

MARIA CAROLINA PAIS PINTO DE OLIVEIRA

**ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO-  
por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared):  
VALIDAÇÃO DA ANÁLISE DO TEOR DE URÉIA  
E DE OUTROS PARÂMETROS  
DE QUALIDADE DO LEITE**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.  
Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal  
Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2011

O48e Oliveira, Maria Carolina Pais Pinto de, 1983-

Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): validação da análise do teor de uréia e de outros parâmetros de qualidade do leite / Maria Carolina Pais Pinto de Oliveira. - 2011.  
70 p. : il.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Qualidade – Teses. 3. Leite – Composição – Teses. 4. Espectroscopia de infravermelho – Teses. I. Fonseca, Leorges Moraes da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637

Dissertação defendida e aprovada 24 de maio de 2011, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Leorges Moraes da Fonseca  
Orientador



Profª. Sandra Maria Pinto



Profª. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

*“A vida sem luta é um mar morto no centro do organismo universal.”*  
Machado de Assis

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me guiado na busca de todas as minhas conquistas.

Aos meus pais, Ademir e Marisa, pelo constante incentivo, amor e força. Minha eterna gratidão.

Ao Professor Dr. Leorges Moraes da Fonseca, pela orientação e dedicação durante o mestrado, assim como pela amizade e ensinamentos que me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente.

À Professora Dra. Mônica Maria de Oliveira Pinho Cerqueira, pela essencial colaboração em todas as etapas desse trabalho e pela atenção.

À Professora Dra. Mônica de Oliveira Leite e ao Professor Ronon Rodrigues, pela atenção e colaboração.

À Professora Dra. Sandra Maria Pinto, pela disponibilidade e colaboração.

Aos professores do DTIPOA, por todos os ensinamentos, que sempre serão de grande valia.

Aos funcionários do DTIPOA, em especial ao Marco Antônio, Valéria e Maura pelo apoio.

Ao Danilo, pela atenção, disponibilidade e orientação nas análises estatísticas.

Ao Professor Dr. Israel José Silva, pela orientação, ensinamentos e incentivo durante a graduação e pela amizade.

Ao Professor Dr. Estevam Barbosa de Las Casas, pela paciência e dedicação nos ensinamentos de Cálculo integral e diferencial para biocientistas.

Aos colegas, Naiara e Luiz Paulo pela grande contribuição e ajuda no desenvolvimento desse trabalho. Assim como à Franciane e aos outros colegas de mestrado pelo apoio e convivência.

À amiga Rose, coordenadora do LabUFMG, pelo incentivo, disponibilidade e amizade nas horas difíceis.

Aos funcionários do LabUFMG, pelo apoio e auxílio no meu experimento.

À equipe da empresa Delta Instruments, em especial ao Ben, Wopka e Evert, pelo valioso treinamento e receptividade em sua sede na Holanda.

À todos os meus amigos, que sempre torceram por mim e me apoiaram nessa conquista.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a elaboração deste trabalho.

À Escola de Veterinária e a CAPES pela concessão da bolsa.

A FAPEMIG e CNPq (proj. 578736/2008-0)

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1 EMPREGO DA ESPECTROSCOPIA NA DETERMINAÇÃO ANALÍTICA ...	14
2.1.1 Princípio e Histórico.....	14
2.1.2 Análise do leite por equipamento de infravermelho.....	15
2.1.3 Reflexão no infravermelho por metodologia FTIR .....	17
2.1.4 A natureza multivariada dos dados.....	18
2.1.5 Aplicações de FTIR na análise de leite e derivados lácteos .....	19
2.1.6 Vantagens do método FTIR.....	21
2.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE .....	22
2.3 CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE .....	23
2.4 CONTAGEM BACTERIANA NO LEITE.....	24
2.5 ACIDEZ TITULÁVEL E PH DO LEITE.....	25
2.6 URÉIA NO LEITE .....	25
2.6.1 Origem do nitrogênio uréico no leite.....	25
2.6.2 Teor de uréia e proteína na alimentação de vacas de leite.....	28
2.6.3 Concentração de uréia no leite e o rendimento industrial .....	29
2.6.4 Desempenho reprodutivo e o Nitrogênio uréico no leite (NUL).....	29
2.6.5 Horário de coleta do leite e o teor de uréia.....	30
2.6.6 Período de Lactação e o NUL.....	30
2.6.7 Relação entre estação do ano e a uréia no leite (NUL) .....	32
2.6.8 Mastite e sua relação com o nitrogênio uréico no leite (NUL) .....	32
2.6.9 Nitrogênio uréico e contaminação ambiental .....	32
2.6.10 Análise da uréia por metodologia enzimática.....	33
2.6.11 Análise de uréia ou nitrogênio uréico no leite por metodologia do infravermelho -FTIR.....	33
3. <b>OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 GERAL.....	34
3.2 ESPECÍFICOS .....	34
4. <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	35
4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES.....	35
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	35
4.3.1. Avaliação da repetibilidade do método .....	35
4.3.2. Avaliação da reprodutibilidade do método.....	37
4.3.3 Comparação do CombiScope FTIR com o ChemSpec 150 Analyser .....	37
4.3.4 Avaliação da detecção de fraude por adição de uréia ao leite e correlação com os teores de proteína antes e após a adição.....	37
4.3.5 Teste da estabilidade da uréia no leite .....	38
4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	38

4.4.1	Quantificação de componentes e uréia do leite pelo método de espectroscopia no infravermelho.....	38
4.4.2	Contagem de células somáticas .....	38
4.4.4	Contagem bacteriana por citometria de fluxo .....	39
4.4.5	Quantificação de uréia por metodologia enzimática .....	39
4.4.6	Acidez do leite ou pH .....	39
4.4.7	Calibração dos equipamentos .....	39
4.4.8	Teste da homogeneização.....	40
<b>5.</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>41</b>
5.1	ANÁLISE DO SOFTWARE DO EQUIPAMENTO .....	41
5.2	ESTATÍSTICA DOS EXPERIMENTOS .....	42
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
6.1	REPETIBILIDADE.....	42
6.2	REPRODUTIBILIDADE DO EQUIPAMENTO .....	44
6.3	COMPARAÇÃO DA ANÁLISE DE URÉIA POR METODOLOGIA ENZIMÁTICA E POR METODOLOGIA DE INFRAVERMELHO .....	44
6.4	AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE ADIÇÃO DE URÉIA AO LEITE E CORRELAÇÃO COM OS TEORES DE PROTEÍNA ANTES E APÓS A ADIÇÃO. ....	47
6.5	TESTE DA ESTABILIDADE DA URÉIA NO LEITE.....	48
6.5.1	Avaliação na contagem das células somáticas e nos teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado em função do tempo e temperatura de estocagem.....	50
6.6	ESTABILIDADE DO LEITE NA ANÁLISE DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH).....	54
6.7	ESTABILIDADE DA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL (CBT) NO LEITE .....	55
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>58</b>
	<b>ANEXO - EXEMPLO DE LAUDO DAS 12 AMOSTRAS PADRÃO DO DQCI PARA CALIBRAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS</b> .....	<b>70</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1.	Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier. ....	17
Figura 2.	Espectros das amostras de leite obtidos por FTIR. ....	18
Figura 3-	Esquema da repetibilidade do método infravermelho. ....	36
Figura 4-	Esquema da reprodutibilidade do método infravermelho.....	37
Figura 5-	Fluxograma com a rotina diária de checagem da homogeneização da limpeza do equipamento, ou análises realizadas. Fonte: Delta Instruments, comunicação pessoal. ....	41
Figura 6-	Scatterplot dos resultados (mg/dL) do nitrogênio uréico no leite (NUL) por método enzimático (ChemSpec) e por método FTIR (CombiScope FTIR).....	45

Figura 7- Comparação dos resultados de análise de leite adicionado por níveis de uréia (NUL): 0; 20 e 40mg/dL (n=60), pelos equipamentos ChemSpec e FTIR. ....	48
Figura 8- Regressão das médias de NUL de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2 °C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias. ....	49
Figura 9- Regressão das médias de contagem de células somáticas (log -cels/μL) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2°C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias. ....	51
Figura 10- Regressão das médias de gordura (g/100g) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2 °C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias. ....	52
Figura 11- Regressão das médias de proteína (g/100g) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2 °C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias. ....	52
Figura 12- Regressão das médias de lactose (g/100g) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2 °C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias. ....	53
Figura 13- Regressão das médias dos teores de extrato seco desengordurado (ESD) (g/100g) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2°C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias. ....	54
Figura 14- Regressão das médias de pH de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2°C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias. ....	55
Figura 15- Regressão das médias de Contagem bacteriana Total (log UFC/μL) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2°C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias. ....	56

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1- Parâmetros de avaliação do desempenho dos equipamentos de análise de componentes do leite por EIVM em leite, quanto à repetibilidade e acurácia, segundo a AOAC (Bradley Jr., 2000) e FIL (IDF, 2000). ....	19
Tabela 2- Distribuição percentual dos principais compostos do NNP do leite. ....	27
Tabela 3- Níveis de uréia sanguínea, uréia no leite submetido a controle leiteiro oficial e a uréia no leite da ordenha da manhã e da tarde. ....	28
Tabela 4- Estatística descritiva da repetibilidade na análise da composição do leite cru (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e uréia) no equipamento FTIR. ....	43
Tabela 5- Comparação das médias de cada componente do leite cru considerando 20 amostras iguais de cada rack (total de 200 amostras). ....	43
Tabela 6- Reprodutibilidade com as médias dos componentes do leite cru e da uréia pelo teste t de Student com N=200 amostras. ....	44
Tabela 7- Estatística descritiva da reprodutibilidade na análise da composição do leite cru (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e uréia) no equipamento FTIR. ....	44
Tabela 8- Comparação das médias, desvios Padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) dos teores de uréia (mg/dL) analisados no leite cru pelos equipamentos FTIR e ChemSpec. ....	45
Tabela 9- Comparação das médias e desvios Padrão (DP) na análise de uréia (NUL), após a adição de uréia no leite pelos equipamentos ChemSpec e FTIR. ....	47
Tabela 10- Comparação das médias dos teores de uréia (mg/dL) de amostras de leite cru, armazenadas a 4°C e 20°C nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15. ....	49

Tabela 11- Comparação das médias das contagens de células somáticas CCS (log - cels/ $\mu$ L) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias .	51
Tabela 12- Comparação das médias dos teores de gordura (g/100g) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias .....	51
Tabela 13- Comparação das médias dos teores de proteína (g/100g) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias .....	52
Tabela 14- Comparação das médias dos teores de lactose (g/100g) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias .....	53
Tabela 15- Comparação das médias dos teores de extrato seco desengordurado (ESD) (g/100g) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias .	53
Tabela 16- Comparação das médias dos teores do pH de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias.....	54
Tabela 17- Comparação das médias de Contagem bacteriana Total (log UFC/ $\mu$ L) em amostras de leite cru, armazenadas nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15.....	56

---

### LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1- Divisões da região do infravermelho .....	16
Quadro 2- Fatores associados aos níveis de nitrogênio uréico no leite (MUN), em relação aos dias de lactação de vacas leiteiras.....	31

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi realizar a validação de equipamentos baseados na espectroscopia de infravermelho por metodologia em Transformada Fourier (FTIR) para a avaliação do teor de nitrogênio uréico no leite (NUL) cru. Além da uréia foram analisadas a composição e a contagem de células somáticas (CCS) do leite. A repetibilidade e reprodutibilidade do CombiScope™ FTIR, a estabilidade da uréia e a comparação com um método enzimático automatizado (CHEMSPEC 150®, Bentley Instruments) foram testados. O equipamento CombiScope FTIR apresentou boa precisão e acurácia na repetibilidade e na reprodutibilidade para a medição de nitrogênio uréico no leite cru (NUL), assim como para os outros componentes. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os resultados dos equipamentos FTIR e Chemspec. A detecção de uréia adicionada ao leite apresentou diferença significativa nos resultados com adição de 40mg/dL, apresentando uma baixa precisão, comparado à metodologia enzimática. Houve aumento no teor de uréia do leite cru a partir de três dias de armazenamento a 20°C. A estabilidade de alguns teores dos componentes do leite cru mantidos sob temperaturas de armazenamento de 4°C e 20°C durante os 15 dias de estocagem não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, houve aumento da CCS durante o armazenamento das amostras a 20°C. Os valores do pH nas amostras de leite cru contendo azidiol armazenadas durante 15 dias, diminuíram progressivamente a partir do terceiro dia de armazenamento a 20°C. Portanto, FTIR é um método confiável para ser usado para análise de uréia no leite cru, com a vantagem de ser rápido, eficiente, versátil e de baixo custo.

**Palavras chave:** leite, validação, nitrogênio uréico no leite, espectroscopia no infravermelho, FTIR

## ABSTRACT

The objective of this study was to perform the validation of equipment based on Fourier Transform Infrared methodology (FTIR) to evaluate the content of milk urea nitrogen (MUN) in Brazil. Repeatability and reproducibility of CombiScope™ FTIR, urea stability and comparison with an enzymatic automated method (Chemspec®150; Bentley Instruments) were tested. The equipment CombiScope FTIR showed good precision and accuracy in repeatability and reproducibility for the measurement of raw milk urea nitrogen (MUN), as well as for the other components. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the results for MUN by FTIR and enzymatic method. FTIR detection of extraneous urea intentionally added to raw milk showed a significant difference at addition level of 40 mg/dl, and a lower accuracy, compared to the urea analyzer by enzymatic methods. The levels of urea in raw milk after three days of storage at 20°C were higher. Raw milk components (fat, protein, lactose and solids nonfat) were stable at temperatures of 4°C and 20°C during 15 days of storage. Moreover, there was an increase in SCC during storage of the samples at 20°C. pH values in raw milk samples decreased after three days of storage at 20°C. Therefore, FTIR is a reliable method to be used for analysis of urea in raw milk, with the advantage of being a fast, efficient, versatile and low cost technique.

**Key words:** milk, validation, milk urea nitrogen, infrared spectroscopy, FTIR

## 1. INTRODUÇÃO

A demanda nacional por grandes volumes de leite de boa qualidade faz com que a pecuária leiteira seja bastante competitiva. Assim, é necessário quantificar e conhecer os parâmetros que podem interferir nos resultados obtidos na análise da qualidade do leite, diagnosticando os pontos que devem ser corrigidos, a fim de gerar ganhos efetivos na atividade.

O setor laticinista tem passado por uma crescente demanda por produtos lácteos de alta qualidade, levando à progressiva adaptação deste importante segmento, às exigências do mercado consumidor. Dessa forma, em vários países, já existe o pagamento diferenciado para produtores que forneçam leite com teores mais elevados de gordura e proteína, além de outros parâmetros de qualidade considerados essenciais. No Brasil, a remuneração extra ao produtor de leite por teores mais elevados de gordura e proteína já ocorre, principalmente a partir dos critérios de qualidade demandados na Instrução Normativa 51 (Brasil, 2002). Destaca-se também a importância da análise de leite individual para monitoramento da qualidade e identificação de problemas críticos. Dentre outros enfoques que têm como requisito a análise da qualidade do leite estão o melhoramento genético, com objetivo de seleção de animais que produzam leite com maior teor de sólidos, manejo nutricional e controle e prevenção de mastite (Reis *et al.*, 2007).

A Instrução Normativa nº 51 determina novas variáveis de avaliação da qualidade do leite cru refrigerado. De acordo com essa, análises de composição (teores de gordura, proteína e sólidos totais), contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS) e resíduos de

drogas veterinárias de todo leite cru produzido no país e processado em estabelecimentos sob fiscalização federal, deverão ser realizadas mensalmente em um dos laboratórios credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil, 2002).

O atual nível de desenvolvimento da pecuária leiteira no Brasil demanda a existência de recursos laboratoriais que proporcionem informações de qualidade em um tempo adequado para o contínuo crescimento do setor. Nesse contexto, vale destacar a criação da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL). Os laboratórios integrantes da RBQL contam com equipamentos eletrônicos modernos para análises rápidas e precisas (Silveira, 2004).

Dentre as atividades desenvolvidas pela RBQL podem ser destacadas: serviços analíticos de controle de qualidade de leite cru, capacitação de transportadores de leite sobre coleta de amostra, apoio ao MAPA no desenvolvimento de políticas de controle de qualidade, geração de informações sobre a Qualidade do Leite cru produzido no país por meio da elaboração de relatórios gerenciais destinados ao MAPA, às indústrias de laticínios e aos produtores de leite, suporte técnico à cadeia produtiva do leite, além do desenvolvimento de trabalhos científicos nessa importante área do conhecimento e da formação de mão de obra altamente qualificada. Hoje a capacidade instalada da RBQL é de aproximadamente 1.300.000 amostras/mês para análises de Contagem de Células Somáticas – CCS e Composição do Leite e de 554.000 amostra/mês para análise de Contagem Bacteriana Total - CBT, quantitativo este capaz de suprir as necessidades analíticas atuais do país (Neves, 2010).

