC) do leite cru são dois parâmetros utilizados no controle de qualidade das indústrias (GLAESER, 2003). O primeiro parâmetro verifica a acidez no leite, e, ainda, pode ser um importante indicador de amostras mal conservadas (FOSS, 2008). O segundo é usado para detectar a adição de água no leite, seja ela realizada de forma fraudulenta (HENNO et al., 2008) ou pela ineficiência na operação dos sistemas de ordenha (RASMUSSEN et al., 2002).

O leite cru com teores mais elevados de água e acidificado torna-se indesejado, pois causa impacto direto no rendimento de produtos processados, o que confere prejuízos significativos às indústrias (GIGANTE, 2004).

A metodologia de referência empregada para determinação do pH envolve o uso de aparelhos potenciométricos (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), enquanto que a metodologia de avaliação do PC envolve crioscópios eletrônicos (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2002). Estas metodologias, no entanto, limitam o atendimento da demanda por elevado número de análises por serem empregadas em aparelhos com reduzida capacidade analítica (OLIVEIRA et al., 2006). Em função disso, os laboratórios têm buscado novas metodologias compatíveis com equipamentos mais rápidos e precisos. Uma delas é a metodologia no infravermelho (BERTRAND, 1996; GONZALO et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2005). Esta metodologia ganhou novo impulso, recentemente, com o surgimento dos equipamentos interferométricos, tornando possível empregar, por meio de espectrofotômetros, a operação matemática conhecida como Transformada de Fourier para calcular espectros obtidos a partir de um interferograma (ARAÚJO, 2007). O equipamento MilkoScanTM FT+ (FOSS) baseia-se na tecnologia do Infravermelho com Transformada de Fourier (ITF), e é capaz de fornecer, em uma única amostra de leite, resultados de proteína, caseína, gordura, lactose, sólidos totais, uréia, pH, ácidos graxos livres e ponto de congelamento.

Esta metodologia, no entanto, para que possa ser utilizada com confiabilidade, precisa ser avaliada nas condições locais (BARBANO; CLARK, 1989). Segundo a International Dairy Federation (1999) e Brasil (2002), outros métodos podem ser utilizados para as análises de leite, desde que sejam conhecidos os seus desvios e correlações em relação aos respectivos métodos de referência, bem como os efeitos das condições analíticas para controle intra e interlaboratorial.

Como parte desta validação deve-se estudar o impacto do uso de conservantes das amostras sobre os resultados obtidos nestes equipamentos. Como estratégias de conservação tem-se utilizado, principalmente, a adição de conservantes químicos associados ao abaixamento da temperatura da amostra. Estudos têm sido conduzidos para análise desses efeitos, porém a maioria contempla somente os parâmetros de

composição e de CCS (BERTRAND, 1996; SÁNCHEZ et al., 2005). Existem poucos trabalhos na literatura investigando os efeitos da conservação das amostras sobre os resultados de pH e do PC (OLIVEIRA et al., 2006; SÁNCHEZ et al., 2007).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos do bronopol, da temperatura de armazenamento e da idade da amostra sobre os resultados de pH e do ponto de congelamento, analisados pelas metodologias de referência e alternativa (ITF), em amostras de leite cru bovino.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Coleta e conservação das amostras de leite

Foram coletadas amostras de leite de tanques de 57 propriedades localizadas na região sudeste. O leite de cada propriedade foi homogeneizado e em seguida transferido para um galão limpo e seco com 3.000mL de capacidade. Todas as amostras foram encaminhadas para o laboratório da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

A amostra de leite de cada propriedade foi subdividida e transferida para 45 frascos, com 40mL de capacidade, e distribuídas num arranjo fatorial com três temperaturas de armazenamento, quatro tempos de análise e quatro níveis de adição de água. Em todos os frascos foi adicionado o conservante químico bronopol (Microtabs[®]) na concentração de 0,02mg por cada mL de leite (SSL, 2009) com exceção de um frasco que foi mantido sem o conservante para tratamento controle.

Foram testadas três temperaturas de armazenamento: congelamento a -30°C (C), resfriamento a 7°C (R) e temperatura ambiente a 25°C (A). Para o tempo decorrido entre a coleta e a análise (idade da amostra) foram testadas quatro situações: zero (D0), três (D3), seis (D6) e nove (D9) dias. E ainda, foram testadas quatro níveis de adição de água: zero (0%), dois (2%), quatro (4%) e seis (6%). Os tratamentos controle

considerados foram amostras mantidas a temperatura de 7°C (R), com idade da amostra igual a três dias (D3) e sem adição de água (0%).

2.2.1.2 Análise laboratorial

Cada amostra foi analisada quanto ao pH e quanto ao ponto de congelamento (PC), primeiramente pela metodologia de referência e em seguida pela metodologia alternativa (ITF). As análises foram realizadas em réplicas. O ponto de congelamento pela metodologia de referência foi determinado utilizando-se o crioscópio eletrônico MK 540 FLEX (ITR[®]). Este equipamento possui um sistema de resfriamento através do transdutor elétrico que determina o ponto de congelamento do leite com leitura direta no display. As análises de pH pela metodologia de referência foram realizadas por meio do titulador potenciométrico automático digital Q-799 (QUIMIS[®]), especialmente adaptado ao eletrodo de vidro, permitindo leitura direta no dispositivo digital. Pela metodologia alternativa, ambos os parâmetros foram determinados no Infravermelho com Transformada de Fourier (ITF), utilizando-se o equipamento MilkoScan[™] FT+ (FOSS). Durante o experimento, os equipamentos foram calibrados de acordo com especificações internacionais (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2002). Os resultados do ponto de congelamento fornecidos pela metodologia de referência foram convertidos para escala Celsius (°C), através da equação: $C^{\circ} = 0,96418^{\circ}H - 0,00085$.