O processo de monitoração contínua é um requisito fundamental da indústria moderna de alimentos e tem se tornado cada vez mais de suma importância. Recentemente, uma série de métodos instrumentais rápidos e precisos foram gradualmente introduzidos, pois possuem muitas vantagens comparadas a técnicas mais antigas (Jankovská *et al.*, 2003)

Para a análise de leite, os métodos baseados na turbidez e corante de ligação para a determinação de gordura e proteína, respectivamente, têm sido utilizados há mais tempo, mas a técnica que revolucionou de fato os laboratórios de análise de leite fluido foi a espectroscopia de infravermelho médio, também chamada de MIR (mid infra-red), que apresenta grandes vantagens em relação às técnicas anteriores, como a determinação simultânea de proteína, gordura e lactose em uma única amostra sem tratamento prévio, rapidez analítica e possibilidade de automatização total do processo (Rodríguez-Otero *et al.*, 1997).

No Brasil, esses sistemas automatizados ainda são restritos a centros de pesquisa, a RBQL e a grandes laticínios, principalmente em virtude de seu elevado custo. Entretanto, a tendência cada vez maior de o preço do leite ser determinado por sua qualidade, bem como a automação progressiva das indústrias, com certeza, tais equipamentos substituirão brevemente os métodos tradicionais (Tronco, 1997).

Uma ferramenta para monitorar o estado nutricional protéico de vacas leiteiras é necessária e benéfica para reduzir as perdas e maximizar a eficiência de utilização de nitrogênio. A ingestão de proteína é difícil de se medir, na prática, principalmente por causa das imprecisões na previsão de consumo de ração. Um parâmetro que é potencialmente útil é a concentração de uréia no sangue ou no leite. As fontes de uréia no leite são principalmente três: o

produto final da proteína, a digestão de nitrogênio não protéico e o catabolismo de aminoácidos na glândula mamária. Os resultados das medidas de nitrogênio uréico no leite (NUL) e nitrogênio uréico no sangue podem fornecer informações valiosas sobre o estado nutricional e a saúde de vacas. O uso de NUL como indicador de fertilidade em vacas leiteiras tem recebido muita atenção (Roy *et al.*, 2010).

A análise de uréia vem sendo utilizada para avaliação nutricional de rebanhos, estabelecendo a qualidade da proteína ingerida, assim como para diferenciar o nitrogênio de origem protéica e o nitrogênio não protéico (NNP). Porém, métodos analíticos de bancada ou mesmo, os equipamentos que analisam por meio de metodologia enzimática tem como pontos negativos a demora na análise, assim como o alto custo de aquisição de um instrumento para uma única análise específica. No caso da análise da uréia, também denominada de Milk Urea Nitrogen (MUN), o uso de equipamentos eletrônicos baseados na espectroscopia de infravermelho, através da metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared) mostra-se como uma alternativa interessante. Tal metodologia apresenta grandes vantagens em relação às metodologias de referência: rapidez e precisão, necessidade de pouca mão-de-obra, pouca ou nenhuma preparação da amostra para análise, assim como o baixo custo relativo devido à multiplicidade de análises em um único equipamento, tornando desnecessária a aquisição de vários equipamentos para análises distintas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 EMPREGO DA ESPECTROSCOPIA NA DETERMINAÇÃO ANALÍTICA

### 2.1.1 Princípio e Histórico

A espectroscopia compreende o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, cujo principal objetivo é a determinação dos níveis de energia e transições de espécies atômicas e moleculares. A energia de certo estado corresponde ao movimento dos elétrons em torno do núcleo. Assim os vários estágios são chamados de estados eletrônicos. Neste caso, as transições eletrônicas estão associadas a mudanças de orbital atômico, spin eletrônico e momento angular total. Já para as moléculas, onde existem as ligações químicas, as transições eletrônicas envolvem mudança de energia dos elétrons de valência, ou seja, variações nas populações eletrônicas de orbitais moleculares. Em razão da existência das ligações químicas, as moléculas também possuem energia vibracional e rotacional (Skoog e Leary, 1992). Geralmente as transições vibracionais estão relacionadas com a região do Infravermelho (Sala, 1996).

William Herschel, um astrônomo, descobriu a radiação infravermelha em 1800. Sabendo que a luz solar continha todas as cores do espectro e que era também uma fonte de calor, Herschel queria descobrir qual, ou quais, eram as cores responsáveis pelo aquecimento dos objetos. Idealizou um experimento utilizando um prisma e termômetros com bulbos pretos onde mediu as temperaturas de diferentes cores. Ele observou um aumento de temperatura à medida que movia o termômetro da cor violeta para o vermelho no espectro criado pela luz do sol atravessando o prisma. Descobriu que a temperatura mais quente ocorria além da luz vermelha. A radiação que causou esse

aquecimento não era visível e foi denominado por Herschel como radiação invisível de infravermelho (Biggs *et al.*, 1987; Silveira, 2002).

Uma das primeiras aplicações da espectroscopia no infravermelho, como ferramenta analítica, foi durante o período da Segunda Guerra Mundial, época em que já se sabia que os espectros armazenavam uma gama de informações sobre a amostra e apresentavam um elevado potencial para serem empregados nos mais diversos tipos de análises químicas e/ou físicas. Porém era praticamente impossível extrair informações quantitativas ou reforçar hipóteses sobre a estrutura química das espécies (Costa Filho e Poppi, 2002).

Nos meados dos anos 80, com o desenvolvimento da microeletrônica e popularização dos microcomputadores, houve um significativo avanço nas análises instrumentais possibilitando a aquisição de um grande número de dados de uma mesma amostra. Entretanto, a modelagem desses dados tornou-se mais complexa e só foi solucionada com a aplicação de técnicas quimiométricas, as quais contribuíram para a utilização da espectroscopia como ferramenta de análise em aplicações qualitativas e quantitativas na química analítica (Costa Filho e Poppi, 2002).

A região do infravermelho médio e as técnicas de refletância para análises em alimentos vêm sendo amplamente utilizadas desde o início dos anos noventa. Nesta década, inúmeros estudos revelaram as aplicações da espectroscopia na análise de leite, carne, óleos, gorduras e frutas, avaliando aspectos quantitativos e qualitativos, bem como, para obtenção de certificação da qualidade. Já a utilização da espectroscopia no infravermelho próximo é consagrada desde o início da década de sessenta, quando um método foi proposto para determinar umidade em sementes (Ferrão *et al.*, 2004).

Como técnica de análise quantitativa para o controle de alimentos e produtos industrializados, a espectroscopia no infravermelho apresentou crescimento após o advento da Transformada Fourier e a utilização do interferômetro de Michelson, o que tornou o método mais rápido e robusto (Saliba *et al.*, 2003).

Há, portanto, um vasto número de aplicações utilizando as técnicas de espectroscopia no infravermelho em conjunto com métodos de calibração multivariada, com diversos propósitos. Este acentuado crescimento e o aperfeiçoamento nos últimos anos revelam o contínuo interesse por métodos analíticos rápidos, não destrutivos e não invasivos e que não gerem subprodutos químicos tóxicos.

### **2.1.2 Análise do leite por equipamento de infravermelho**

A energia denominada infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada na faixa de números de onda entre 14.290 e 200  $\text{cm}^{-1}$ . A região que apresenta número de ondas entre 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  é a mais comumente utilizada pela química orgânica, sendo denominada infravermelho médio. A região chamada infravermelho próximo, 14.290 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , tem recebido, recentemente, muita atenção, em particular com relação às análises quantitativas de amostras com matrizes complexas (Barbosa, 2007).

A espectroscopia no infravermelho determina grupos funcionais de uma amostra, sendo que cada grupo absorve em frequência característica. Essas frequências apresentam vibrações específicas, que podem ser de estiramento ou de deformação, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (Silverstein *et al.*, 1994).

Os espectros no infravermelho podem ser obtidos a partir de amostras sólidas, líquidas e gasosas. A qualidade desses espectros depende do método de preparo da amostra e do tipo de acessório utilizado para sua obtenção. Os métodos mais empregados envolvem transmitância e refletância, sendo este último muito utilizado para análises qualitativas e quantitativas. O método por refletância pode apresentar acessórios para obtenção de espectros por Refletância Total Atenuada (ATR), Refletância Especular e Refletância Difusa (Skoog *et al.*, 2002).

A região do infravermelho é dividida em três áreas conforme apresentado no Quadro 1. A espectroscopia de infravermelho próximo e médio é amplamente utilizada para a análise de componentes do leite, como umidade, proteína, gordura, açúcares, entre outros (Rodríguez-Saona *et al.*, 2006).

Quadro 1- Divisões da região do infravermelho

Região	Intervalo de número de onda (v) – (cm <sup>-1</sup> )	Região em comprimento de onda (λ) – (nm)	Região de frequência (v) – (Hz)
Próximo (NIR)	12800 – 4000	780 – 2500	3,8 x 10 <sup>14</sup> a 1,2 x 10 <sup>14</sup>
Médio (MIR)	4000 – 200	2500 – 5000	1,2 x 10 <sup>14</sup> a 6,0 x 10 <sup>12</sup>
Distante (FIR)	200 - 10	5000 - 100000	3,8 x 10 <sup>12</sup> a 3,0 x 10 <sup>11</sup>

Fonte: Williams, 1987.

A análise espectroscópica explora a interação da radiação eletromagnética com os átomos e as moléculas para fornecer informações químicas qualitativas, quantitativas e físicas (estruturais) através da análise do comprimento de onda ou da frequência do espectro de energia que é absorvido ou emitido (O'Sullivan *et al.*, 1999). O princípio fundamental de todos os analisadores de infravermelho é baseado na capacidade de absorção de radiação, em diferentes comprimentos de ondas, dos grupos químicos específicos de alguns componentes do leite como gordura, proteína e lactose (Biggs *et al.*, 1987). Os grupos carbonila (C=O) das ligações éster dos triglicerídeos absorvem radiação no comprimento de onda de 5,73μm, os grupos amida (CONH) das ligações peptídicas das proteínas em 6,46 e os grupos hidroxila (OH) da lactose em 9,53μm (IDF, 1991). A quantidade de sólidos totais presente em uma amostra pode ser determinada pelo somatório do conteúdo dos componentes: gordura, proteína e lactose, acrescidos de uma constante de minerais, ou pela absorção de radiação em um comprimento de onda de 4,3μm dos grupos hidroxila das moléculas de água (Biggs *et al.*, 1987; Silveira, 2002).

Os métodos de infravermelho são métodos indiretos, porque não medem diretamente o componente alvo, mas sim uma das

propriedades funcionais. Estes métodos requerem normalização a partir de um método de referência para converter o sinal instrumental em concentração de componente (O'Sullivan *et al.*, 1999).

A análise da composição centesimal dos constituintes de leite cru refrigerado realizada nos laboratórios oficiais da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL) é efetuada em equipamentos eletrônicos com grande capacidade de análise, das marcas, Bentley (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América), Foss (Foss North America, Brampton, Ontario) e Delta Instruments (Delta Instruments an Advanced Instruments Company, Drachten, Holanda). Os equipamentos desses fabricantes realizam a análise por absorção infravermelha com modelos baseados em filtros, sendo os mais recentes baseados em tecnologia de Infravermelho em Transformada Fourier-FTIR.

Nos equipamentos a base de análise no infravermelho, a amostra de leite após ser aquecida a 40°C, é homogeneizada com a finalidade de reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura. Em seguida, ela recebe irradiação pelo feixe de luz infravermelha em uma cubeta. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho, quantificada e transformada

automaticamente em teores de componentes, tendo como referência curvas de calibração previamente elaboradas no equipamento (Bentley Instruments INC., 1997; Fonseca, 2005). No equipamento com detecção feita por meio de espectros selecionados por filtros ocorre a mensuração da absorção de energia, em quatro comprimentos de onda selecionados por quatro filtros, os quais passam por um feixe de raio laser durante cada ciclo de análise. Os componentes do leite são determinados em três destes comprimentos de onda: 5,73 $\mu\text{m}$  para a gordura, 6,46 $\mu\text{m}$  para a proteína e 9,53 $\mu\text{m}$  para a lactose (Bentley Instruments INC., 1995 a 1998; IDF, 2000).

### 2.1.3 Reflexão no infravermelho por metodologia FTIR

O avanço da espectroscopia no infravermelho médio, como técnica para análise quantitativa, deve-se principalmente à combinação da transformada de Fourier e da nova geometria dos espectrofotômetros com a utilização do interferômetro de Michelson, tornando-os mais rápidos (Durig e Sullivan, 1990; Eikrem, 1990; Kalasinsky, 1990; Coates, 1998). Um esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson do espectrofotômetro FTIR pode ser visualizado na Figura 1.

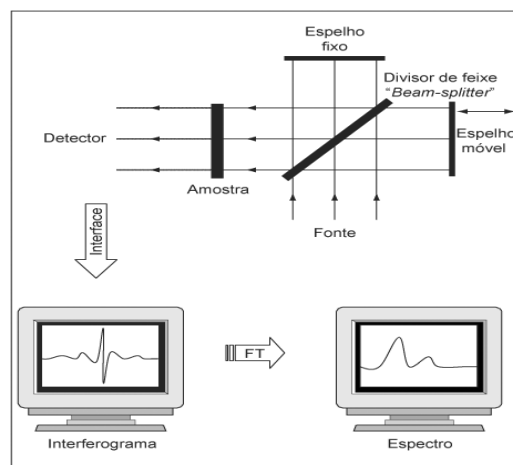


Figura 1. Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier.

Fonte: Webster *et al.* (2000)

O interferômetro de Michelson consiste basicamente de dois espelhos (um fixo e um móvel) e um divisor de feixe (*beam-splitter*) que transmite 50% da radiação incidente da fonte para o espelho móvel e reflete os outros 50% para o espelho fixo. Os espelhos, por sua vez, refletem os dois feixes para o divisor, onde se recombina. Se os dois espelhos encontram-se equidistantes do divisor, as amplitudes combinam-se construtivamente. Se o espelho move-se a uma distância de  $\lambda/4$  do divisor, as amplitudes combinam-se destrutivamente. Para a radiação no infravermelho (policromática), a soma de todas as interações construtivas e destrutivas para cada componente resulta num sinal complexo denominado interferograma. Após a aquisição do interferograma, é aplicada a Transformada de Fourier que converte os dados obtidos no interferômetro em um espectro que relaciona a intensidade *versus* frequência (número de onda) segundo Morgano *et al.*, 2005, como ilustrado na figura 2.

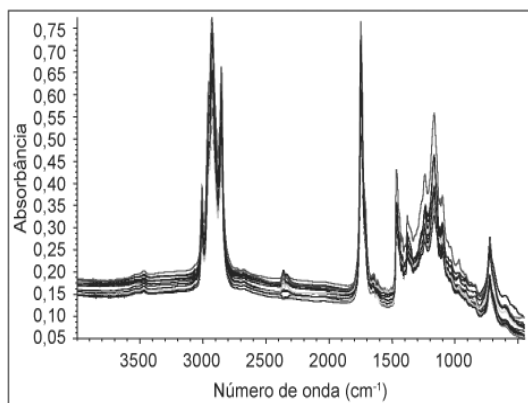


Figura 2. Espectros das amostras de leite obtidos por FTIR.

Fonte: Morgano et al.(2005), adaptado de Coates (1998)

Como uma “impressão digital”, cada molécula tem espectro característico na região do infravermelho, tornando o método viável para identificar diferentes tipos de amostras (análise qualitativa). Os picos presentes no gráfico do espectro correspondem às frequências de vibrações entre os átomos que compõem cada amostra. A altura desses picos corresponde à quantidade de determinada amostra (análise quantitativa) (Morgano *et al.*, 2005).

O espectrofotômetro com transformada de Fourier expõe a amostra a um único pulso de radiação e de medidas de resposta. O sinal resultante, chamado de indução bifásica é uma medida direta da coerência temporal da luz e contém uma rápida decadência composta de todas as possíveis frequências. Como o sinal medido no interferômetro não pode ser interpretado, é necessária a técnica matemática chamada de Transformação de Fourier. Esta transformação é realizada pelo computador (algoritmos de software), apresentando ao usuário as informações desejadas para a análise espectral (Morgano *et al.*, 2005).

#### 2.1.4 A natureza multivariada dos dados

Os métodos de análise multivariada são assim chamados, pois, no caso em que se empregam técnicas espectroscópicas no infravermelho, é possível manipular dados de absorbância espectral associados a mais de uma frequência ao mesmo tempo. Estes métodos têm tornado possível modelar propriedades químicas e físicas de amostras a partir de seus dados espectroscópicos (Williams *et al.*, 1987).

As análises qualitativas e quantitativas utilizando espectroscopia na região do infravermelho expandiram-se a partir do momento em que os dados gerados por um espectrofotômetro FTIR puderam ser digitalizados, habilitando os métodos estatísticos na resolução de problemas de análise química. Inicialmente, muitas amostras não comportavam o isolamento de uma banda para análise, o que tornava necessário o uso de métodos de separação química tal como a cromatografia. Porém, a possibilidade de utilizar várias frequências do espectro tem aumentado o tipo de amostras que podem ser quantificadas por espectroscopia no infravermelho (Helfer *et al.*, 2006).

Nos métodos clássicos de análise univariável, somente a absorbância de uma frequência é associada à concentração, enquanto que métodos que usam simultaneamente duas ou mais frequências são conhecidos como métodos multivariáveis. A precisão dos métodos univariáveis é dependente da capacidade para identificar uma única banda isolada para cada componente. Os métodos multivariáveis, entretanto, podem ser utilizados igualmente quando estão sobrepostas informações espectrais de vários componentes através de várias regiões espectrais selecionadas (Biggs *et al.*, 1987).