2.2.1.3 Análise estatística

Os dados de pH e do ponto de congelamento foram analisados por comparação de médias usando o PROC GLM (SAS, 1999). Para os resultados do ponto de congelamento foram calculados fatores de correção para eliminação do efeito da adição do bronopol (Microtabs[®]), e, para verificar a confiabilidade dessas estimativas, foram calculados os intervalos de confiança com probabilidade de 0,95. A análise da variância foi realizada considerando-se os efeitos de temperatura, idade da amostra,

adição de água e suas interações. No desdobramento da análise estatística foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade nas interações (temperatura x idade da amostra) para o pH e nas interações (adição de água x temperatura x idade da amostra) para o ponto de congelamento. Foi realizada a análise de regressão linear para os resultados do ponto de congelamento, obtidos pelas duas metodologias, considerando o efeito idade da amostra, utilizando o PROC REG (SAS, 1999).

Para verificação da validade do equipamento MilkoScanTM FT+ (alternativo) na detecção de água, em relação ao crioscópio eletrônico (referência), foram calculadas a sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivo e negativo segundo GORDIS (2004), sendo utilizado como ponto de corte o valor de $-0,512^{\circ}\text{C}$, estabelecido como limite máximo pela IN 51 para o ponto de congelamento.

2.2.2 Resultados e Discussão

2.2.2.1 Efeito do bronopol

A Tabela 1 mostra as comparações de médias para o pH e para o ponto de congelamento (PC) dentro de cada metodologia, considerando o efeito da adição do bronopol (Microtabs[®]).

Independentemente da metodologia analítica utilizada, não houve efeito significativo do bronopol sobre os resultados de pH. No entanto, o bronopol reduziu significativamente os valores do PC avaliados na metodologia convencional e na alternativa. Resultados semelhantes foram constatados por Oliveira et al. (2006) ao se avaliar o efeito da adição de pastilhas do mesmo conservante sobre o ponto de congelamento em leite bovino. Segundo Shipe (1959), essa redução pode ser explicada por alterações na osmolaridade do leite atribuída ao aumento dos constituintes hidrossolúveis das amostras; essa mesma justificativa foi utilizada por Sánchez et al. (2007). Segundo os autores, cada pastilha de bronopol comercial contém 0,30mg de natamicina que possui atividade *in vitro* contra leveduras e fungos

filamentosos, e isto pode contribuir para o aumento dos constituintes hidrossolúveis, reduzindo os valores de PC.

Tabela 1 – Comparação de médias para o pH e ponto de congelamento (PC) considerando a adição do bronopol (Microtabs[®]) e a metodologia analítica utilizada

Metodologia analítica	Adição do bronopol	Média ¹ pH	Média ¹ PC, (°C)
Metodologia de Referência ²	Não	6,70 (0,041) ^A	-0,519 (0,009) ^A
	Sim	6,70 (0,050) ^A	-0,532 (0,011) ^B
Metodologia Alternativa ³	Não	6,66 (0,058) ^a	-0,521 (0,009) ^a
	Sim	6,67 (0,034) ^a	-0,532 (0,009) ^b

¹Médias seguidas por letras maiúsculas e iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), dentro da metodologia de referência. ¹Médias seguidas por letras minúsculas e iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), dentro da metodologia alternativa. ²Titulador potenciométrico Q-799 (QUIMIS[®]), para pH. ²Crioscópio eletrônico MK540 (ITR[®]), para PC. ³MilkoScanTM FT+ (FOSS[®]), para pH e PC.

Foram calculados fatores de correção para corrigir os efeitos da adição do conservante sobre o PC. O fator de correção para o método de referência (FCR) foi de 0,013°C, enquanto que o fator de correção para o método alternativo (FCA) foi de 0,011°C. Para a avaliação da confiabilidade dos fatores de correção, foram calculados os intervalos de confiança com probabilidade de 95%. Na Tabela 2, estão apresentados os intervalos de confiança para cada fator. Considerando a confiabilidade estimada, ambos os fatores podem ser utilizados para correção dos resultados do ponto de congelamento em amostras conservadas com bronopol (Microtabs[®]).

Tabela 2 – Fator de correção e o intervalo de confiança para cada metodologia

Metodologia analítica	N	Média ¹ PC, (°C)	IC95% ⁴
Metodologia de Referência ²	56	0,013 (0,003)	0,012 – 0,014
Metodologia Alternativa ³	56	0,011 (0,003)	0,010 – 0,011

¹Média e desvio-padrão da diferença calculada a partir dos valores de PC com e sem adição do conservante bronopol (Microtabs®). ²Crioscópio eletrônico (MK540 – ITR®). ³MilkoScan™ FT+ (FOSS). ⁴Intervalo de confiança em nível de 95%.

2.2.2.2 Efeito da temperatura e tempo de armazenamento

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da análise da variância para o pH e o PC. Os efeitos da temperatura de armazenamento, idade da amostra e suas interações contribuíram significativamente para a variação nos resultados do pH e do PC.

A partir do efeito significativo das interações, observadas na análise da variância, realizou-se o desdobramento da interação dupla (Temperatura x Idade da amostra) para variável pH, e posteriormente, realizou-se o desdobramento da interação tripla (Adição de água x Temperatura de armazenamento x Idade da amostra) para variável ponto de congelamento.

Tabela 3 – Análise da variância para o pH e ponto de congelamento (°C), considerando os efeitos temperatura de armazenamento, idade da amostra, adição de água e suas interações

Causas da variação	GL	pH	Ponto de congelamento
Fazenda	56	<0,0001 ^{***}	<0,0001 ^{***}
Método (M)	1	<0,0001 ^{***}	NS
Adição de água (A)	3	0,0005 [†]	<0,0001 ^{***}
Temperatura de armazenamento (T)	2	<0,0001 ^{***}	<0,0001 ^{***}
Idade da amostra (IDA)	3	<0,0001 ^{***}	<0,0001 ^{***}
A x T	6	NS	NS
A x IDA	9	NS	NS
T x IDA	5	<0,0001 ^{***}	NS
A x T x IDA	15	NS	0,0046 [†]
A x T x IDA x M	15	NS	NS

^{NS} p>0,05; [†] p≤0,05; ^{**} p≤0,01; ^{***} p≤0,001.

Na Tabela 4 são apresentadas as médias de pH das amostras submetidas aos vários tratamentos. Observa-se que houve interação entre a temperatura de armazenamento e a idade da amostra sobre os resultados de pH. As médias em amostras congeladas (C) e ambiente (A) foram significativamente mais baixas que as médias das amostras controle resfriadas (R). A idade da amostra influenciou os resultados de pH apenas quando as amostras foram submetidas à temperatura ambiente (A). Isso sugere que amostras de leite necessitam de resfriamento, mesmo que estejam conservadas com o bronopol, pois o pH apresentou-se mais baixo nessas condições. Possivelmente, com o aumento na idade da amostra, houve crescimento microbiano a partir da lactose, com produção de ácido láctico, resultando em abaixamento do pH (SANTOS; FONSECA, 2007).

Tabela 4 – Comparação de médias do pH sob diferentes condições de conservação das amostras

Temperatura ¹	Idade da amostra ²			
	0	3	6	9
-30°C		6,637 ^{aB}	6,631 ^{aB}	6,647 ^{aB}
7°C	6,687 ^{aA}	6,664 ^{aA}	6,657 ^{aA}	6,666 ^{aA}
25°C	6,693 ^{aA}	6,626 ^{bB}	6,570 ^{cC}	6,541 ^{cC}

Médias seguidas de letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), considerando Idade da amostra; Médias seguidas de letras maiúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), considerando Temperatura; ¹C = Congelado (-30°C); R = Resfriado (7°C); A = Ambiente (25°C); ²D0 = amostra de 0 dia; D3 = amostra de 3 dias; D6 = amostra de 6 dias; D9 = amostras de 9 dias.

Na Tabela 5 estão apresentadas as médias dos valores de PC das amostras submetidas aos diferentes tratamentos. Considerando o efeito da temperatura de armazenamento, verificou-se que houve redução do PC à medida que a temperatura aumentou, independentemente do nível de adição de água. As médias do PC para amostras congeladas e ambiente não diferiram das amostras resfriadas (controle), com exceção das amostras sem adição de água e com idade da amostra de nove dias, quando houve um efeito da temperatura sobre o PC.

Quando se compara as médias das amostras congeladas e ambiente, entre si, observa-se diferenças estatísticas. Isso mostra que devem ser evitadas condições extremas para temperatura de armazenamento, pois podem comprometer a integridade das amostras e conseqüentemente os resultados para o PC; o mesmo foi constatado por Demott e Burch (1966).

Apesar das médias de PC das amostras congeladas não diferirem das médias de PC das amostras controle, amostras congeladas devem ser evitadas, pois baixas temperaturas podem causar alterações na composição físico-química do leite (SHIPE, 1959). Também, não se deve conservar amostras à temperatura ambiente, mesmo que adicionadas de bronopol, para serem analisadas a partir de nove dias de armazenamento como se observa na tabela 5.

Tabela 5 – Comparação de médias do ponto de congelamento (°C) sob diferentes condições de conservação das amostras

Adição de água ¹	Idade da amostra ²	-30°C ³	7°C ³	25°C ³
0	0		-0,532 ^{aA}	-0,533 ^{aA}
	3	-0,535 ^{aA}	-0,535 ^{aA}	-0,537 ^{abA}
	6	-0,530 ^{aA}	-0,533 ^{aAB}	-0,536 ^{abB}
	9	-0,533 ^{aA}	-0,536 ^{aA}	-0,542 ^{bB}
2	0		-0,518 ^{aA}	-0,519 ^{aA}
	3	-0,521 ^{aA}	-0,521 ^{aA}	-0,523 ^{abA}
	6	-0,517 ^{aA}	-0,518 ^{aA}	-0,523 ^{abA}
	9	-0,519 ^{aA}	-0,522 ^{aAB}	-0,527 ^{bB}
4	0		-0,506 ^{aA}	-0,508 ^{aA}
	3	-0,509 ^{aA}	-0,511 ^{aA}	-0,510 ^{aA}
	6	-0,505 ^{aA}	-0,506 ^{aA}	-0,509 ^{aA}
	9	-0,508 ^{aA}	-0,511 ^{aAB}	-0,516 ^{bB}
6	0		-0,490 ^{aA}	-0,492 ^{aA}
	3	-0,489 ^{aA}	-0,495 ^{aA}	-0,493 ^{aA}
	6	-0,485 ^{aA}	-0,490 ^{aAB}	-0,495 ^{aB}
	9	-0,491 ^{aA}	-0,491 ^{aA}	-0,494 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), considerando idade da amostra; Médias seguidas de letras maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), considerando Temperatura; ¹0-6 = Porcentagem de adição de água na amostras; ²D0 = amostra de 0 dia; D3 = amostra de 3 dias; D6 = amostra de 6 dias; D9 = amostras de 9 dias. ³C = Congelado (-30°C); R = Resfriado (7°C); A = Ambiente (25°C).

2.2.2.3 Avaliação da metodologia alternativa

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados da análise de regressão entre as metodologias de referência e alternativa para cada idade da amostra. Para todas as idades estudadas, o coeficiente de determinação obtido foi superior a 0,99, indicando forte correlação positiva entre os resultados do PC para as duas metodologias. Os coeficientes de regressão foram significativos ($p < 0,05$) e a acurácia do equipamento MilkoScanTM FT+, expressa pelo desvio padrão residual ($S(y,x)$), apresentou valores dentro das especificações técnicas fornecidas pelo fabricante, que sugere um limite máximo de 0,004°C.