### 2.1.5 Aplicações de FTIR na análise de leite e derivados lácteos

Os principais componentes do leite são sólidos totais, gordura, proteína, caseína, nitrogênio uréico, lactose, e células somáticas e a sua determinação por meio de métodos convencionais é bastante demorada e trabalhosa. Por isso, vários trabalhos vem sendo realizados para comparação da espectroscopia de infravermelho com as metodologias de referência, para evidenciar a aplicabilidade desta tecnologia como uma alternativa mais rápida para a análise de leite cru.

Os valores dos indicadores de desempenho de repetibilidade e acurácia dos analisadores de componentes do leite por EIVM, definidos pela AOAC (Bradley Jr., 2000) na descrição do método 972.16 e pela Federação Internacional de Laticínios (FIL) por meio da norma IDF Standard 141C: 2000 (IDF, 2000), são os demonstrados na Tabela 1.

Os principais componentes do leite foram determinados por espectroscopia de infravermelho próximo por Jankovská e Šustová (2003) para avaliação da eficiência da aplicação deste método na análise de leite cru. Cinquenta amostras de leite para calibração foram analisadas por métodos de referência e pela espectroscopia FT NIR em modo de reflectância. Cada amostra foi analisada três vezes e o espectro médio foi utilizado para calibração. A regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) foi utilizada para desenvolver modelos de calibração para os componentes de leite examinados. Foram determinados os maiores coeficientes de correlação de sólidos totais (0,928), gordura (0,961), proteína (0,985), caseína (0,932), uréia (0,906), lactose (0,931) e de células somáticas (0,872). Os resultados deste estudo indicaram que a espectroscopia NIR é aplicável para uma rápida análise da composição do leite.

Tabela 1- Parâmetros de avaliação do desempenho dos equipamentos de análise de componentes do leite por EIVM em leite, quanto à repetibilidade e acurácia, segundo a AOAC (Bradley Jr., 2000) e FIL (IDF, 2000).

Parâmetros	AOAC			IDF	
	Gordura	Proteína	Lactose	Sólidos Totais	Todos os parâmetros
<b>Desvio-padrão da diferença entre duplicatas</b>	≤ 0,02%	≤ 0,02%	≤ 0,02%	≤ 0,04%	≤ 0,02%*
<b>Diferença absoluta entre duplicatas</b>	* – *	* – *	* – *	* – *	≤ 0,06%
<b>Média das diferenças absolutas entre duplicatas</b>	≤ 0,02%	≤ 0,02%	≤ 0,02%	≤ 0,03%	* – *
<b>Desvio-padrão da diferença entre os métodos de referência (Kjeldahl) e EIVM</b>	≤ 0,06%	≤ 0,06%	≤ 0,06%	≤ 0,12%	≤ 0,07%
<b>Média das diferenças absolutas entre os métodos de referência (Kjeldahl) e EIVM</b>	≤ 0,05%	≤ 0,05%	≤ 0,05%	≤ 0,09%	* – *
<b>Média das diferenças entre os métodos de referência (Kjeldahl) e EIVM (não absolutas)</b>	* – *	* – *	* – *	* – *	≤ 0,14√n

\* Corresponde a ≤ 0,04% em 95% dos casos.

Fonte: Bradley Jr. (2000) e IDF (2000).

Silveira *et al.* (2005) compararam os resultados de análises feitas por meio de metodologias de referência e analisadores de infravermelho e verificaram que não existia diferença entre os resultados das determinações de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite bovino obtidos por métodos de referência ou por analisadores de infravermelho, o que comprovou que tais analisadores são capazes de fornecer resultados com precisão.

Os ácidos graxos *trans* no leite de vaca foram quantificados por Ulberth e Henninger (1994) por meio de FTIR. Estes ácidos graxos são formados durante a biohidrogenação, que ocorre no estômago de animais ruminantes, e fazem parte da gordura total do leite. Os achados pelo método usando infravermelho foram posteriormente confirmados pela aplicação de cromatografia gasosa no mesmo conjunto de amostras de leite.

Hewavitharana e Brakel *et al.* (1997) avaliaram o método de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) que foi desenvolvido para a medição rápida e direta de caseína no leite cru. O método foi validado contra o método de referência (Kjeldahl), e os resultados foram satisfatórios, sendo a diferença média entre o método de referência de 0,041% de caseína. Análises quimiométricas, como a análise de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) e a regressão de componentes principais (PCR) foram utilizados no processamento de dados. Esta é uma melhoria definitiva, tanto quanto a rapidez e simplicidade, em relação aos instrumentos de filtro onde a caseína é medida pela diferença no teor de proteína antes e após a sua precipitação.

A presença de acetona no leite foi analisada por Hansen (1999), que concluiu que ela pode ser determinada pela espectroscopia de FTIR associada à calibração multivariada. Como a presença de acetona

em leite bovino funciona como um indicador para cetose, esse método poderia ser utilizado para identificação de animais que apresentam esse distúrbio metabólico. Porém, o autor adverte que esse método pode ser usado apenas como triagem. A confirmação dos resultados deve ser feita por outros métodos que, apesar de mais lentos, possuem maior acurácia.

Gonzalez *et al.* (2004) avaliaram os efeitos dos meses do ano sobre a composição e produção do leite em Pelotas, RS. Foi feito um acompanhamento de dez unidades produtoras de leite, divididas em três sistemas de produção classificados como especializado (ES), semi-especializado (SE) e não-especializado (NE), durante 11 meses do ano. Foram coletadas amostras de leite diretamente dos tanques refrigeradores para determinação das características físico-químicas e contagem de células somáticas (CCS). O leite produzido nos diversos meses do ano diferiu, principalmente, quanto à contagem de células somáticas, fração protéica, extrato seco desengordurado e acidez. O teor de lactose foi determinado por espectroscopia por radiação infravermelha no equipamento Bentley 2000® (Bentley Instruments Inc., USA) e houve diferença sazonal nas porcentagens de lactose, observando-se os menores valores nos meses de março, abril e maio. Março e abril foram os meses de menor produção de leite e maio, um dos meses com maior porcentagem de mastite. Observou-se, durante este experimento, correlação positiva entre produção de leite e lactose ( $r = 0,59$ ;  $P = 0,0001$ ) e negativa entre mastite ( $r = -0,412$ ;  $P = 0,0001$ ) e CCS ( $r = -0,653$ ;  $P = 0,0001$ ).

O estudo de De Marchi *et al.* (2009a) investigou a aplicação da espectroscopia de infravermelho médio para a predição da composição de proteínas em amostras de leite individuais ( $n = 1.336$ ) de vacas da raça Simental. A cromatografia líquida de

alto desempenho (HPLC) permitiu a quantificação da composição de proteínas do leite como relatado por Bonfatti *et al.* (2008) caracterizada com boas separações, alta resolução e precisão na reprodutibilidade dos resultados. No entanto, essa técnica exige equipamentos sofisticados de análise, operadores qualificados, além de ser demorada. A espectroscopia de infravermelho médio de reflectância (MIR) pode ser uma técnica alternativa para a avaliação da composição das proteínas, se a precisão das medidas for satisfatória. A espectroscopia MIR é amplamente utilizada na rotina de testes de qualidade de leite. Sua relevância para a pesquisa aumentou durante a última década e tem sido aplicada para a medição do teor de proteínas do leite, composição do leite (Lynch *et al.*, 2006) e propriedades de coagulação do leite (Dal Zotto *et al.*, 2008; De Marchi *et al.*, 2009b). Os resultados do trabalho evidenciaram que a espectroscopia de infravermelho médio e os métodos de análise de dados multivariada são aplicáveis para prever a composição protéica e a execução desses modelos pode ser uma ferramenta para o melhoramento futuro na composição protéica do leite bovino.

Apesar de todo o trabalho realizado no estudo do leite cru, há pouca informação sobre a adequação da análise de espectroscopia em leites comerciais. Estas amostras são submetidas a processos diferentes, como a homogeneização, pasteurização, desnate, ou seu enriquecimento com vitaminas ou cálcio e, em alguns casos, a substituição de um ou vários componentes como açúcares ou gorduras, que os tornam diferentes do leite cru.

Este foi o objetivo do trabalho de Iñón *et al.* (2004) que avaliaram o potencial de calibração multivariada, aplicada à exploração dos dados do IR encontrados a partir de reflectância total atenuada (ATR)

das amostras de leite cru, a fim de estimar o conteúdo dos principais componentes não aquosos em amostras disponíveis comercialmente. Diferentes aspectos da previsão de cinco parâmetros principais do leite (proteína total, gordura total, carboidratos totais, calorias e cálcio) por espectroscopia de ATR-FTIR foram discutidos. Os pesquisadores concluíram que o uso de ATR, em vez de espectroscopia de transmissão, tem a vantagem de ser menos afetada pela presença de água, assim como pelo fato das técnicas PLS (regressão de mínimos quadrados parciais) 1 e PLS-2 interpretarem comparativamente em termos de erros de previsão, é possível construir um modelo único para todos os parâmetros. Este fato pode facilitar a implementação deste procedimento quimiométrico rotineiramente para análise de amostras comerciais de leite.

Paradkar e Irudayaraj (2002) utilizaram a espectroscopia de FTIR associada às técnicas PLS e PCR (regressão de componentes principais) para a determinação de colesterol em leite fluido, leite em pó, iogurte, queijo e manteiga. O espectro do colesterol puro foi determinado e a região do infravermelho entre 2800 e 3200 $\text{cm}^{-1}$  foi usada para a quantificação dessa substância. Os autores verificaram que a espectroscopia por FTIR tem o potencial de estimar o conteúdo de colesterol nesses produtos.

### 2.1.6 Vantagens do método FTIR

De acordo com Eikren *et al.* (1990), as vantagens do método FTIR são:

- Vantagem de Jacquinet: a abertura denominada de Jacquinet é localizada na entrada do interferômetro e limita o feixe até um máximo aceitável para a resolução escolhida.

- Vantagem de Connes: a escala de frequência de um interferômetro é devida ao laser de hélio-neônio, que age como referência interna em cada deslocamento. A frequência desse laser é conhecida com exatidão, é muito precisa e de estabilidade muito boa em longo prazo. Por isso, ele se torna também um padrão interno de calibração do comprimento de onda.
- Eliminação da luz espúria (luz que chega ao detector, mas não foi absorvida pela amostra): o interferômetro modula cada frequência do infravermelho, assim, não há luz espúria. Como resultado, a relação linear entre absorvância medida e concentração é válida mesmo para bandas que absorvem fortemente, o que vem a ser grande vantagem na preparação da amostra para análise quantitativa.
- Espectro sem bandas de emissão: A amostra é usualmente disposta depois do interferômetro e antes do detector. Assim, a radiação de frequências de infravermelho emitida pela amostra não é modulada e, portanto, não é detectada, não havendo bandas de emissão no espectro para dificultar sua interpretação.
- Resolução constante: para todos os comprimentos de onda a resolução é a mesma.
- Continuidade no espectro: por não existir mudanças de redes ou filtros, não acontecem descontinuidades no espectro.

A determinação dos principais constituintes do leite é importante na indústria de laticínios, para a elaboração do pagamento por qualidade do leite, na informação dos consumidores e no controle de qualidade. Os métodos tradicionais para a

determinação da qualidade do leite e seus principais componentes são lentos e caros.

## 2.2 COMPOSIÇÃO DO LEITE

A composição média do leite é de 87,4% de água; 3,9 g de gordura; 3,2 g de proteína; 4,6g de lactose e 0,9 g de minerais e outros sólidos por 100 g de leite (Harding, 1995). A Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002) estabelece que o leite cru refrigerado deve conter no mínimo 2,9% de proteína, 3,0% de gordura e 8,4 % de extrato seco desengordurado (ESD).

O leite é uma combinação de diversas substâncias, dentre elas lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas em água. A distribuição e interações destas substâncias são determinantes para a estrutura, propriedades funcionais e para o processamento do leite. As micelas de caseína e os glóbulos de gordura são responsáveis pela maior parte das características físicas (estrutura e cor) encontradas nos produtos lácteos (Brito *et al.*, 2009).

A proteína verdadeira corresponde a todos os compostos nitrogenados do leite, exceto a fração não protéica. A uréia, ou nitrogênio uréico protéico é considerado um componente não protéico do leite. O nitrogênio não protéico representa entre 5 e 6% do total de nitrogênio do leite, enquanto que o nitrogênio protéico representa 95% desse total. Ele é composto de 30-50% de nitrogênio uréico, sendo o restante formado principalmente, pela creatinina, ácido úrico, aminoácidos e amônia (Broderick e Clayton, 1997; Roseler *et al.*, 1993).

A nomenclatura sólidos totais (ST) ou extrato seco total (EST) engloba todos os componentes do leite com exceção da água. Por sólidos não gordurosos (SNG) ou extrato seco desengordurado (ESD)

compreendem-se todos os componentes do leite, menos a água e a gordura (Behmer, 1985).

Os componentes do leite permanecem em equilíbrio, de modo que a relação entre eles é muito estável. O conhecimento dessa estabilidade é a base para os testes que são realizados com o objetivo de apontar a ocorrência de problemas que alteram a composição do leite (Behmer, 1985). Uma redução substancial da concentração de lactose ou dos sólidos totais poderia, por exemplo, levar a suspeita de adição fraudulenta de água, ao leite. Nesse caso, ocorrem alterações das propriedades físicas do leite, provavelmente detectáveis em laboratório (Brito *et al.*, 2009).

Outros fatores que podem interferir na composição do leite são: raça das vacas, alimentação (plano de nutrição e forma física da ração), temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, produção de leite e infecção da glândula mamária.

A determinação da composição centesimal do leite é fundamental para as indústrias de laticínios por ser fator preponderante para o rendimento industrial de queijos, manteiga, leite em pó, creme de leite, requeijão e outros produtos (Leite, 2006).

O pagamento do leite segundo a sua composição é uma forma de transmitir claramente à cadeia produtiva as necessidades e variações do mercado, orientando a sua produção (Ribas, 2000). Em relação à composição, o teor de gordura ainda é o parâmetro mais aplicado nos sistemas de pagamento pela qualidade, seguido por exigências em relação ao teor de proteína (Fonseca, 2001).

### **2.3 CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE**

As células somáticas (CS) são compostas principalmente de glóbulos brancos do sangue. A porcentagem dos diferentes tipos de células somáticas do leite, oriundas de glândulas sadias são: macrófagos (60%), linfócitos (25%) e neutrófilos ou leucócitos neutrófilos polimorfonucleares (15%). Aproximadamente 99% de todas as células do leite provenientes de um quarto infectado serão de glóbulos brancos do sangue, enquanto o 1% remanescente será de células epiteliais secretoras que se originam dos tecidos mamários. Juntos esses dois tipos de células formam a CCS do leite (Philpot e Nickerson, 2002).

A Contagem de células somáticas (CCS) é a medida mais usada para o monitoramento do estado inflamatório das glândulas mamárias e pode ser mensurada no leite proveniente de quartos individuais, vacas individuais, todo o rebanho ou um grupo de rebanhos. As células somáticas possuem um duplo propósito no úbere: combater os micro-organismos infecciosos por meio do processo de fagocitose, no qual o micro-organismo é envolvido e destruído e assistir na reparação dos tecidos secretores de leite, danificados pela infecção ou lesão (Philpot e Nickerson, 2002).

A mastite, ou estado inflamatório das glândulas mamárias determina mudanças nas concentrações dos principais componentes do leite (proteína, gordura, lactose e minerais). As concentrações de muitas enzimas, ou mesmo a sua atividade enzimática no leite encontram-se aumentadas durante a mastite (Kitchen, 1981). Além das enzimas de origem nas células somáticas, outras enzimas que têm origem no sangue e que passam através das junções entre as células epiteliais entram em contato com o leite (Fox e Morrissey, 1981; Andrews *et al.*, 1991). As enzimas de maior importância para a indústria de laticínios são aquelas com atividades proteolíticas, uma vez que o aumento da proteólise no leite e derivados apresenta

impacto negativo sobre a sua qualidade (Andreatta *et al.*, 2006). As alterações nas frações de proteínas do leite causadas pela mastite apresentam importantes implicações sobre o potencial do leite como matéria-prima para a fabricação de derivados, em especial de queijo, pois o rendimento industrial do leite está associado principalmente à fração de caseína (Auldust e Hublle, 1998; Ma *et al.*, 2000; Andreatta *et al.*, 2006).

O aumento das células somáticas no leite afeta negativamente a sua composição e o tempo de prateleira dos derivados lácteos, causando enormes prejuízos para produtores e para a indústria de laticínios. A elevada quantidade de células somáticas do leite resulta em diminuição da vida de prateleira do leite pasteurizado, afetando negativamente a sua qualidade sensorial (Santos *et al.*, 2003a; Santos *et al.*, 2003b). Isto ocorre pela ação das lipases sobre os triacilglicerídeos, resultando no aparecimento de defeitos sensoriais como o ranço, assim como pela ação de proteases, que causam proteólise da caseína (Santos *et al.*, 2006).