Tabela 6 – Coeficiente de regressão (b), intercepto (a) e valores de R^2 para análise de regressão do ponto de congelamento ($^{\circ}\text{C}$) obtido pela metodologia de referência (ITR) e alternativa (MilkoScan) em função da idade de amostra

Idade da amostra ¹	b	a	R^2	Syx ($^{\circ}\text{C}$)
D0	0,9580***	22,22	0,9978	0,0036
D3	0,9798***	13,12	0,9913	0,0036
D6	0,9199***	38,06	0,9951	0,0036
D9	1,0292***	-9,58	0,9895	0,0035

¹D0 = amostra de 0 dia; D3 = amostra de 3 dias; D6 = amostra de 6 dias; D9 = amostras de 9 dias.
^{NS} $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Os resultados encontrados para sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo quando se comparou a metodologia alternativa com a convencional utilizando-se amostras consideradas representativas das recebidas normalmente das indústrias (temperatura de 7°C , idade da amostra de três dias, com quatro níveis de adição de água e corrigidas pelo efeito da adição do bronopol) foram respectivamente 90,9%; 86,8%; 92,3% e 84,6%, indicando um bom desempenho do equipamento na detecção de água em leite bovino. Sánchez et al. (2007) também verificaram percentuais elevados na avaliação do desempenho do equipamento MilkoScan na detecção de água em amostras de leite caprino, em que os valores obtidos foram 92,7%; 98,4%; 98,5%; 90,3% respectivamente.

2.3 Conclusões

A adição do conservante químico bronopol (Microtabs[®]) nas amostras de leite cru reduziu os valores do ponto de congelamento, e não alterou os valores de pH. Amostras para análises do ponto de congelamento e de pH devem ser conservadas com bronopol, a 7°C e analisadas em até nove dias após sua coleta. O equipamento MilkoScan[™] FT+ pode ser utilizado em substituição ao método referência para detecção de água em amostras de leite bovino.

Referências

- ARAÚJO, T.P. **Emprego de espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos para a análise de tetraciclina em leite bovino**. 2007. 96 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- BARBANO, D.M.; CLARK, J.L. Instrumental methods for measuring components of Milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 72, n. 6, p. 1627-1636, Nov. 1989.
- BERTRAND, J.A. Influence of shipping container, preservative and breed on analysis of milk components of shipped samples. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 79, n. 1, p. 145-148, Oct. 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Seção I, p. 13-22.
- SAMPLING SOLUTION LTDA. **MicrotabsII**. Disponível em: <http://browse.uk-plc.net/Companies/Sampling_Solutions_Ltd/products/Broad_Spectrum_Microtabs_II.htm> Acesso em: 06 abr. 2009.
- DEMOTT, B.J.; BURCH, T.A. Influence of storage upon the freezing point of Milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 49, n. 3, p. 317-318, 1966.
- FOSS**: pH measurement. Disponível em: <<http://www.foss.dk/Extras/SearchResults.aspx?search=ph%20measurement>> Acesso em: 10 nov. 2008.
- GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2004. 1 CD-ROM.
- GLAESER, H. Control of the water content of dairy products – definition of limits, consideration of process variation, official use autocontrol data. **Food Chemistry**, Davis, v. 82, p. 121-124, 2003.
- GONZALO, C.; BOIXO, J.C.; CARRIEDO, J.A.; SAN PRIMITIVO, F. Evaluation of rapid somatic cell counters under different analytical conditions in ovine Milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n.11, p.3623-3628, jun. 2004.
- GORDIS, L. **Avaliação da validade e da confiabilidade dos testes diagnósticos e de rastreamento**: epidemiologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 314 p.
- HENNO, M.; OTS, M.; JÖUDU, I.; KAART, T.; KÄRT, O. Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. **International Dairy Journal**, Londres, v. 18, p. 210-215, Aug. 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em: <[http://www./html](http://www.idf.org/html)>. Acesso em: 15 dez. 2008.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk and milk products: definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory**. Brussels, 1999. 12 p. (IDF Standard, 128A).

_____. **Milk: determination of freezing point. Thermistor cryoscope method (reference method)**. Brussels, 2002. 12 p. (IDF Standard 108/ISO 5764).

OLIVEIRA, W.P.S.; OLIVEIRA, A.N.; MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; FERNANDES, S.D.; OLIVEIRA, R.A.; BUENO, V.F.F.; OLIVEIRA, J.P. Avaliação da metodologia de infravermelho para determinação índice crioscópico do leite cru. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2006. 1 CD-ROM.

RASMUSSEN, M.D.; BJERRING, M.; JUSTESEN, P.; JEPSEN, L. Milk quality on Danish farms with automatic milking systems. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, n. 11, p. 2869-2878, May 2002.

SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; CORRALES, J.C.; LA FE, C.; MORALES, C.T. Evaluation of the Milkoscan FT 6000 milk analyzer for determining the freezing point of goat's milk under different analytical conditions. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 90, n. 7, p. 3153-3161, Mar. 2007.

SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; CORRALES, J.C.; MORALES, C.T.; CONTRERAS, A.; GONZALO, C. Influence of storage and preservation on Fossomatic cell count and composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 9, p. 3095-3100, June 2005.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: MANOLE, 2007. 314 p.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide 9.0** (compact disc). Cary, 1999.

SHIPE, W.F. The freezing point of milk: a review. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 42, n.11, p. 1745-1761, July 1959.