## **2.4 CONTAGEM BACTERIANA NO LEITE**

Há vários métodos para avaliação da microbiota do leite na plataforma. Um dos métodos mais tradicionalmente empregado é o da Contagem Bacteriana Total (CBT) ou Contagem Global, que, como o próprio nome sugere, é a contagem do número de colônias bacterianas presentes numa amostra de leite – previamente incubada a 32°C durante 48 horas. A CBT dependerá da microbiota inicial do leite, bem como da taxa de multiplicação microbiana. Geralmente alta CBT não é decorrente de problemas de mastite na propriedade, salvo algumas exceções, quando há alta incidência de mastite causada por *Streptococcus agalactiae*, ou mesmo em

surtos de *Streptococcus uberis* ou *Escherichia coli*. O leite de uma vaca sadia, coletado de forma asséptica, por exemplo, contém menos de 1000 UFC/mL. Já o leite de um animal com infecção na glândula mamária por alguns destes agentes pode apresentar contagens de até 10.000.000 UFC/mL, o que, num rebanho de 100 vacas em lactação, pode elevar a CBT do tanque para 100.000 UFC/mL (Mendes, 2006).

A ordenha de animais com tetos sujos e/ou úmidos está diretamente associada a uma alta CBT no leite, e a presença de fezes ou barro nos tetos pode levar à alta contagem de coliformes ou mesmo de bactérias psicrotóxicas. Portanto, um correto manejo de ordenha, com ênfase na preparação dos tetos antes da ordenha (limpeza, *pré-dipping* e secagem completa dos tetos), associado a um programa de controle de mastite, são fundamentais para a obtenção de um leite de alta qualidade (Mendes, 2006).

Outra possível fonte de bactérias é a superfície do sistema de transporte e armazenamento do leite, o que inclui insufladores, copos coletores, mangueiras, tubulações, válvulas, medidores de leite, bombas de leite, pré resfriadores, tanques de resfriamento, etc. Portanto, deve-se estar sempre atento ao programa de limpeza e sanitização, além da correta manutenção do equipamento de ordenha (Santos e Fonseca, 2001).

Visando a diminuição da CBT do leite, o pagamento pela qualidade é um instrumento empregado pelas indústrias para incentivar o produtor a investir em cuidados que resultem em melhor qualidade do produto. Além de bonificações, podem ser incluídas penalizações. Esses programas têm constituído em ferramentas importantes na motivação de produtores. Os incentivos variam entre as indústrias ou cooperativas, porém indicadores, como a CBT, a contagem de células somáticas, a ausência

de resíduos de antibióticos ou de fraude por adição de água e soro, são contemplados. Desta maneira as indústrias ou cooperativas estabelecem seus próprios requisitos, que geralmente, são mais rigorosos que os padrões oficiais (Instrução normativa 51/2002), oferecendo bonificações para os produtores que se adequarem às normas de produção (Guimarães *et al.*, 2006).

Nas análises realizadas em alimentos, o interesse por métodos rápidos e automatizados tem crescido nas últimas décadas. Equipamentos que se baseiam na citometria de fluxo, como o Bactoscan (Foss North America, Brampton, Ontario) e Bactocount (Bentley Instruments Incorporated, Chaska, Estados Unidos da América) foram desenvolvidos visando à análise de rotina da qualidade microbiológica do leite cru. Entretanto, estes equipamentos se limitam a estimar a contagem bacteriana total ou a contagem de células somáticas, não fornecendo outras informações, como a diferenciação microbiana (Gunasekera *et al.*, 2000; Suhren e Walte, 2000).

## **2.5 ACIDEZ TITULÁVEL E PH DO LEITE**

O leite recém ordenhado é ligeiramente ácido e apresenta um pH entre 6,6 e 6,8. Esta acidez é conhecida como acidez natural, e tem origem nos seus componentes normais, tais como: citratos, dióxido de carbono, caseínas e fosfatos. Por outro lado, quando o leite é obtido sob condições inadequadas de higiene e refrigeração deficiente, ocorre o aumento de ácidos orgânicos, em especial do ácido láctico, produzido por micro-organismos fermentadores da lactose, resultando na chamada acidez adquirida, a qual, em conjunto com a acidez natural, forma a acidez real do leite. A acidez do leite pode ser medida por duas formas: pH metro ou pelo método da acidez titulável, a exemplo

do método Dornic (Silva *et al.*, 1997; Santos e Fonseca, 2000).

Leite fresco analisado diretamente de vacas individuais contém pouca bactéria e pouco ácido láctico; mesmo assim possuem valores de acidez que variam de 0,10 a 0,30. Para análises realizadas em leite do tanque, os valores variam de 14 a 18 °D. Os componentes que contribuem para essa acidez normal do leite são o dióxido de carbono, a proteína, os fosfatos e os citratos. Quanto maior a concentração destes compostos, maior a acidez observada. Em razão disso, o leite de uma vaca Jersey normalmente terá maior acidez que o de uma Holandesa, já que o leite da Jersey tem maior porcentagem de proteína (Peres, 2001).

Os valores de pH e acidez do leite não são totalmente proporcionais, embora haja uma relação inversa; ou seja, à medida que a acidez se eleva, ocorre abaixamento do pH. A dificuldade na obtenção de uma boa correlação está ligada ao fato que na determinação da acidez são quantificados os prótons hidrogênio livres (íons) e acessíveis (ionizáveis/dissociáveis); por outro lado, apenas os prótons hidrogênio livres (íons) são quantificados na determinação do pH (Silva e Torres, 1995).

## **2.6 URÉIA NO LEITE**

### **2.6.1 Origem do nitrogênio uréico no leite**

A uréia é uma molécula orgânica composta de carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio, com uma massa molecular de 60 g/mol. Este é um componente do sangue e de outros fluidos corporais (leite, saliva, urina, suco gástrico e intestinal). A uréia é parte da fração de nitrogênio não protéico, a qual inclui compostos que contêm nitrogênio, como aminoácidos, creatina, creatinina, ácido úrico, algumas vitaminas,

aminas biogênicas, açúcares aminados, etc. As concentrações normais de uréia no leite estão na faixa de 10-30 mg/100 mL, ou 1,7-4,5 mmol/L (Marenjak *et al.*, 2004, citado por Bendelja *et al.*, 2009).

De acordo, com Gaona (2002), os níveis de uréia aceitos como normais são valores entre 10 e 16 mg/dL no leite. Torrent (2000), por sua vez, afirma que os valores de uréia em leite de vacas com uma ingestão ótima de matéria seca enquadram-se tipicamente na faixa de 12-18 mg/dL.

A uréia é uma pequena molécula neutra que se difunde facilmente pelas membranas. Uma vez que o leite é secretado pelas células alveolares da glândula mamária, a uréia se difunde para dentro ou para fora das células secretoras, entrando em equilíbrio com a uréia plasmática (Jonker *et al.*, 1998).

Três frações de nitrogênio distintas podem ser encontradas no leite: as caseínas, as proteínas do soro e o nitrogênio não protéico (NNP). Os termos caseína e proteínas do soro são utilizados para descrever o grupo de proteínas do leite que permanecem, respectivamente insolúveis e solúveis no leite após a precipitação em pH 4,6 a 20°C. O grupo dessas duas frações nitrogenadas é também referido como proteína verdadeira (PT). A fração NNP é composta por moléculas de baixo peso resultantes do metabolismo do nitrogênio. As três frações de nitrogênio compõem um grupo denominado de proteína bruta (PB). A caseína é a principal fração de proteína no leite constituindo 85 a 90% da proteína verdadeira e 75 a 85% da proteína bruta. A fração de nitrogênio não protéico é a diferença entre a proteína bruta e a proteína verdadeira e é composta por uréia, amônia, creatinina, creatina e ácido úrico. A uréia representa mais do que 50% do NNP (Tabela 2) (Broutin, 2006).

O nitrogênio uréico do leite é considerado nitrogênio não protéico. A concentração de uréia no leite é um subproduto do metabolismo das proteínas. A digestão de proteína na dieta resulta na produção de amônia. O amoníaco é convertido em uréia no fígado. A uréia é então excretada do organismo, principalmente através da urina, mas também é encontrada no sangue e no leite (Mitchell *et al.*, 2005). Níveis de uréia no leite têm sido utilizados para avaliar o estado nutricional do rebanho, bem como avaliar a excreção de nitrogênio para o ambiente (Jonker *et al.*, 1998).

A proteína da alimentação das vacas é classificada em dois componentes, a proteína degradável no rúmen (PDR) e a proteína não degradável no rúmen (PNDR). A proteína não degradável no rúmen é por vezes referida como proteína ruminal *bypass*, pois resiste às condições no rúmen e é decomposta no intestino delgado. A proteína degradável no rúmen é usada pelos micro-organismos ruminais e convertida em proteína microbiana, que por sua vez é usada pela vaca para produzir leite. Para que os micro-organismos ruminais possam produzir proteínas, eles precisam de uma fonte de carboidratos solúveis e proteína solúvel, principalmente na forma de amônia. O excesso de amônia no rúmen move-se através da parede do rúmen para a corrente sanguínea. Como a amônia é muito tóxica para a maioria dos mamíferos ela precisa ser removida do corpo. A amônia sanguínea é convertida em uréia não tóxica no fígado. A uréia é um pequeno composto solúvel que se equilibra em todas as partes do corpo e é encontrada no leite, sangue e urina. A urina é a principal via de excreção do corpo, como um produto residual. A conversão de amônia em uréia no fígado requer uma quantidade substancial de energia que poderia ser usada para produzir leite (Young *et al.*, 2001).

Tabela 2- Distribuição percentual dos principais compostos do NNP do leite.

Composto nitrogenado (%)	Porcentagem relativa em relação ao NNP do leite (%)	Concentração no leite
Uréia	48	14,21
Creatina	8,6	2,55
Creatinina	4,1	1,21
Ácido úrico	2,7	0,78
Ácido orótico	5,2	1,46
Ácido hipúrico	1,4	0,44
Peptídeos	11,0	3,20
Amônia	3,1	0,88
Aminoácidos	15,1	4,43
Desconhecidos	ND	0,48

Fonte: Harding (1992) e DePeters et al. (1993)

Como o nome sugere, o nitrogênio uréico representa a porção do nitrogênio no leite na forma de uréia. O nível de nitrogênio uréico do leite acompanha os níveis de nitrogênio uréico no sangue (com atraso de 1 a 2 horas). O nitrogênio uréico no leite reflete assim, o nível de nitrogênio sanguíneo nas últimas 12 horas que o leite foi produzido (8 horas se as vacas forem ordenhadas 3 vezes ao dia) (Peres, 2001).

Segundo Roseler *et al.* (1993), as concentrações de NUL podem ser utilizadas para estimar as concentrações de nitrogênio uréico no sangue (NUS) ou no plasma (NUP), uma vez que o coeficiente de correlação entre NUP e NUL foi de 0,88.

Jonker *et al.* (1998) concordam com essa afirmativa. Ao estudarem as concentrações de NUS e NUL ao longo do dia, Gustafsson

e Palmquist (1993) demonstraram que as concentrações de NUS aumentam após a alimentação, atingindo pico 3 horas após seu início, voltando às concentrações iniciais, obtidas antes da refeição, em 5 a 6 horas. As concentrações de NUL apresentaram padrão semelhante de resposta ao longo do dia, apesar de atrasadas em uma hora em relação às de NUS (Zeni, 2010).

Ferguson (1999) mensurou os níveis de uréia sanguínea, uréia no leite do controle leiteiro oficial e a uréia no leite de cada ordenha separadamente. Foram coletadas 166 amostras de 37 vacas durante 5 meses. Conforme a tabela 3, a uréia média no leite da ordenha da manhã e o da tarde são respectivamente, 12,25 e 14,35 mg/dL; desvio padrão de 2,25 e 2,2; faixa de níveis de 7,6 a 20,6 mg/dL e de 8,2 a 20,1 mg/dL.

Tabela 3- Níveis de uréia sanguínea, uréia no leite submetido a controle leiteiro oficial e a uréia no leite da ordenha da manhã e da tarde.

	URÉIA MÉDIA (mg/dl)	DESVIO-PADRÃO	FAIXA DE NÍVEIS
Uréia no sangue	12,11	2,31	6,0-19,0
Uréia no leite (manhã)	12,25	2,25	7,6-20,6
Uréia no leite (tarde)	14,35	2,2	8,2-20,1
Uréia no leite, oficial	13,11	2,99	2,3-23,0

Fonte: Vinne, APCBRH/PARLPR (2011), adaptado de Ferguson (1999)

### 2.6.2 Teor de uréia e proteína na alimentação de vacas de leite

A concentração de nitrogênio uréico no leite (NUL) é uma ferramenta útil para avaliar se um rebanho de vacas está sendo alimentado com quantidades ótimas de proteína, se a relação entre proteína degradável e não degradável na dieta está ideal ou, ainda, se o balanço entre o consumo de proteína e energia pelas vacas está adequado (Carlsson e Bergstrom, 1994; Meyer *et al.*, 2006).

Valores médios de uréia no leite do rebanho menores que 12 mg/dL (alguns valores individuais abaixo de 8 mg/dL) refletem deficiência protéica ou excesso de carboidratos na dieta. Isto pode limitar a fermentação ruminal, a produção de proteína microbiana e o desempenho animal. Por outro lado se a média de uréia no rebanho estiver acima de 18 (geralmente valores individuais acima de 25 mg/dL) perdas severas devem estar ocorrendo, i.e., perda energética para eliminação da uréia, menor taxa de concepção, deficiência imunológica, desperdício de proteína, contaminação ambiental (Peres, 2001).

De acordo com Oltner *et al.* (1985), citado por Meyer *et al.* (2006) não é possível estimar com certeza, a partir de uma única

determinação de uréia, o “status” nutricional de uma vaca. Mas, quando as concentrações médias de uréia no leite são determinadas em grupos de animais ou em rebanhos, inferências diretas, com relação à adequação da alimentação, parecem ser possíveis. Contudo, é improvável que uma concentração específica de uréia no leite possa ser definida para que seja válida durante todos os estágios de lactação e sob todas as condições de alimentação e manejo. Fatores como a relação entre a capacidade de consumo de alimento e o potencial de produção de leite, o custo dos alimentos disponíveis e seu efeito geral sobre a saúde e fertilidade das vacas afetarão a decisão de qual é a concentração de uréia adequada.

Wang *et al.* (2007) descreveram que com o aumento nos níveis de proteína metabolizável da dieta, a concentração de uréia aumenta linearmente no plasma sanguíneo, na urina e no leite. O excesso de proteína na dieta está relacionado a um aumento de uréia no leite levando a problemas de fertilidade no rebanho. Outro importante argumento para o monitoramento do metabolismo protéico é o alto custo associado ao desperdício deste nutriente (González *et al.*, 2001).

Um sistema para avaliar a eficiência da oferta de proteínas em relação à exigência

em vacas leiteiras é benéfico, de acordo com Roseler *et al.*(1993). Esse sistema pode ser usado para melhorar a eficiência do uso de nitrogênio (N) em fazendas leiteiras e para reduzir as perdas de N para o ambiente. Vacas alimentadas com dietas com excesso de proteína resultam em altas concentrações endógenas de uréia no sangue, leite e urina. Estas altas concentrações de uréia endógena têm sido associadas com infertilidade (Ferguson e Chalupa, 1989; Ropstad e Refsdal, 1987), redução da disponibilidade de energia (Tyrrell e Moe, 1975), poluição ambiental (Tamminga, 1992), e perdas econômicas.

A uréia e os outros compostos de nitrogênio não protéico (NNP) têm sido amplamente utilizados para a alimentação de ruminantes a fim de atender as suas necessidades de proteína, já que fontes protéicas convencionais são caras. Como a uréia entra no rúmen e é rapidamente hidrolisada à amônia pela urease bacteriana, a concentração ruminal de amônia é susceptível de aumentar consideravelmente. Para essa amônia ser eficientemente incorporada na proteína microbiana, duas condições devem ser satisfeitas. Em primeiro lugar, a concentração de amônia inicial deve ser inferior ao valor ótimo e em segundo lugar, o micro-organismo deve ter uma fonte de energia prontamente disponível para a síntese protéica. Portanto, a uréia não será utilizada de forma eficiente pelos ruminantes, sem proteína degradável no rúmen (PDR) para satisfazer as necessidades dos micro-organismos do rúmen (Roy *et al.*, 2010).

Segundo Hammond (1997), determinações de NUP e NUL são solicitadas como recursos para diagnóstico retrospectivo envolvendo a análise da resposta biológica de ruminantes à suplementação com energia ou proteína e às mudanças relativas ao tipo de forragem ou pastagem oferecida aos animais. O conhecimento dos teores dos referidos indicadores, associados às

análises dos componentes protéicos degradáveis e não degradáveis e nível de carboidratos fermentáveis da ração, pode auxiliar na avaliação de como a proteína da dieta é utilizada (Magalhães, 2003).

### **2.6.3 Concentração de uréia no leite e o rendimento industrial**

O aumento nas concentrações de nitrogênio não protéico no leite determina um menor rendimento industrial para produção de queijos. Gustafsson e Palmquist (1993) observaram a associação do maior tempo para coagulação do leite usado na fabricação de queijos com o aumento das concentrações de nitrogênio não protéico no leite. As concentrações de uréia no leite (NUL) podem ser utilizadas para estimar as concentrações de nitrogênio uréico no sangue (BUN) ou nitrogênio uréico no plasma (PUN) (Ferreira *et al.* 2006).

### **2.6.4 Desempenho reprodutivo e o Nitrogênio uréico no leite (NUL)**

De acordo com Melendez *et al.* (2000), vacas com alto NUL, prenhas durante o verão, apresentaram 18 vezes maior risco de não prenhez comparadas às com baixo NUL, prenhas durante o inverno. O estudo foi realizado com dois grupos de 515 vacas classificadas como tendo elevado NUL (17 a 25 mg/dL) e 558 vacas com baixo NUL (6 a 16 mg/dL), no prazo de 30 dias antes da primeira cria. Dessas um total de 158 (30,6%) vacas do grupo com elevado NUL e 189 (33,8%) vacas do grupo com baixo NUL foram diagnosticadas como prenhas.

As concentrações de uréia no plasma (NUP) e no leite (NUL) foram correlacionadas com a taxa de prenhez em vacas leiteiras em estudo feito por Butler *et al.* (1996). Em dois experimentos, as amostras de sangue ou de leite foram coletadas no dia da inseminação artificial (IA) de vacas da raça Holandesa (n = 160 e

n = 155, respectivamente). Três métodos de análise de NUL foram comparados. Dois processos químicos de laboratório deram resultados semelhantes, enquanto que um método rápido superestimou os teores de uréia. Concentrações de nitrogênio uréico superiores a 19mg/dL no plasma e no leite foram associados com uma diminuição de aproximadamente 20 pontos percentuais na taxa de prenhez após inseminação artificial em vacas leiteiras em lactação. Portanto, pode ser benéfico para o produtor de leite monitorar as concentrações de uréia em seu rebanho para manter, ou melhorar a eficiência reprodutiva.

Rajala-Schultz *et al.* (2001) avaliaram a associação entre o nitrogênio uréico no leite (NUL) e a fertilidade de vacas leiteiras utilizando dados de campo. As vacas com níveis abaixo de 10,0 mg/dL de NUL e entre 10,0 e 12,7mg/dL tiveram, respectivamente, 2,4 vezes e 1,4 vezes de aumento na probabilidade de se tornarem prenhas, do que vacas com valores acima de 15,4 mg /dl de NUL. Os resultados indicam que os níveis crescentes de NUL são negativamente correlacionados com a fertilidade de vacas leiteiras e estão associados a um menor risco de prenhez detectável nos rebanhos. Eles também sugerem que os níveis de NUL inversamente associados com a fertilidade podem ser menores do que os relatados anteriormente.

#### **2.6.5 Horário de coleta do leite e o teor de uréia**

Os níveis de uréia no leite e no sangue foram estimados por Miettinen e Juvonen (1990) para investigar as diferenças no metabolismo do nitrogênio em vacas alimentadas com ração em conformidade com as normas de alimentação finlandesa. Em leite preservado com azida sódica, ou no leite armazenado a 4°C, a uréia do leite manteve-se inalterada durante uma semana,

mas a uréia diminuiu gradualmente no leite mantido em temperatura ambiente, comprovando que o leite deve ser preservado com azida sódica ou deve ser mantido a 4 °C para a estimativa de uréia. Houve elevação de uréia após a alimentação matinal, mas não durante a ordenha da tarde. O aumento da uréia foi significativo no horário de 06:00 h às 10:00 h, enquanto de 10:00-14:00 h, houve apenas um ligeiro aumento. A uréia do leite aumentou significativamente desde a manhã até a tarde do dia da amostragem. No grupo alimentado com feno e uréia, a uréia no leite e no soro foram significativamente maiores do que no grupo alimentado com silagem. A concentração de uréia do leite foi diretamente correlacionada com a do soro em todos os momentos. Essa correlação variou entre 0,86 a 0,96 para as coletas da manhã e tarde, respectivamente. Portanto, os teores de uréia no leite foram adequados para acompanhar o balanço de nitrogênio em vacas leiteiras.

Broderick e Clayton (1997) verificaram o aumento na concentração de uréia no leite ordenhado no período da tarde em intervalo de ordenhas de 12 horas, pela manhã e à tarde. Os baixos teores de NUL pela manhã, podem ser explicados pelo fato que o pico de concentração de uréia sanguínea aparece duas a quatro horas após a distribuição de alimentos em uma ou duas vezes por dia, e o pico de NUL ocorre cerca de uma a duas horas após o pico de concentração no sangue (Manston 1981; Gustafsson & Palmquist 1993; Socorro *et al.*, 2001).

#### **2.6.6 Período de Lactação e o NUL**

Em relação à lactação, de acordo com DePeters e Cant (1992), o teor de caseína no leite declina com o número de parições, sendo que o decréscimo em PB não é tão grande em razão do aumento do NNP. Com três anos de idade, a vaca está no auge da

produção com leite mais rico em proteína, declinando essa produção de leite gradualmente com a idade, sendo que o teor em caseína diminui e o teor em proteínas do soro aumenta (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984). Observa-se que o teor em nitrogênio total, nitrogênio caseínico e NNP decrescem rapidamente após o parto até um mínimo em torno de 5 a 10 semanas de lactação, seguindo-se um aumento gradual até o fim da lactação (DePeters e Cant, 1992; Fox e McSweeney, 1998).

Alguns fatores verificados após a detecção de níveis alterados de uréia no leite são apresentados no quadro 2.

Quadro 2- Fatores associados aos níveis de nitrogênio uréico no leite (MUN), em relação aos dias de lactação de vacas leiteiras.

DIAS EM LACTAÇÃO	PROTEÍNA NO LEITE %	MUN (mg/dL)		
		Baixo (<12)	Médio (12-18)	Alto (>18)
ATÉ 45 DIAS	<3,0	Def. PB ou PD	PD e OS normal, baixo PI e CHOf	OS, PD em excesso em relação à CHOf, desbalanço AA
	3,0-3,2	PD baixa em relação à energia	PD, PI, AA em equilíbrio	Excesso de PD, AA e energia
	>3,2	PD baixa, AA em equilíbrio, excesso energia	PD, PI e AA em equilíbrio, excesso energia	Excesso PD, AA em equilíbrio, excesso energia
46-150 DIAS	<3,0	Def. de PD, PB e ou PI	PS, PD, PI e AA em equilíbrio	OS, Pd em excesso em relação à CHOf desequilíbrio AA
	3,0-3,2	Def. PD e PS	Proteína e CHO em equilíbrio	Excesso de PD, PS e CHO em equilíbrio
	>3,2	Def. PD e excesso de energia de CHO	Proteína, AA e CHO em equilíbrio	Excesso de PD, PS em relação a CHO e energia líquida
>150 DIAS	<3,0	Def. de PD, PS e CHO	PS, PD em equilíbrio, AA em desequilíbrio	Excesso de PS, PD em relação à CHOf, desequilíbrio AA e/ou falta de energia líquida
	3,0-3,2	Def. de PS e PD em relação à energia líquida	PD, PS e AA em equilíbrio	Excesso de PD, deficiência parcial de AA
	>3,2	AA em equilíbrio, Def. de energia	AA e energia em equilíbrio	Excesso de PD, Equilíbrio de AA e energia líquida

Legenda: AA=aminoácidos                      CHOf=carboidratos fermentáveis                      PD=ingestão proteína degradável  
MUN=nível de uréia no leite                      PS=ingestão de proteína solúvel                      PI=ingestão de proteína insolúvel  
Fonte: Vinne, site da APCBRH/PARLPR (2011).

### **2.6.7 Relação entre estação do ano e a uréia no leite (NUL)**

Os altos teores de uréia no leite observados durante os meses de verão, têm sido relatados por alguns autores (Carlsson *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1997). Eles relataram que a proteína total e a proteína verdadeira (principalmente a caseína) no leite foram mais baixos durante os meses de verão, enquanto NNP, que inclui a uréia, aumentou (Van Soest, 1994; Carlsson *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1997). Ferguson *et al.* (1997) relataram que o teor de uréia no leite por estação variou da seguinte forma: no inverno, de  $5,00 \pm 0,071$  mg/dL; na primavera,  $5,35 \pm 0,075$  mg/dL; no verão,  $5,83 \pm 0,086$  mg/dL; no outono,  $5,07 \pm 0,093$  mg/dL.

O efeito da estação do ano sobre os teores de TUL (teor de uréia no leite) se confunde com o estágio de lactação e diferenças nutricionais. Moller *et al.* (1993) atribuíram a variação do TUL às mudanças sazonais na proteína da pastagem e componentes de energia. A pastagem australiana na primavera contém de 20 a 30% de PB e 5 a 20% de carboidratos solúveis, criando, assim, uma alta relação proteína: energia, o que poderia resultar em teores elevados de uréia no leite. Os estudos que descrevem os efeitos dos fatores não- nutricionais associados com a estação do ano (clima, consumo de água, consumo de matéria seca, ou estágio de lactação) sobre o teor de uréia no leite são escassos. Arunvipas *et al.* (2002) descreveram elevadas concentrações de nitrogênio uréico no leite no final do inverno/início do verão (março- abril) no Canadá, com os maiores valores ocorrendo em julho e agosto (13,10 mg/dL).

### **2.6.8 Mastite e sua relação com o nitrogênio uréico no leite (NUL)**

Segundo LICATA (1985), leite proveniente de vacas com mastite detectado por teste

CMT (California Mastitis Test) apresentaria um TUL (teor de uréia no leite) menor de 1,2 mg/dL comparativamente a leite com CMT negativo. Também, Faust e Kilmer (1996) encontraram uma correlação negativa entre TUL e o valor de contagem de células somáticas.

De acordo com Meyer *et al.*, (2006), a contagem de células somáticas (CCS) influenciou as concentrações de NUL ( $P=0,001$ ). A equação linear se ajustou bem para explicar os efeitos da CCS sobre NUL ( $P=0,9000$ ), observando-se coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,1994. As concentrações de NUL diminuíram em 0,29 mg/dL a cada aumento de uma unidade no escore linear de CCS. Arunvipas *et al.* (2002), por sua vez, observaram, a cada aumento de uma unidade no escore linear, redução da concentração de NUL em 0,4 mg/dL.

Wolfschoon-Pombo (1981) relatou que a mastite pode influenciar a concentração de uréia na amostra do quarto infectado da glândula mamária, como resultado da alteração na permeabilidade das membranas das células. Godden *et al.* (2001) constataram associação negativa não-linear entre a uréia no leite e o escore linear da contagem de células somáticas, mas relataram que essa associação pode não representar uma relação biológica entre esses dois parâmetros, podendo ser um artefato do instrumento de calibração.

### **2.6.9 Nitrogênio uréico e contaminação ambiental**

É preocupante o impacto ambiental resultante da incorporação de resíduos alimentares não digeridos ou não utilizados pelos animais de produção, principalmente em sistemas de confinamento para rebanhos de leite e corte (Tamminga, 1992). Os dejetos animais contribuem para a poluição do ambiente por nitrogênio, principalmente

em função da amônia volatilizada para o ar e nitratos que se incorporam ao solo e contaminam águas superficiais.

Com base nos teores de NUL e NUP, pode-se, por exemplo, programar ajustes visando evitar desperdícios decorrentes de perdas urinárias de nitrogênio, que acarretam prejuízos óbvios à produção animal e contaminação ambiental (Jonker *et al.*, 2002; Schepers e Meijer, 1998). Salienta-se neste aspecto, que a excreção urinária de nitrogênio tem correlação linear e positiva com os valores de NUP e NUL (Jonker *et al.*, 1998; Kauffman e St- Pierre, 2001). Isto significa que os valores de NUL e NUP podem também ser utilizados para a predição do nível de contaminação ambiental por nitrogênio (Kauffman e St- Pierre, 2001; Kohn *et al.*, 2002; Magalhães, 2003).

#### **2.6.10 Análise da uréia por metodologia enzimática**

A análise de uréia (NUL) pode ser realizada por metodologia enzimática, como, por exemplo, por meio do equipamento ChemSpec 150 (Bentley Instruments, 1999). Esse instrumento baseia-se na reação de Berthelot. A determinação ocorre em duas etapas. Primeiramente a amostra é coletada e transportada para um reservatório automaticamente e mantida a 40°C, onde é adicionada a enzima urease que durante a reação libera amônia e dióxido de carbono. Depois de um tempo de incubação, a adição de uma solução de corante e um ativador, forma um complexo de coloração verde. A intensidade de cor é proporcional à concentração de amônia, a qual é determinada espectrofotometricamente. Para a leitura, é adicionado um catalisador no corante a fim de acelerar a reação, intensificando o desenvolvimento da cor verde e melhorando a sensibilidade do método. O uso de instrumento de alta precisão dispensa a utilização de diluições.

O leite é diluído com os reagentes usados para melhorar as leituras do espectro, prevenindo as interferências de outros componentes do leite. Os resultados são expressos em mg/dL (AOAC, 1994; Peres, 2001).

Atualmente as determinações dos teores de NUL são feitas com o auxílio de equipamentos automatizados que utilizam metodologia colorimétrica-enzimática (urease), metodologia enzimática potenciométrica, onde a amônia produzida é detectada por eletrodos (Lima *et al.*, 1998), ou ainda espectrofotometria em infravermelho (Ferguson, 2001; Godden *et al.*, 2001). Estes aparelhos conseguem realizar várias análises em pouco tempo, não requerem nenhuma etapa prévia destinada a desengordurar ou precipitar proteínas da amostra e fornecem resultados muito precisos (Magalhães, 2003).

#### **2.6.11 Análise de uréia ou nitrogênio uréico no leite por metodologia do infravermelho -FTIR**

A tecnologia de infravermelho tem sido muito utilizada para medir a gordura e proteína no leite. As moléculas orgânicas, quando aquecidas emitem um espectro de reflectância do infravermelho que é consistente com o tipo de moléculas presentes. O espectro de reflectância pode ser correlacionado com a concentração da molécula a ser utilizado para avaliar o conteúdo em uma amostra. Em 1998, os centros de DHIA (Dairy Herd Information Association) começaram a empregar essa tecnologia para medir a uréia do leite (Ferguson, 2011).

De acordo com Godden *et al.*, (2001) os métodos espectrofotométricos no infravermelho (IR) foram introduzidos no início de 1990 para estimar a concentração de uréia no leite. O uso da tecnologia IR por Laboratórios DHI (Dairy Herd

Improvement) ofereceu um meio rápido e barato de medir concentrações de uréia no leite (UL), consistente com os resultados obtidos em estudos que utilizaram animais alojados individualmente em condições de pesquisa e métodos químicos para medir a uréia do leite. Godden *et al.* (2000) por meio do equipamento Fossomatic 4000 Milk Analyser (Foss North América, Brampton, Ontário) relataram que a radiação ionizante pode ser utilizada para medir UL em amostras de leite DHI, desde que os dados sejam interpretados em nível de rebanho e não individualmente.

Baumgartner *et al.* (2003) avaliaram o potencial da espectroscopia de FTIR para a determinação da concentração de uréia em leite. Eles concluíram que há alta correlação entre o método de injeção de fluxo automático e o FTIR para a determinação deste componente.

Em um estudo realizado por Esteves (2006) para estabelecer a interferência que a adição de uréia pode causar na determinação dos componentes do leite (hipótese de fraude), constatou-se um aumento significativo nos teores de proteína bruta (PB), sólidos totais (ST) e lactose e uma redução no teor de gordura quando estes foram quantificados pelo método de Espectrometria de Absorção no Infravermelho Médio (EIMV). O mesmo resultado foi encontrado em um estudo realizado por Roma Júnior *et al.* (2006) e por Araújo (2009).

De acordo com o guia de usuário do equipamento CombiScope FTIR (Advanced/Delta Instruments) é utilizado um método alternativo, por meio do qual os resultados da uréia são calculados através de um modelo matemático de amplo espectro PLS, que prediz os teores do nitrogênio uréico no leite baseados nos resultados de referência do nitrogênio não protéico (NNP) (Delta Instruments, 2007 e 2009).

A amostra de leite é aquecida a 40°C, agitada, aspirada para o interior do equipamento, onde recebe a irradiação pelo feixe de luz infravermelha. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho e é quantificada, sendo transformada em teores dos componentes, de acordo com a curva de calibração. O espectrofotômetro com transformada de Fourier expõe a amostra a um único pulso de radiação e de medidas de resposta. O sinal resultante, chamado de indução bifásica, é uma medida direta da coerência temporal da luz e contém uma rápida decadência composta de todas as possíveis frequências. Como o sinal medido no interferômetro não pode ser interpretado, é necessária a técnica matemática chamada de Transformação de Fourier. Esta transformação é realizada pelo computador (algoritmos de software), apresentando ao usuário as informações desejadas para a análise espectral (Delta Instruments, 2007 e 2009).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Realizar a validação de equipamento baseado na espectroscopia de infravermelho por metodologia em Fourier Transform Infrared (FTIR) para a avaliação do teor de uréia (NUL) no leite cru.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Determinar a reprodutibilidade e repetibilidade do FTIR; comparar os métodos de mensuração das concentrações de NUL por meio de espectroscopia FTIR e metodologia enzimática;

- Determinar as concentrações de NUL no leite de rebanho no Estado de Minas Gerais;

-Verificar a determinação dos outros componentes do leite realizado pelo equipamento eletrônico CombiScope FTIR (Delta Instruments).