3 CARACTERIZAÇÃO E VARIABILIDADE DO PONTO DE CONGELAMENTO NO LEITE DE TANQUES EM REBANHOS BRASILEIROS

Resumo

Objetivou-se com esta pesquisa caracterizar a atual situação do ponto de congelamento (PC) em rebanhos brasileiros, e avaliar o efeito da lactose e da contagem bacteriana total (CBT) sobre os resultados do PC. Para tanto, foi realizado um levantamento do PC, da lactose e da CBT de amostras de leite de tanques, no período de fevereiro a abril de 2009, pertencentes ao banco de dados do Laboratório da Clínica do Leite (ESALQ/USP). O PC e a lactose foram determinados pelo equipamento MilkoscanTM FT+ (FOSS), e, a CBT pelo equipamento BactoScanTM FC (FOSS). Foram analisados 137.443 dados por meio de estatística descritiva e de análise da variância, para caracterizar a atual situação do PC e para avaliação dos efeitos da lactose e da CBT sobre o PC. A média e o respectivo desvio-padrão do PC foi de $-0,522$ ($0,011$)°C, e, constatou-se que o percentual de amostras em conformidade com a Instrução Normativa nº 51 foi de 92,48%, enquanto que para amostras em não conformidade, com indicativo de adição de água ou de soluto, foi de 7,10% e 0,41% respectivamente. As indústrias que pagam por qualidade apresentaram menor percentual (4,65%) de amostras fora do limite estabelecido pela legislação, em relação às indústrias que não pagam (9,97%), indicando que os programas de pagamento incentivam o processo de melhoria da qualidade na matéria-prima de seus fornecedores. Na avaliação da influência da lactose e CBT sobre os níveis do PC, pode-se inferir que o PC foi significativamente afetado por ambos os fatores.

Palavras-chave: Ponto de congelamento; Transformada de Fourier; Leite de tanques

Abstract

The objective of this research was to characterize the current situation of Freezing Point (FP) in Brazilian herds and to evaluate the effect of lactose and Total Bacterial Counts (TBC) on the results of the FP. For this, a survey was conducted of the FP, TBC and lactose in milk samples from tanks, in the period from February to April 2009, belonging to the database of the Laboratory of Clínica do Leite (ESALQ/USP). The FP and lactose were determined by the equipment MilkoscanTM FT+(FOSS), and TBC by equipment BactoScanTM FC (FOSS). 137,443 data were analyzed using descriptive statistics and analysis of variance, to characterize the current state of the FP and to evaluate the effects of lactose and TBC on the FP. The mean and the standard deviation of the FP was -0.522 (0.011)°C, and found that the percentage of samples in accordance with Normative Instruction nº 51 was 92.48%, while for samples not accordance with indicative addition of water or solute, was 7.10% and 0.41% respectively. The industries that pay for quality showed the lowest percentage (4.65%) samples out of the limit set by law, in relation to those industries that do not pay (9.97%), indicating that the payment programs encourage the process of improving

quality raw milk. In evaluate the influence of lactose and TBC on the levels of FP, we can infer that the FP was significantly affected by both factors.

Keywords: Bulk tank; Freezing point; Fourier Transform

3.1 Introdução

O ponto crioscópico ou de congelamento em amostras de leite de tanques é utilizado internacionalmente como meio para detecção da fraude por adição de água (SATO et al., 1956; HENNO et al., 2008; RATTRAY; JELEN, 1996; GLAESER, 2003). No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) fiscaliza as indústrias por meio da Instrução Normativa 51 (IN 51), a qual estabelece o limite máximo legal de $-0,530$ Hortvet ($^{\circ}\text{H}$) ou $-0,512$ Celsius ($^{\circ}\text{C}$) para o ponto de congelamento do leite cru (BRASIL, 2002). As indústrias por sua vez, monitoram esse parâmetro de seus fornecedores nas plataformas (PONSANO et al., 1999), no intuito de obter matéria-prima de qualidade para melhores rendimentos na fabricação de seus produtos. Algumas delas têm incentivado o processo de melhoria, por meio dos programas de pagamento por qualidade (MACHADO, 2008).

Para auxiliar o MAPA e as indústrias no atendimento dessa demanda por análises, foi criada a Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL), que, contam com equipamentos automatizados e de alto rendimento analítico (CASSOLI, 2005). A IN 51 permite que outras metodologias de controle operacional sejam utilizadas na rotina desses laboratórios, desde que conhecidos os seus desvios e correlações em relação às respectivas metodologias de referência (BRASIL, 2002). Para confiabilidade e precisão nos resultados fornecidos, os equipamentos são constantemente aferidos e calibrados (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1999).

A IN-51 recomenda como metodologia de referência para medição do ponto de congelamento, o uso do crioscópio eletrônico (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2002). Como metodologia alternativa, pode ser utilizado o equipamento MilkoScanTM FT+ (FOSS) que realiza as análises no Infravermelho com Transformada de Fourier (ITF). Este equipamento confere mais rapidez e precisão nos resultados,

podendo analisar até 600 amostras por hora, e ainda fornecer em uma única amostra de leite, outros parâmetros como gordura, proteína bruta, caseína, lactose, sólidos, uréia, pH e, ácidos graxos livres (FOSS, 2009).

Alguns trabalhos, utilizando a metodologia de referência, têm apresentado as médias para o PC em leite bovino no Brasil, porém o número de amostras utilizadas é pouco representativa (FREIRE et al., 2006; MORETTO et al., 2008). Existem fatores que podem influenciar os níveis do PC do leite, entretanto, esta é uma característica pouco variável por estar associada ao extrato seco (BRASIL et al., 1999). Segundo Shipe (1959) a lactose em especial, contribui em torno de 75 a 80% da diminuição do PC.

A contagem bacteriana total (CBT) influencia os níveis de lactose, pois elevadas cargas microbianas produzem ácido láctico a partir da lactose (BUENO et al., 2008). Conseqüentemente, este pode ser outro fator que exerça influência indireta sobre os níveis do PC.