- Avaliação da detecção de fraude por adição de uréia ao leite e correlação com os teores de proteína antes e após a fraude.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 COLETA DAS AMOSTRAS**

As amostras de leite cru utilizadas foram obtidas a partir do “pool” das amostras de leite coletadas em tanques e que são enviadas pelas indústrias para análise no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG). A repetibilidade e reprodutibilidade do CombiScope, a comparação com um método enzimático automatizado (ChemSpec 150<sup>®</sup>, Bentley Instruments), a fraude por adição de uréia ao leite e a correlação com os teores de proteína antes e após a fraude foram testados utilizando, respectivamente, 228, 570, 500 e 285 amostras de leite cru conservadas com bronopol.

Para o teste da estabilidade da uréia no leite de acordo com o tempo e temperaturas de estocagem, foram coletadas cinco amostras de leite de conjunto, com três litros cada, a partir de “pool” de pelo menos oito animais da Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Igarapé, Minas Gerais.

Desde a coleta nas propriedades rurais, as amostras de leite cru foram mantidas sob

refrigeração (IDF, 1995b) em recipientes isotérmicos adicionados de gelo reciclável previamente mantido a uma temperatura de -10°C e em quantidade suficiente para garantir a manutenção das amostras a uma temperatura de 0°C a 4°C. As amostras foram acondicionadas em frascos com comprimido de bronopol<sup>®1</sup> para as análises de composição do leite, CCS e uréia e em frascos com comprimido de azidiol<sup>2</sup> para análise de CBT.

### **4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES**

As análises da composição físico-química dos leites foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG) e no Laboratório de Análises Físico-Químicas do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG. As análises microbiológicas (contagem bacteriana total) dos leites foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG).

### **4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS**

#### **4.3.1. Avaliação da repetibilidade do método**

A repetibilidade ou repetitividade (r) é definida como o valor abaixo do qual a diferença absoluta entre os resultados de duas simples determinações, obtidos com o mesmo método em materiais idênticos, sob as mesmas condições (mesmos aparelhos, operador, laboratório e em rápida sucessão), é esperada com uma

---

<sup>1</sup> (2- bromo-2nitro-1,3-propanodiol)

<sup>2</sup> (azida sódica e cloranfenicol)

probabilidade determinada (por exemplo, 95%) (IDF, 1999; Esteves, 2006).

A partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios sob condição de repetibilidade é aconselhável calcular o limite de repetibilidade "r" que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises duplicatas de uma amostra, determinada sob condições de repetibilidade, é significativa. Para um nível de confiança de

95%, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo a equação 1 (Nascimento *et al.*, 2008).

$$r = 2,8 \cdot Sr \quad (\text{equação 1})$$

Onde: Sr = desvio-padrão de repetibilidade

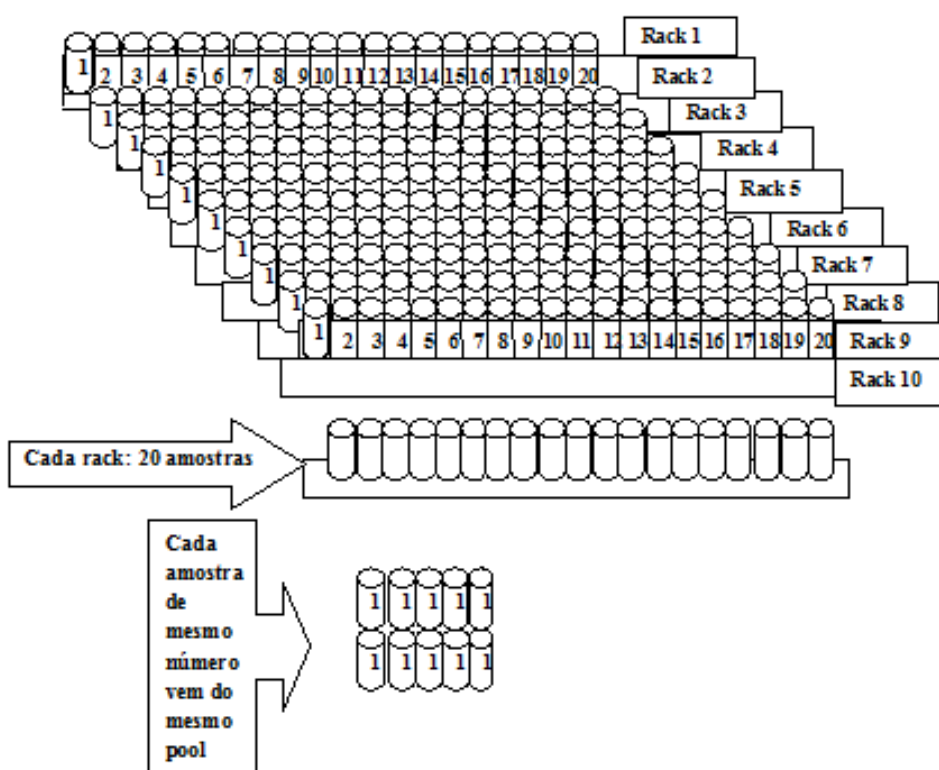


Figura 3- Esquema da repetibilidade do método infravermelho.

A repetibilidade da análise do teor de uréia no leite cru pelo equipamento CombiScope FTIR (Advanced/Delta Instruments) foi testada utilizando 200 amostras de leite cru, previamente adicionadas de conservante bronopol. Essas amostras foram escolhidas aleatoriamente entre as amostras de rotina do LabUFMG. As 200 amostras foram separadas em 20 "pools".

Cada "pool" foi distribuído em 10 frascos e cada frasco foi colocado em uma rack, de forma a completar 10 racks contendo 20 amostras cada uma, sendo que amostras de número igual entre as racks eram amostras pertencentes ao mesmo "pool"(figura 3). Foram avaliados a contagem de células somáticas, e os teores de proteína, gordura, lactose, extrato seco desengordurado (ESD) e uréia.

#### 4.3.2. Avaliação da reprodutibilidade do método

A reprodutibilidade (R) é definida como o valor abaixo do qual a diferença absoluta entre os resultados de duas simples determinações, obtidos em materiais idênticos obtidos sob diferentes condições (diferentes operadores, aparelhos, laboratórios e/ou diferentes tempos) é esperada com uma probabilidade determinada (por exemplo, 95%) (IDF, 1999). No experimento, a precisão foi obtida através dos resultados dos ensaios com o mesmo método, análise por equipamento infravermelho, variando-se o período, sendo uma análise pela manhã e outra à noite, com respectivamente dois analistas diferentes.

A reprodutibilidade é expressa pelo desvio padrão obtida sob condições de reprodutibilidade associada aos resultados. A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade foi possível calcular a variância de reprodutibilidade ( $S_R^2$ ) associada aos resultados, e o limite de reprodutibilidade "R" conforme a equação 2 (Eurachem, 1998; INMETRO, 2002; Nascimento *et al.*, 2008).

$$R = 2,8 \sqrt{S_R^2} \quad (\text{equação 2})$$

A reprodutibilidade da análise do teor de uréia no leite pelo CombiScope FTIR foi analisada utilizando-se 200 amostras de leite cru. Durante 10 dias, foram feitos 20 "pools" de amostras de leite cru por dia, conservadas com bronopol, e cada amostra foi dividida em duas subamostras (2 racks com 20 amostras cada). A primeira rack foi analisada durante o período da manhã e a outra rack (réplica da anterior) no período da noite (figura 4).

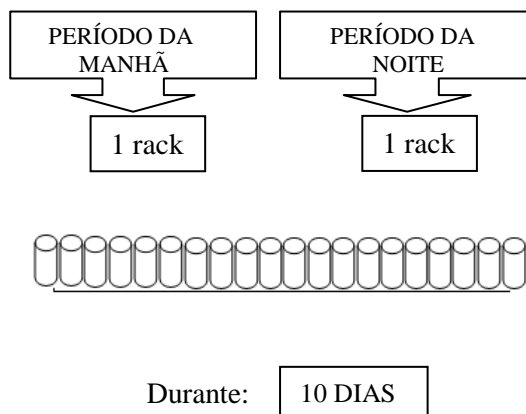


Figura 4- Esquema da reprodutibilidade do método infravermelho.

#### 4.3.3 Comparação do CombiScope FTIR com o ChemSpec 150 Analyzer

O teor de uréia no leite cru foi analisado em 554 amostras de rotina do LabUFMG, oriundas de amostras de leite de tanque, conservadas com bronopol. Os resultados gerados pelo CombiScope FTIR foram comparados com aqueles obtidos da análise das mesmas amostras no ChemSpec 150 Analyzer, da Bentley Instruments. A composição das amostras de leite também foram analisadas no CombiScope FTIR.

#### 4.3.4 Avaliação da detecção de fraude por adição de uréia ao leite e correlação com os teores de proteína antes e após a adição

A capacidade de detecção de diferentes quantidades de uréia adicionada ao leite cru foi avaliada no CombiScope FTIR em comparação com o método enzimático (ChemSpec 150) Foram feitos pools de amostras de leite cru de rotina do LabUFMG para formação de nove *lotes* contendo 19 amostras cada uma. A 20<sup>a</sup> amostra de cada *lote* era uma amostra controle, de composição conhecida para

confirmar a estabilidade analítica. Três *lotes* ficaram como grupo controle, isto é, sem a adição de uréia. Três outros *lotes* foram adicionados de 20mg/100g e outros três foram adicionados de 40mg/100g de uréia no leite. Para adição de uréia, utilizou-se uma solução concentrada de uréia formulada com 20g de uréia PA diluída em água para 50mL de solução, em um balão volumétrico. Esta solução foi adicionada às amostras de leite utilizando-se uma micropipeta 10-100 $\mu$ L (LabMate-HT).

#### **4.3.5 Teste da estabilidade da uréia no leite**

Para o teste da estabilidade da uréia no leite cinco amostras de leite cru, com três litros cada foram coletadas na Fazenda Experimental da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Igarapé, Minas Gerais. As amostras foram provenientes da ordenha de grupos de aproximadamente 10 vacas cada.

As cinco amostras de leite cru foram divididas em cinco grupos: A, B, C, D, E. Cada grupo foi subdividido para a estocagem em duas temperaturas: 4°C e 20°C. A leitura de componentes do leite, uréia, CCS, CBT e pH foi realizada nos dias: 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias nas 2 temperaturas.

#### **4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS**

Foram realizadas análises de composição do leite: proteína, gordura, lactose, extrato seco desengordurado (ESD), uréia e contagem de células somáticas (CCS) no equipamento CombiScope™ FTIR (Delta Instruments); uréia comparativa no equipamento ChemSpec® 150 Analyzer (Bentley Instruments); contagem bacteriana no equipamento Bactocount IBC 150®

(Bentley Instruments) e pH no pH metro de bancada digital modelo mPA-210 (TecnoPON).

Para as análises feitas pelo método instrumental em analisador eletrônico, baseado na espectroscopia no infravermelho, as amostras foram distribuídas em uma *rack* própria do aparelho, aquecidas a 40°C, durante exatos 20 minutos e homogeneizadas dez vezes por inversão, antes de serem colocadas no equipamento. Tal procedimento condiz com o estabelecido no manual de operações do equipamento.

#### **4.4.1 Quantificação de componentes e uréia do leite pelo método de espectroscopia no infravermelho**

Os componentes do leite (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) foram analisados por Espectrofotometria de Absorção no Infravermelho Médio (EIVM) segundo procedimentos preconizados pela FIL (IDF, 2000). O equipamento empregado nas análises foi um espectrômetro LactoScope™ FTIR, um citômetro de fluxo SomaScope™ FTIR. Cada lote foi constituído de 19 frascos, com amostras de leite cru, a serem analisadas, mais uma amostra controle com composição previamente conhecida. Cada frasco de plástico inerte não estéril (40 mL de capacidade) para armazenamento das amostras utilizou um comprimido com o conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol), para garantir a conservação da amostra de leite.

#### **4.4.2 Contagem de células somáticas**

A contagem de células somáticas (CCS) também foi realizada no citômetro do equipamento CombiScope FTIR, (Delta Instruments). Esse equipamento, além de

determinar os teores de gordura, proteína, lactose, ESD e uréia funciona com um contador eletrônico automático, que utiliza o método da citometria de fluxo (IDF, 1995a). A citometria de fluxo para a contagem de células somáticas utiliza coloração do material genético com DAPI (hidroclorato de 4', 6-Diamidina-2'-fenilindol).

#### **4.4.4 Contagem bacteriana por citometria de fluxo**

As amostras para contagem bacteriana foram analisadas em duplicata no equipamento Bactocount IBC 150<sup>®</sup> (Bentley Instruments) (Bentley Instruments, 2002). Este equipamento realiza a contagem individual de bactérias pelo método de citometria de fluxo. O equipamento foi calibrado de acordo com o método de contagem padrão em placa de referência, definido pela norma Internacional (IDF,1991), permitindo a conversão da contagem bacteriana total em contagem padrão, em atendimento à Instrução Normativa nº 51/2002 (Brasil, 2002).

No Bactocount IBC o leite amostrado é colocado em um carrossel aquecido a 50°C, para acelerar a reação enzimática e degradação de componentes interferentes. Um reagente de incubação (2 mL), contendo um tampão de clarificação, uma enzima proteolítica e um marcador fluorescente são então adicionados automaticamente com os objetivos de solubilizar glóbulos de gordura e proteína, desagregar as células somáticas, permeabilizar a bactéria e corar seu DNA. A mistura passa por duas hastas ultrassônicas para auxiliar na separação química das partículas interferentes. Depois do período de incubação, uma porção da mistura é transferida ao citômetro, onde as bactérias são alinhadas e expostas a um feixe de laser e o brometo de etídio ligado

ao material genético emite fluorescência. O sinal fluorescente é coletado pelas lentes, filtrado e detectado por um foto multiplicador. A intensidade e altura dos pulsos fluorescentes são gravadas e convertidas para contagens bacterianas (Bentley Instruments, 2002).

Antes de se passar a *rack* no equipamento a mesma sofre agitação garantindo que haverá homogeneidade na amostra a ser analisada.

#### **4.4.5 Quantificação de uréia por metodologia enzimática**

As amostras de leite cru que foram analisadas pelo equipamento CombiScope<sup>™</sup> FTIR foram analisadas consecutivamente pelo equipamento ChemSpec<sup>®</sup> 150 (metodologia enzimática) utilizando-se lotes contidos em *racks* com 19 amostras de leite cru e 1 amostra controle.

O ChemSpec 150 realiza a determinação dos níveis de uréia no leite (NUL), sendo capaz de analisar 150 amostras por hora e dispensa pré-aquecimento das amostras, podendo estas serem analisadas em temperatura ambiente (Bentley Instruments, 1999).

#### **4.4.6 Acidez do leite ou pH**

As amostras foram analisadas de acordo com os Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos contidos na Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

#### **4.4.7 Calibração dos equipamentos**

A calibração do instrumento refere-se ao ajuste do sinal instrumental de modo que, a cada nível do componente em quantificação, a média de resultados individuais dados pelo instrumento seja o mais próximo do valor verdadeiro da concentração do componente (IDF, 1991; Esteves, 2006).

A calibração do equipamento CombiScope™ FTIR (Delta Instruments) foi realizada por meio de 12 amostras padrão de leite cru com diferentes faixas de composição, gordura, proteína, lactose, ESD e uréia. A calibração de CCS foi feita utilizando-se três amostras padrão com CCS em diferentes níveis. A calibração foi feita utilizando-se o programa de calibração do próprio equipamento. As amostras padrão foram fornecidas pelo laboratório DQCI SERVICES (Dairy Quality Control Incorporated, Estados Unidos), credenciado pela Secretaria de Agricultura do Estado de Mineápolis dos Estados Unidos. Este laboratório é oficial e aprovado pela IDF (International Dairy Federation). As amostras padrão foram fornecidas juntamente com os laudos contendo os resultados das análises realizadas no laboratório de origem.

Para a calibração do equipamento ChemSpec (Bentley Instruments) foi utilizado o mesmo esquema anterior, mas calibrando-se apenas a faixa de composição da uréia.

A checagem da homogeneização do equipamento CombiScope™ FTIR foi realizada todos os dias, pela manhã, antes do início dos experimentos. O protocolo com todas as etapas do teste da homogeneização foi desenvolvido e fornecido pelos pesquisadores fornecedores de equipamentos da Delta Instruments, durante um treinamento realizado na sede da empresa, na Holanda. A cada semana foi realizado um “pool” a partir das amostras de rotina que chegam ao LabUFMG, com aproximadamente 3% de gordura e outro pool com cerca de 5% de gordura (Fonseca, comunicação pessoal). Foram preparadas duas soluções, a solução zero foi obtida por meio da dissolução de 20 litros de água deionizada, com 500 comprimidos de bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol). A solução de sacarose a 10% foi preparada com 9 litros da solução zero bronopol e a adição de 1000 gramas de sacarose (Synth) de qualidade analítica. Estas soluções foram estocadas em balões volumétricos a temperatura ambiente, sendo trocadas a cada mês. Foram utilizadas 30 caixas de leite UAT desnatado e 30 caixas de leite UAT integral. No início e no final do teste da homogeneização foi realizada a limpeza e o zero do equipamento, respectivamente, pela ativação da função do equipamento: clean e clean with zero, o qual zera, ou seja, retira da circulação do aparelho, resquícios de componentes do leite que poderiam interferir nos resultados obtidos (figura 5).