Com base no exposto, objetivou-se caracterizar a atual situação do ponto de congelamento em rebanhos brasileiros e avaliar o efeito da lactose e da contagem bacteriana total sobre os resultados do PC.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Coleta das amostras de leite

Foram levantados 137.443 dados do ponto de congelamento (PC), lactose e contagem bacteriana total (CBT) de amostras de leite de tanques de rebanhos brasileiros, monitorados por indústrias processadoras de lácteos, no período de fevereiro a abril de 2009, localizadas principalmente na região sudeste. Os dados foram coletados do banco de dados do laboratório da Clínica do Leite, do Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

3.2.1.2 Análise laboratorial

Para os parâmetros do ponto de congelamento e lactose utilizou-se a metodologia de análise no infravermelho com Transformada de Fourier (ITF) por meio do equipamento MilkoScan™ FT+ (FOSS). Durante o experimento, o equipamento foi calibrado para as condições locais, para isso realizou-se a correlação entre os resultados obtidos pela metodologia de referência (crioscópio eletrônico) e pela metodologia alternativa ITF (MilkoScan). A partir da equação da reta obtida, foi realizado o ajuste na equação de calibração (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1999).

Para determinação da CBT utilizou-se a metodologia de citometria de fluxo por meio do equipamento BactoScan™ FC (FOSS).

3.2.1.3 Análise estatística

Para realização da caracterização do ponto de congelamento em rebanhos brasileiros, por meio de análise descritiva dos dados, foi utilizado o procedimento MEANS (SAS, 1999). Já para avaliação dos efeitos da lactose e da contagem bacteriana total sobre o PC, foi realizada a análise da variância pelo procedimento GLM (SAS, 1999).

3.2.2 Resultados e discussão

A média, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos 137.443 dados do PC foram, respectivamente, $-0,522^{\circ}\text{C}$, $0,011^{\circ}\text{C}$ e 2,15% (Tabela 7). Os dados mostram que a maioria das amostras de leite de tanques dos rebanhos encontram-se dentro do limite máximo de $-0,512^{\circ}\text{C}$ estabelecido pela IN 51 (BRASIL, 2002). A média do PC observada foi mais alta que as obtidas em outros trabalhos no Brasil (FREIRE et al.,

2006; OLIVEIRA et al., 2006; MORETTO et al., 2008). Isso pode estar associado ao número de amostras utilizadas nas pesquisas realizadas. Segundo Freire et al. (2006), em trabalho conduzido no Estado do Rio de Janeiro, utilizando 55 amostras de leite de tanques, a média, desvio padrão e coeficiente de variação foram de $-0,537^{\circ}\text{C}$, $-0,014^{\circ}\text{C}$ e 2,70%, respectivamente. Em resultados obtidos por Oliveira et al. (2006) em um único rebanho localizado no Estado do Goiás, a média para o PC foi de $-0,531^{\circ}\text{C}$ em 60 amostras contendo o conservante químico bronopol e de $-0,524^{\circ}\text{C}$ em outras 60 sem o conservante. Enquanto Moretto et al. (2008) apresentaram média de $-0,539^{\circ}\text{C}$ para oito unidades produtoras de leite localizadas no Estado de São Paulo.

Observa-se ainda que o coeficiente de variação foi baixo (Tabela 7), ou seja, houve uma pequena variabilidade dos resultados do PC em relação à média, indicando homogeneidade no conjunto de dados.

Tabela 7 – Análise descritiva para os valores do ponto de congelamento das 137.443 amostras analisadas no período de fevereiro a abril de 2009

Descrição	PC* ($^{\circ}\text{C}$)
Média	-0,522
Desvio padrão	0,011
CV%	2,15

*MilkoScanTM FT+ (FOSS).

Além da análise descritiva do conjunto dos dados, foi realizada também uma avaliação do PC por Estados (Tabela 8), com o objetivo de caracterizar os mesmos. Sendo a menor média registrada no Estado da Bahia ($-0,523^{\circ}\text{C}$) e a maior no Estado do Paraná ($-0,518^{\circ}\text{C}$). Todos os Estados apresentaram média em conformidade com a IN 51.

Tabela 8 – Média e desvios-padrão para os valores do ponto de congelamento por Estado em amostras analisadas no período de fevereiro a abril de 2009

Estados	N	% do total	Média do PC*	CV(%)
Paraná	5015	4,56	-0,518 (0,012)	2,46
São Paulo	22594	20,54	-0,522 (0,012)	2,30
Minas Gerais	72953	66,33	-0,522 (0,012)	2,35
Goiás	4876	4,43	-0,522 (0,010)	1,93
Bahia	2970	2,70	-0,523 (0,013)	2,59
Mato Grosso do Sul	1572	1,43	-0,521 (0,016)	3,18

*MilkoScan™ FT+ (FOSS).

Para o conhecimento da situação de amostras não conforme, ou seja, com indicativo de fraude, não atendendo os limites estabelecidos pela IN 51, foram realizadas as distribuições dos dados segundo classes do PC, como apresentadas na Figura 1. Em que as classes maior que $-0,512^{\circ}\text{C}$ e menor que $-0,547^{\circ}\text{C}$, foram consideradas com indicativo de fraude por aguagem e solutos, respectivamente.

Das 137.443 amostras analisadas, 92,48% apresentaram valores em conformidade com a legislação brasileira (IN 51). O percentual de amostras com níveis suspeitos de fraude por aguagem foi de 7,10%, representando aproximadamente 9.758 amostras de leite de tanques. As possíveis causas podem ser atribuídas à adição fraudulenta, ou mesmo à falhas nos procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha (RASMUSSEN et al., 2002). Isso mostra que apesar do combate à fraude por aguagem ser uma prática antiga, ainda existe a necessidade do monitoramento constante do PC em leite cru, e a adoção de ações estratégicas para melhoria desse quadro torna-se relevante. Já o percentual de amostras com indicativo de fraude por adição de solutos ou reconstituintes, como sal, açúcar, etanol, entre outros componentes foi de 0,41%. Esse percentual foi menos expressivo, pois o PC apenas auxilia para detecção desse tipo de fraude, não é uma metodologia específica,

entretanto, outros métodos oficiais de análises são utilizados para detectar a presença desses reconstituintes (BRANDÃO, 2008).