#### **4.4.8 Teste da homogeneização**

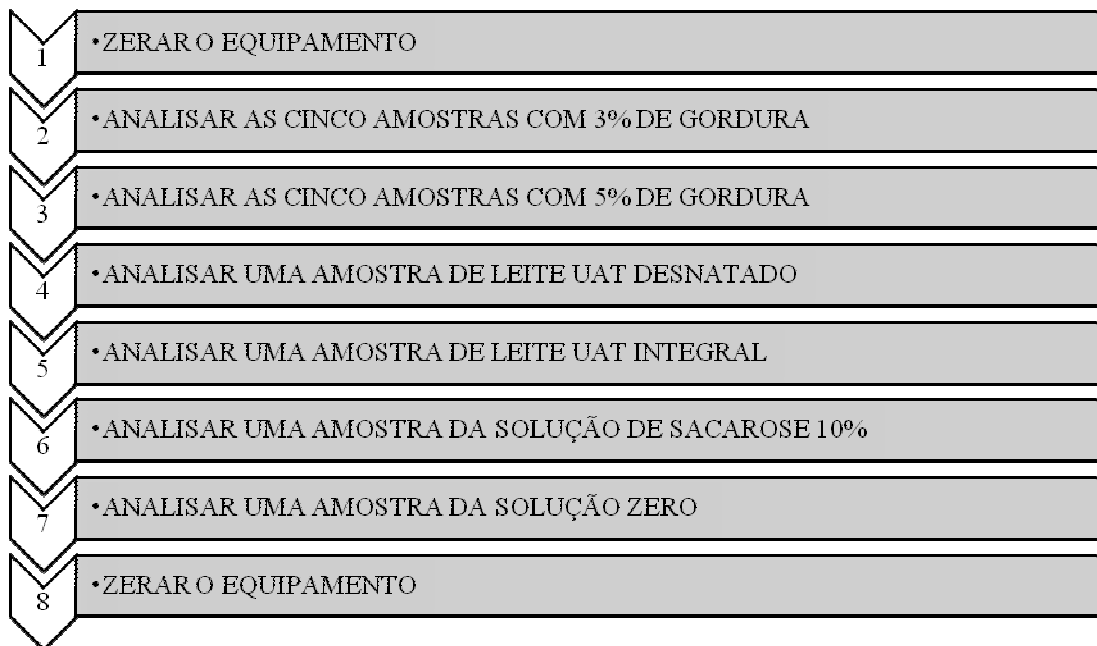


Figura 5- Fluxograma com a rotina diária de checagem da homogeneização da limpeza do equipamento, ou análises realizadas. Fonte: Delta Instruments, comunicação pessoal.

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

### 5.1 ANÁLISE DO SOFTWARE DO EQUIPAMENTO

A análise Fourier foi feita de acordo com a técnica do software: GRAMS Suite (Thermo Scientific)

Parâmetros do interferograma:

- A intensidade do comprimento de onda  $W$  na posição do interferômetro  $X$  é

$$y(x, w) = Y(w) [1 + \cos(2\pi wx)]$$

onde  $Y(w)$  é a intensidade espectral em  $w$ . A intensidade total na posição  $x$  é a integralização no espectro:

(Equação simples)

$$y(x) = \int_0^x Y(w) [1 + \cos(2\pi wx)] dw.$$

O primeiro termo é uma constante enquanto o segundo é a transformação Fourier do espectro:

(Equação para misturas complexas)

$$\int_0^x \cos(2\pi wx) dw = \int_0^x \frac{e^{2\pi i wx} + e^{-2\pi i wx}}{2} dw$$

$$= \frac{1}{2} \int_{-x}^x Y(w) e^{2\pi i wx} dw.$$

O interferograma foi testado visando à interação entre a substância a ser pesquisada e os outros componentes do leite. No próprio software, foi verificada a viabilidade da equação simples ou da equação para misturas complexas.

## 5.2 ESTATÍSTICA DOS EXPERIMENTOS

Os dados obtidos foram tabulados para análise estatística descritiva. Foram utilizados para a repetibilidade, o delineamento inteiramente casualizado; para a reprodutibilidade o delineamento em blocos ao acaso, sendo a amostra o bloco e o período a fonte de variação; para a comparação da análise de uréia por metodologia enzimática e por metodologia de infravermelho utilizou-se delineamento em blocos ao acaso, sendo a amostra o bloco e o tipo de equipamento a fonte de variação; para a avaliação da detecção de fraude por adição de uréia ao leite utilizou-se fatorial duplo no delineamento em blocos casualizados, sendo o bloco a amostra; para a estabilidade da uréia o delineamento inteiramente casualizado em parcelas (temperaturas) subdivididas em subparcelas (dias).

Para comparação de médias, adotou-se o teste de Tukey em avaliações com coeficiente de variação ( $CV \leq 15\%$ ) e o teste t de Student em avaliações com ( $15\% < CV < 30\%$ ). A normalidade das respostas obtidas também foi verificada (Sampaio, 2007). O programa estatístico usado foi o Minitab 15.0 para Windows (Minitab Inc, Filadélfia, EUA).

Os resultados originais obtidos de CCS (contagem de células somáticas) e de CBT (unidades formadoras de colônias/mL) por equipamento eletrônico ou por contagem em placas foram transformados para logaritmo na base 10 ( $\log_{10}$ ) para obtenção de distribuição normal dos dados.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para a análise do teor de uréia realizada pelo equipamento CombiScope™

FTIR seguiram as normas estabelecidas pelo manual do mesmo (Delta Instruments, 2007 e 2009). Em testes anteriores ao experimento em questão, realizados neste equipamento observou-se perda na precisão dos resultados, se os procedimentos recomendados, não forem corretamente seguidos, principalmente a temperatura de pré-aquecimento. A *rack* contendo as amostras e a *check* (controle) foram colocadas por exatamente 20 minutos no banho-maria, a uma temperatura entre  $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Outras condições de checagem também foram verificadas, como o volume de bombeamento, o *carry over* (que reflete a eficiência de limpeza entre as análises das amostras), a estabilidade do zero e a calibração ajustando o Bias/ Intercept (faixa limitada para calibração).

### 6.1 REPETIBILIDADE

A repetibilidade da análise de uréia no leite (NUL) pelo FTIR foi confirmada pela análise estatística dos dados, que apresentaram média de 10,22 mg/dL, desvio padrão de 0,67 mg/dL, coeficiente de variação de 6,58% e limite de repetibilidade de 1,87. O que resulta em uma boa precisão na repetibilidade do equipamento CombiScope FTIR para a medição de nitrogênio uréico no leite (NUL), assim como para os outros componentes.

A tabela 4 apresenta as médias, os desvios padrão (DP), os coeficientes de variação (CV), os limites de repetibilidade ( $r$ ) e os mínimos e máximos para a uréia e os outros componentes do leite analisados. A comparação das médias da uréia e dos outros componentes do leite cru, considerando 20 amostras iguais de cada *rack*, num total de 200 amostras pelo teste de Tukey se encontra na tabela 5.

Tabela 4- Estatística descritiva da repetibilidade na análise da composição do leite cru (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e uréia) no equipamento FTIR.

Componente	Média	Desvio padrão (DP)	Coefficiente de variação (CV) %	Limite de repetibilidade (r)	Min.	Máx.
CCS (log -cels/ $\mu$ L)	2,68	0,04	1,59	0,12	2,31	2,92
Gordura (g/100g)	3,54	0,01	0,52	0,05	3,25	3,91
Proteína (g/100g)	3,33	0,01	0,22	0,02	3,07	3,42
Lactose (g/100g)	4,63	0,01	0,15	0,02	4,55	4,71
Extrato seco desengordurado (g/100g)	8,90	0,01	0,13	0,03	8,61	9,04
Uréia (mg/dL)	10,22	0,67	6,58	1,87	8	12

Tabela 5- Comparação das médias de cada componente do leite cru considerando 20 amostras iguais de cada rack (total de 200 amostras).

MÉDIA DOS COMPONENTES	RACKS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CCS (log -cels/ $\mu$ L)	2,64 <sup>a</sup>	2,69 <sup>a</sup>	2,66 <sup>a</sup>	2,66 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,64 <sup>a</sup>	2,68 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,71 <sup>a</sup>
Gordura (g/100g)	3,56 <sup>a</sup>	3,56 <sup>a</sup>	3,54 <sup>a</sup>	3,55 <sup>a</sup>	3,53 <sup>a</sup>	3,53 <sup>a</sup>	3,54 <sup>a</sup>	3,52 <sup>a</sup>	3,52 <sup>a</sup>	3,53 <sup>a</sup>
Proteína (g/100g)	3,33 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>	3,32 <sup>a</sup>	3,32 <sup>a</sup>	3,32 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>
Lactose (g/100g)	4,62 <sup>a</sup>	4,62 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>	4,62 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>	4,63 <sup>a</sup>
Extrato seco Desengordurado (g/100g)	8,90 <sup>a</sup>	8,90 <sup>a</sup>	8,90 <sup>a</sup>	8,89 <sup>a</sup>	8,90 <sup>a</sup>	8,90 <sup>a</sup>	8,90 <sup>a</sup>	8,91 <sup>a</sup>	8,91 <sup>a</sup>	8,91 <sup>a</sup>
Uréia (mg/dL)	10,40 <sup>a</sup>	10,40 <sup>a</sup>	10,25 <sup>a</sup>	10,60 <sup>a</sup>	10,35 <sup>a</sup>	10,25 <sup>a</sup>	10,10 <sup>a</sup>	10,15 <sup>a</sup>	9,90 <sup>a</sup>	9,85 <sup>a</sup>
N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Médias seguidas de letras iguais não indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Tukey.

No estudo de Godden *et al.*(2000), 55 amostras idênticas de leite, obtidos após o processo denominado ultrapasteurização (UHT), analisadas ao longo de um período de 14 dias, a concentração média e o desvio padrão de uréia no leite (NUL) foram de, respectivamente, 6,52 e 0,23 mmol/L. O coeficiente de variação foi de 3,44% e o limite de repetibilidade de 2,18. No segundo estudo de 24 conjuntos de amostras de réplicas de leite analisadas em um único dia, a média, desvio padrão, o

mínimo e as concentrações máximas de uréia no leite (NUL) medido pelo analisador de leite Fossomatic 4000 Milk Analyzer (Foss North America, Brampton, Ontário) foram, respectivamente, 5,52; 0,78; 4,57 e 7,96 mmol/L.

Já os resultados das concentrações de NUL do ensaio de repetibilidade de 200 amostras de leite de vacas individuais, do trabalho de Arunvipas *et al.*, (2003) apresentaram médias significativamente diferentes, mas

desvios-padrão não significativamente diferentes (médias de 15,48 mg/dL e 15,18 mg/dL e desvios padrão de 3,08 e 3,09, respectivamente para o método infravermelho e o enzimático).

## 6.2 REPRODUTIBILIDADE DO EQUIPAMENTO

O limite de reprodutibilidade (R) para a determinação da uréia foi de 7,18 mg/dL, calculado num nível de confiança de 95% segundo IDF (1999). A média foi de 9,64 mg/dL, o desvio padrão de 0,56 mg/dL e o

coeficiente de variação de 5,86%. Estes resultados confirmam boa precisão na reprodutibilidade do equipamento CombiScope FTIR para a medição de uréia, assim como para os outros componentes (tabela 7).

Os dados da tabela 6 apresentam as médias dos componentes do leite e da uréia, indicando que não houve diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo Teste t de Student, com  $N = 200$  amostras de leite cru, divididas nos períodos da manhã e da tarde.

Tabela 6- Reprodutibilidade com as médias dos componentes do leite cru e da uréia pelo teste t de Student com  $N=200$  amostras.

Componentes	CCS (log -cels/ $\mu$ L)	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lactose (g/100g)	Extrato seco desengordurado (g/100g)	Uréia (mg/dL)
<b>Período</b>						
Manhã	2,58 □	3,57 □	3,34 □	4,69 □	9,01 □	9,83 □
Noite	2,56 □	3,52 □	3,35 □	4,70 □	9,02 □	9,67 □

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna indicam resultados iguais ( $p > 0,05$ ) pelo Teste de Tukey.

Tabela 7- Estatística descritiva da reprodutibilidade na análise da composição do leite cru (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e uréia) no equipamento FTIR.

Componente	Média	Desvio padrão (DP)	Coefficiente de variação (CV) %	Limite de reprodutibilidade (R)
CCS (log -cels/ $\mu$ L)	2,57	0,02	0,87	0,06
Gordura (g/100g)	3,56	0,03	1,09	0,87
Proteína (g/100g)	3,34	0,01	0,24	0,28
Lactose (g/100g)	4,68	0,01	0,13	0,63
Extrato seco desengordurado (g/100g)	9,00	0,01	0,09	0,73
Uréia (mg/dL)	9,64	0,56	5,86	7,18

## 6.3 COMPARAÇÃO DA ANÁLISE DE URÉIA POR METODOLOGIA ENZIMÁTICA E POR METODOLOGIA DE INFRAVERMELHO

Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos equipamentos ChemSpec 150 (metodologia enzimática) e CombiScope (FTIR) ( $p > 0,05$ ). O CombiScope apresentou média de 9,84 mg/dL de uréia enquanto o ChemSpec apresentou média de 9,47 mg/dL de uréia. O desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) foram, respectivamente, 3,13mg/dL e 31,81% para o FTIR e 4,11 mg/dL e 43,37% para o ChemSpec (tabela 8). O CV alto não se relaciona aos equipamentos e sim à diversidade de amostras e teores de uréia, que foram obtidas de regiões variadas de Minas Gerais. A diferença significativa entre os dois métodos foi de 0,44 mg/dL. O

equipamento de infravermelho demonstrou uma boa confiabilidade, quando comparado com a metodologia enzimática, possuindo um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,89, tendo o valor  $p < 0,0001$ , o que é considerado extremamente significativo. A figura 6 apresenta os resultados em Scatterplot do nitrogênio uréico no leite pelo método enzimático e por FTIR. As amostras também foram analisadas para os outros componentes do leite, no equipamento infravermelho, onde se verificou resultados dentro dos padrões estabelecidos para amostras de boa qualidade.

Tabela 8- Comparação das médias, desvios Padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) dos teores de uréia (mg/dL) analisados no leite cru pelos equipamentos FTIR e ChemSpec.

Equipamentos	Média	Desvio Padrão (DP)	Coefficiente de variação (CV)%	N
<b>FTIR</b>	9,84 <sup>a</sup>	3,13	31,81	554
<b>ChemSpec</b>	9,47 <sup>a</sup>	4,11	43,37	554

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo Teste de t de Student.

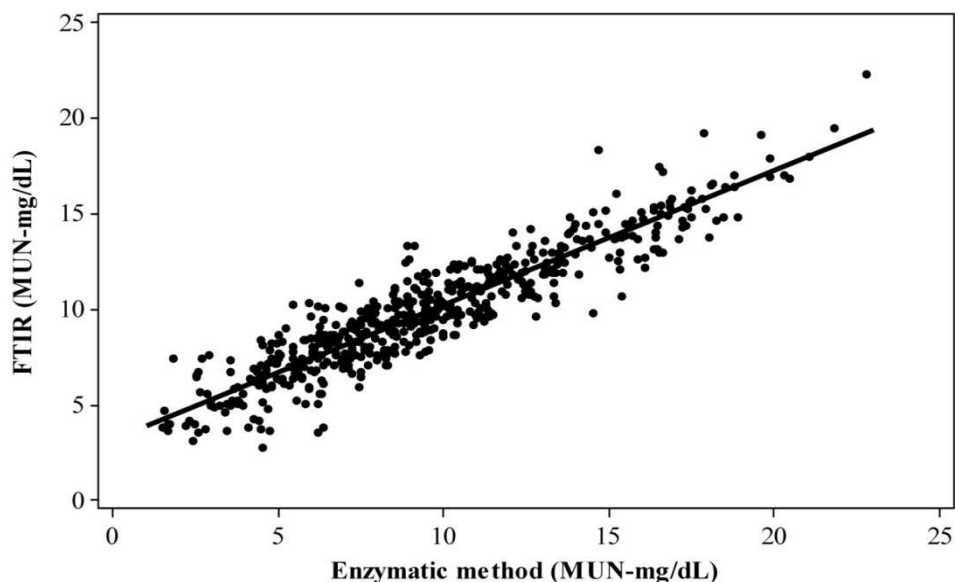


Figura 6- Scatterplot dos resultados (mg/dL) do nitrogênio uréico no leite (MUN) por método enzimático (ChemSpec) e por método FTIR (CombiScope FTIR).