Em estudo realizado por Borges e Pinto (2007) em 14.771 amostras de leite de tanques de um laticínio no Estado do Rio Grande do Sul, foi verificado que 2,83% delas apresentavam-se com os valores do PC de $-0,482$ a $-0,510^{\circ}\text{C}$, indicando fraude por aguagem, enquanto que 1,37% apresentavam-se com valores de $-0,539$ a $-0,578^{\circ}\text{C}$, indicando fraude por adição de soluto. Com isso, é possível afirmar que o PC é uma ferramenta necessária na detecção de fraude por adição de água e soluto, pois os estudos revelaram um percentual elevado de amostras fora do padrão.

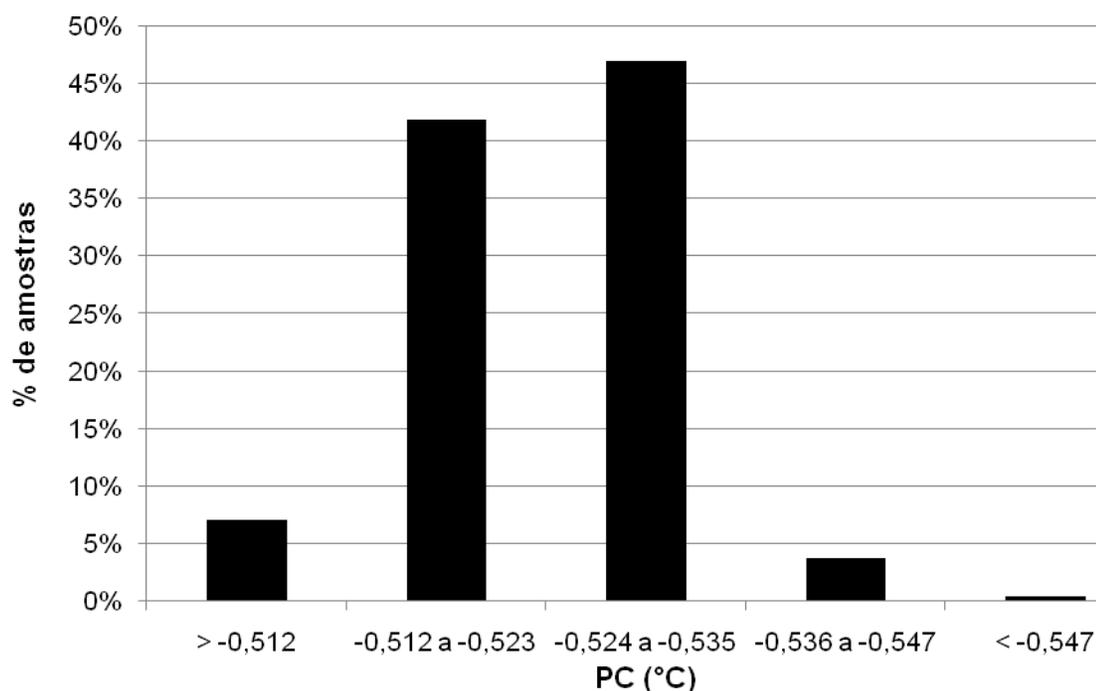


Figura 1 – Distribuição das porcentagens da população segundo ponto de congelamento.

As indústrias processadoras de lácteos têm interesse na obtenção do leite de melhor qualidade dos seus fornecedores. Cada uma define os atributos de qualidade da matéria-prima de acordo com a necessidade do produto final e para isso utilizam

um conjunto de análises, dentre elas, o PC é um indicador utilizado diariamente nas plataformas de recepção das indústrias.

Os programas de pagamento por qualidade têm sido utilizados como ferramenta por algumas indústrias, incentivando a melhoria no processo de produção do leite. Na Tabela 9 são apresentados os percentuais de amostras não conforme para grupos de indústrias que possuem ou não programas de pagamento. As indústrias que pagam por qualidade apresentaram menor percentual de amostras fora do limite estabelecido pela legislação (4,65%), sendo esse percentual expressamente superior nas empresas que não pagam (9,97%). Embora o PC não seja considerado um parâmetro utilizado diretamente nas tabelas de pagamento, o menor percentual resultou como consequência dos fornecedores mais comprometidos com a qualidade do leite produzido.

Tabela 9 – Distribuição das porcentagens da população para ponto de congelamento segundo a implantação de programas de pagamento por qualidade nas indústrias

Indústrias que pagam por qualidade	% amostras acima do limite máximo estabelecido pela IN 51 (-0,512°C)
Sim	4,65
Não	9,97

Na Tabela 10 são apresentados os resultados da análise da variância para o ponto de congelamento. Indicando que a lactose e a CBT influenciaram significativamente os valores do PC. O PC do leite é mais baixo do que o da água, devido às substâncias solúveis presentes no mesmo (SHIPE, 1959), e é um valor diretamente ligado ao extrato seco, mais especificamente em relação à presença, maior ou menor, de lactose e cloretos (Bechi, 2003).

Segundo Ponsano et al. (1999), a influência dos níveis de CBT sobre os resultados do PC é inerente ao processo de acidificação decorrente da fermentação provocada pelos microrganismos presentes no leite. Resultados semelhantes foram reportados pelos autores, em que o processo de acidificação promoveu a diminuição nos valores do PC.

Se houver aumento de substâncias dissolvidas no leite, o que pode ser possível com o processo de acidificação, devido à quebra da lactose, o PC tende a diminuir, afastando-se de 0°C (FONSECA; FONSECA, 2008).

Tabela 10 – Análise da variância para o ponto de congelamento (°C) considerando os efeitos da lactose, contagem bacteriana total (CBT) e suas interações

Causas da variação	Ponto de congelamento
Lactose	<0,0001***
CBT	<0,0001***
Lactose x CBT	<0,0001***

^{NS} p > 0,05; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Outros fatores podem influenciar o PC, como, por exemplo, raça, estação do ano, alimentação, mastite, ingestão de água pelo animal, período da ordenha, clima, sazonalidade (BUCHANAN; LOWMAN, 1929; SATO et al. 1956; HENNO et al. 2008).

Considerando estes outros fatores que não foram contemplados nessa pesquisa, sugere-se que mais estudos sejam conduzidos com o objetivo de se definir parâmetros regionais para o PC, conforme sugestão de Bechi (2003).

3.3 Conclusões

Parte das amostras de leite de tanques de rebanhos brasileiros encontrava-se fora dos limites estabelecidos pela IN 51 para o ponto de congelamento, evidenciando a necessidade do monitoramento constante desse indicador e à aplicação de ações estratégicas no combate a fraude por adição de água. As indústrias que pagam por qualidade possuem menos produtores fora dos limites legais, indicando que os programas de pagamento incentivam o processo de melhoria na qualidade da matéria-prima de seus fornecedores. A lactose e a CBT influenciaram significativamente os resultados do PC. Mais estudos devem ser conduzidos para avaliação das causas de variação do PC do leite de tanques em rebanhos brasileiros para que se possa definir parâmetros regionais para esta variável.

Referências

BECCHI, C.S. **Estudo do índice crioscópico do leite tipo B “in natura” produzido na bacia leiteira do vale do Taquari, RS**. 2003. 100p. Dissertação (Mestre em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BORGES, K.A.; PINTO, A.T. Variações no índice crioscópico de amostras de leite recebidas na plataforma de um laticínio, no período de janeiro a agosto de 2007. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais...** Gramado: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2008. 1 CD-ROM.

BRANDÃO, S. C. C. Fraude do leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008. p. 193-199.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18/09/2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Seção I, p. 13-22.

BRASIL, L.H.A.; BONASSI, I.A.; BACCARI JUNIOR, F.; WECHSLER, F.S. Efeito da temperatura ambiental na densidade e ponto de congelamento do leite de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n.3, p. 333-337, set.1999.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; OLIVEIRA, A.N.; NICOLAU, E.S.; NEVES, R.B.S. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Campinas, v.15, n.1, p.40-44, jan. 2008.

BUCHANAN, J.H.; LOWMAN, O.E. Seasonal variations in the freezing point of Milk. **Journal of dairy science**, Savoy, v.12, n.6, p.484-490, jun.1929.

CASSOLI, L.D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. 2005. 46 p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FONSECA, L.M.; FONSECA, P.S.C. **Índice crioscópio**: qual a importância deste parametro na qualidade do leite?. Disponível em: <http://www.laticinio.net/inf_tecnicas.asp?cod=69.html> Acesso em: 08 mai. 2008.

FOSS: MilkoScan™ FT+. Disponível em: <<http://www.foss.dk/Solutions/ProductsDirect/MilkScanftplus.aspx>> Acesso em: 05 mar. 2009.

FREIRE, M.F.; CORTEZ, M.A.S.; SILVA, A.C.O.; RISTOW, A.M.; KASNOWSKI, M.C.; CORTEZ, N.M.S. Características físico-químicas do leite cru refrigerado entregue em uma cooperativa no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Campinas, v.13, n.2, p. 71-75, mai. 2006.

GLAESER, H. Control of the water content of dairy products – definition of limits, consideration of process variation, official use autocontrol data. **Food Chemistry**, Davis, v. 82, p. 121-124, 2003.

HENNO, M.; OTS, M.; JÖUDU, I.; KAART, T.; KÄRT, O. Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. **International Dairy Journal**, Londres, v. 18, p. 210-215, aug. 2008.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk and milk products**: definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. Brussels, 1999. 12 p. (IDF Standard, 128A).

_____. **Milk**: determination of freezing point. Thermistor cryoscope method (reference method). Brussels, 2002. 12 p. (IDF Standard 108/ISO 5764).

MACHADO, P.F. Programas de pagamento por qualidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008. p.183-191.

MORETTO, J.H.A.; AMBIEL, A.C.; MACEDO, V.P. Qualidade do leite bovino no período das águas e das secas. **Pubvet**, Londrina, v. 2, n. 35, set. 2008.

OLIVEIRA, W.P.S.; OLIVEIRA, A.N.; MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; FERNANDES, S.D.; OLIVEIRA, R.A.; BUENO, V.F.F.; OLIVEIRA, J.P. Avaliação da metodologia de infravermelho para determinação índice crioscópico do leite cru. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2006. 1 CD-ROM.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; LARA, J. A. F.; PIVA, F. C. Variação sazonal e correlação entre propriedades do leite utilizadas na avaliação da qualidade. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 35-39, set. 1999.

RASMUSSEN, M.D.; BJERRINNG, M.; JUSTESEN, P.; JEPSEN, L. Milk quality on Danish farms with automatic milking systems. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, n. 11, p. 2869-2878, May 2002.

RATTRAY, W.; JELEN, P. Freezing point and sensory quality of skim Milk as affected by addition of ultrafiltration permeates for protein standardization. **International Dairy Journal**, Londres, v. 6, p. 559-579, Sept. 1996.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide 9.0**. Cary, 1999. 1 CD-ROM.

SATO, I.; HANKINSON, C.L.; GOULD, I.A.; ARMSTRONG, T.V. Some factors affecting the freezing point of milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 40, n. 4, p. 410-417, Oct. 1956.

SHIPE, W.F. The freezing point of Milk. A review. **Jornal Dairy Science**, Savoy, v. 42, n.11, p. 1745-1761, jul. 1959.