De acordo com Godden *et al.* (2000), as médias e distribuições das concentrações de uréia no leite para as 89 amostras analisadas de leite de rebanho foram semelhantes entre o Fossomatic 4000 Milk Analyzer (média= 4,11 mmol/L, mínimo= 1,61; máximo= 6,79) e o teste Eurochem (média = 4,24 mmol/L, mínimo= 2,00; máximo = 7,92). A diferença média entre os dois testes foi de 0,13 mmol/L de uréia no leite (desvio padrão= 0,55 mmol/L). Houve concordância geral entre os resultados do Fossomatic 4000 Milk Analyzer, um método de IR, e o teste Eurochem (Foss North America, Brampton, Ontário), um método de referência aceito. Os dois testes demonstraram um mesmo nível de alta precisão (CVFoss = 4,85%, CVEurochem = 2,65%).

Também em 2000, P. Sauve avaliou a confiabilidade de 15 de analisadores de NUL por infravermelho, na América do Norte em relação ao método enzimático. Doze amostras foram divididas em amostras em duplicata e uma amostra de cada duplicata foi analisada por cada método. Em seu estudo, apenas 2 de 15 de analisadores de infravermelho apresentaram desvios padrão das diferenças inferiores a 1,5 mg/dL, e grandes diferenças regionais no controle de qualidade dos testes de NUL foram encontrados. Nove dos quinze laboratórios de infravermelho tinham diferenças médias superiores a 0, mostrando uma análise tendenciosa no resultado do método de infravermelho. No entanto, não havia praticamente nenhuma tendenciosidade no resultado do método de infravermelho comparado com o método enzimático (Arunvipas *et al.*, 2003).

Arunvipas *et al.* (2003) avaliaram a confiabilidade (precisão e exatidão) e repetibilidade do método de infravermelho (Fossomatic 4000) na determinação de nitrogênio uréico no leite. Um total de 161 amostras compostas por leite de vacas individuais foram selecionadas. O método

de referência utilizado para a avaliação da confiabilidade foi a determinação enzimática do nitrogênio uréico do leite. A confiabilidade e repetibilidade, medidas pelo coeficiente de correlação de concordância, foram de 0,97 e 0,99, respectivamente. Os autores utilizaram o método de Bland e Altman, sendo que, a diferença média entre os dois testes foi de 0,051 mg/dL (desvio padrão = 1,18). Os limites de 95% de concordância foram 2,29 e 2,19 mg/dL, respectivamente, indicando que 95% dos pares de resultados diferem por menos de, aproximadamente,  $\pm 2,2$  mg/dL.

Broutin (2000) avaliou o método ChemSpec 150 (Bentley Instruments Inc., USA) em comparação com a norma francesa V04 AFNOR NF-217 para a determinação de rotina de uréia no leite cru. A repetibilidade expressa como o desvio-padrão da repetibilidade (Sr) foi de, respectivamente, 0,46 mg/dl e 0,60 mg/dl para as amostras de leite individual e de conjunto. A precisão expressa como desvio padrão de Precisão (Sy, x) foi de, respectivamente, 2,11 mg/dl e 1,59 mg/dl para as amostras de leite individual e de conjunto. Isso representou para o autor uma melhoria na precisão de, respectivamente 58% e 43% para o filtro e analisadores de infravermelho FTIR. Ele chegou à conclusão de que o método enzimático ChemSpec, com uma velocidade analítica de 150 amostras por hora pode ser usado para obter resultados acurados de uréia em análises de rotina.

A metodologia de infravermelho abrange, além da análise do teor de uréia no leite, a análise de vários componentes do leite, agilizando a obtenção de resultados múltiplos e confiáveis. De acordo com Dutra *et al.* (1995), a espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma técnica analítica qualitativa e quantitativa amplamente utilizada em laboratórios industriais de controle de qualidade e de

pesquisa e desenvolvimento. Quando utilizada na determinação estrutural de substâncias e na quantificação de um ou vários constituintes em misturas complexas, fornece resultados rápidos e precisos. Além disso, a facilidade no preparo da amostra, a possibilidade de análise de amostras sólidas, líquidas e gasosas, translúcidas ou opacas, a versatilidade do equipamento de infravermelho e o baixo custo relativo são alguns dos fatores que contribuem ao sucesso do uso desta técnica.

#### 6.4 AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE ADIÇÃO DE URÉIA AO LEITE E CORRELAÇÃO COM OS TEORES DE PROTEÍNA ANTES E APÓS A ADIÇÃO.

Os resultados da mensuração de uréia pelos equipamentos utilizados foram expressos como nitrogênio uréico no leite (NUL) e não como uréia total, por isso após a adição dos níveis de uréia de 20 e 40mg/100g, os resultados finais esperados seriam de 46,7% do valor adicionado.

Os resultados das 180 amostras de leite cru de rotina do LabUFMG, adicionadas com os seguintes níveis de uréia: 0, 20 e 40 mg/100g indicaram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) pelo Teste de t de Student, com média e desvio padrão de, respectivamente, 19,28 mg/dL e 9,24 mg/dL; e 14,89 mg/dL e 5,17 mg/dL de uréia, para o ChemSpec 150 Analyser e o CombiScope FTIR (tabela 9).

Tabela 9- Comparação das médias e desvios Padrão (DP) na análise de uréia (NUL), após a adição de uréia no leite pelos equipamentos ChemSpec e FTIR.

Equipamento	N	Média	Desvio Padrão (DP)
ChemSpec	180	19,28 <sup>b</sup>	9,24
FTIR	180	14,89 <sup>a</sup>	5,17

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) pelo Teste de t de Student.

A detecção de uréia nos níveis adicionados de 20 e 40mg/dL em leite cru pelo equipamento FTIR não foi proporcional ao aumento da concentração de uréia, com diferença significativa e baixa precisão nos resultados das amostras com adição de 40mg/dL de uréia no leite (figura 7). O equipamento CombiScope FTIR não detectou de forma precisa leite adulterado

com os níveis de uréia adicionados. Entretanto, a uréia adicionada, com os níveis de 0, 20 e 40mg/dL, não afetaram a leitura dos teores de proteína na análise realizada no equipamento FTIR.

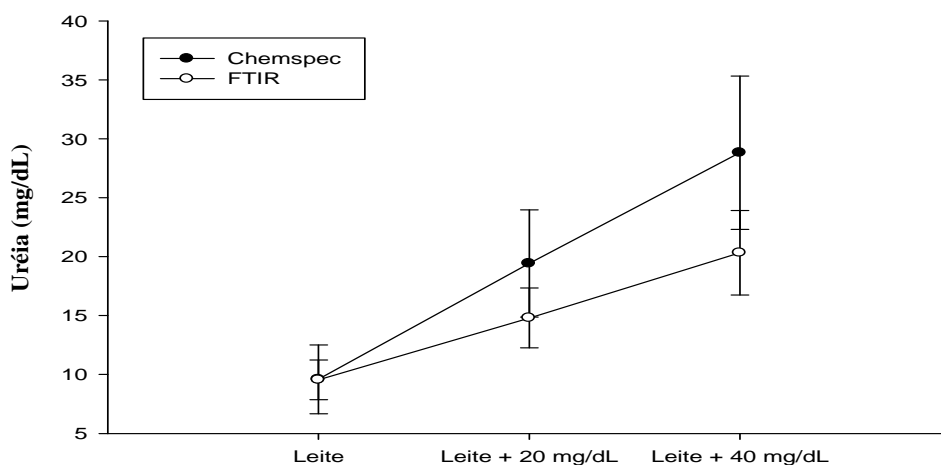


Figura 7- Comparação dos resultados de análise de leite adicionado por níveis de uréia (NUL): 0; 20 e 40mg/dL (n=60), pelos equipamentos ChemSpec e FTIR.

No trabalho de Hering *et al.* (2008), os autores utilizaram dez amostras de leite cru de fazendas das raças Holandesa e Tcheca Pied, na análise em laboratórios na República Tcheca, utilizando quatro métodos analíticos, entre eles o método de infravermelho por FTIR. Essas amostras foram adicionadas com uréia nas proporções de 10, 20 e 30 mg/100 ml. A diferença de recuperação foi calculada como a diferença nos valores medidos antes e depois das adições (100% foi o valor da adição pesada). O método FT-MIR revelou surpreendentemente boa acurácia na determinação da fraude de uréia (de 69,5 para 95,0%) e confiabilidade dos resultados em comparação com outros métodos (correlações de 0,981-0,994;  $P < 0,001$ ), assim como em comparação com os métodos de infravermelho médio antigos, com base em tecnologia de filtros ópticos. O grupo de trabalho do IDF (International Dairy Federation) (Lefier, 1999) sugeriu a escolha de um método enzimático específico como método de referência na determinação de NUL, especialmente para

equipamentos com técnica de calibração indireta.

## 6.5 TESTE DA ESTABILIDADE DA URÉIA NO LEITE

A estabilidade da uréia nas amostras de leite cru armazenadas a 4°C e a 20±2°C, durante os dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 não variou significativamente ( $p > 0,05$ ) (tabela 10). Foi realizada a análise de regressão das médias de uréia nas temperaturas de 4°C e 20± 2°C estimadas nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 (figura 8). O teor de uréia no leite foi constante à temperatura de armazenamento de 4°C durante os 15 dias de estocagem, contrastando com alguns trabalhos que apontam o aumento da uréia em leites armazenados por tempo de estocagem superiores a 7 dias (Carlsson e Bergstrom, 1994; Godden *et al.*, 2000; Miettinen e Juvonen, 1990; Oltner e Sjaunja, 1982). Porém, a partir do terceiro dia, no leite armazenado à temperatura de 20±2°C houve um aumento nos teores de uréia, que podem estar relacionados a uma possível degradação bacteriana da proteína.

Tabela 10- Comparação das médias dos teores de uréia (mg/dL) de amostras de leite cru, armazenadas a 4°C e 20°C nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15.

Dia	0	1	3	5	7	10	15
Temp. °C							
4	10,00 <sup>aA</sup>	9,80 <sup>aA</sup>	10,60 <sup>aA</sup>	10,40 <sup>aA</sup>	10,40 <sup>aA</sup>	10,60 <sup>aA</sup>	10,40 <sup>aA</sup>
20 ± 2	9,60 <sup>aA</sup>	9,60 <sup>aA</sup>	11,40 <sup>aB</sup>	10,60 <sup>aAB</sup>	10,80 <sup>aB</sup>	11,60 <sup>aB</sup>	11,60 <sup>aB</sup>

Médias seguidas por letras diferentes (minúsculas) nas colunas (temperaturas) e por letras maiúsculas nas linhas (dias) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

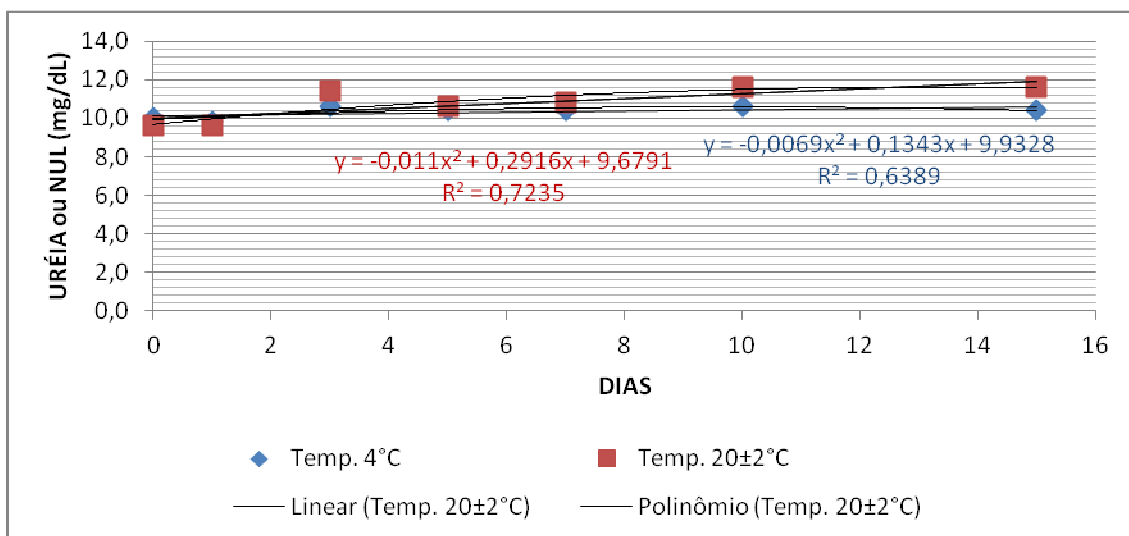


Figura 8- Regressão das médias de NUL de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2 °C durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias.

No estudo de Godden *et al.*(2000), as amostras foram armazenadas a temperaturas refrigeradas, congeladas ou à temperatura ambiente. Foi realizado um estudo com 23 amostras armazenadas por 2, 3, 4 ou 7 dias e outro com 24 amostras de leite de vacas da raça Holandesa armazenadas durante 1, 2, 3 ou 4 dias e que foram submetidas à análise com o Fossomatic 4000 Milk Analyzer. Os resultados do primeiro estudo das concentrações de uréia do leite mantiveram-se inalteradas em amostras que foram conservadas sob refrigeração por até 4 dias ( $P > 0,05$ ) e nas congeladas por até 3 dias ( $P > 0,05$ ), mas foram elevadas em amostras sob refrigeração por 7 dias ( $P = 0,0001$ ) e em amostras que foram

congeladas por 4 ou 7 dias ( $P < 0,05$ ). As concentrações de uréia no leite foram iguais entre os pares de amostras refrigeradas e congeladas que foram analisados nos dias 2, 3, 4 ou 7 após a estocagem ( $P > 0,05$ ). No segundo estudo, as médias, desvios-padrão e intervalos de concentração de NUL para as 24 amostras armazenadas sob refrigeração e em temperatura ambiente foram, respectivamente, 5,40; 0,77; 4,04-7,75 mmol/L e 5,43; 0,79; 3,93-7,93 mmol/L. As concentrações de uréia no leite foram iguais nas amostras armazenadas por refrigeração em comparação com as amostras armazenadas em temperatura ambiente por um período de armazenamento de até 4 dias ( $P > 0,05$ ).

Oltner e Sjaunja (1982), Miettinen e Juvonen (1990) e Carlsson e Bergstrom (1994), constataram que as concentrações de uréia no leite não mudaram por até 7 dias, quando refrigeradas à 4°C. Já Eicher *et al.* (1999) observaram maiores concentrações de uréia após uma semana de refrigeração (8,1% de variação), em amostras analisadas por infravermelho (Meyer, 2003).

### **6.5.1 Avaliação na contagem das células somáticas e nos teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado em função do tempo e temperatura de estocagem**

A estabilidade dos outros componentes do leite cru (gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado (ESD)) em amostras armazenadas nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15, às temperaturas de 4°C e 20°C, resultaram em médias que não tiveram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Tukey (tabelas 11, 12, 13, 14 e 15). Porém a estabilidade da contagem de células somáticas (CCS) nas amostras de leite cru armazenadas nas duas temperaturas, durante 10 e 15 dias resultaram em médias que tiveram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey (tabela 12). Foram realizadas as análises de regressão das médias de uréia nas temperaturas de 4°C e 20±2°C estimadas nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15, de acordo com as figuras (9, 10, 11, 12 e 13).

Os teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado mantiveram-se estáveis após 15 dias de estocagem, independentemente da temperatura de armazenamento, o que pode estar relacionado ao bom desempenho do

conservante utilizado (bronopol) e boa qualidade da amostra.

Houve redução da CCS do leite armazenado à temperatura ambiente. Mesmo com a utilização de conservante nas amostras (bronopol), sem as condições ideais de refrigeração não é possível obter uma boa acurácia nas análises de CCS.

Cassoli *et al.* (2010), observaram que os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e a CCS foram semelhantes, até sete dias após a coleta, quando as amostras foram conservadas com bronopol, independentemente da temperatura de armazenamento (7°C e temperatura ambiente a 24°C). Meyer (2003), utilizando temperaturas de armazenamento similares, observou resultados semelhantes. Amostras destinadas a análises de composição e CCS conservadas com bronopol e mantidas sob refrigeração podem ser analisadas em até sete dias, assim como amostras destinadas a análise de contagem bacteriana total conservadas com azidiol e refrigeradas sob temperatura de referência.

No trabalho de Monardes *et al.*, (1996), os resultados obtidos não demonstraram interferência do tempo de armazenamento sobre a CCS em 3 ou 7 dias após a coleta. A deterioração da contagem de células somáticas com o tempo é esperada em condições de falta de resfriamento das amostras. De acordo com Chavez *et al.* (1991), não foram observadas variações na CCS das amostras refrigeradas, mas houve variação nas amostras armazenadas à temperatura ambiente.

Tabela 11- Comparação das médias das contagens de células somáticas CCS (log cels/ $\mu$ L) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias

Dia	0	1	3	5	7	10	15
<b>Temp. °C</b>							
<b>4</b>	1,79 <sup>aA</sup>	1,81 <sup>aA</sup>	1,75 <sup>aA</sup>	1,84 <sup>aA</sup>	1,85 <sup>aA</sup>	1,74 <sup>bA</sup>	1,84 <sup>bA</sup>
<b>20 ± 2</b>	1,79 <sup>aD</sup>	1,79 <sup>aD</sup>	1,75 <sup>aD</sup>	1,64 <sup>aCD</sup>	1,43 <sup>aC</sup>	1,03 <sup>aB</sup>	0,67 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras diferentes (minúsculas) nas colunas (temperaturas) e por letras maiúsculas nas linhas (dias) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

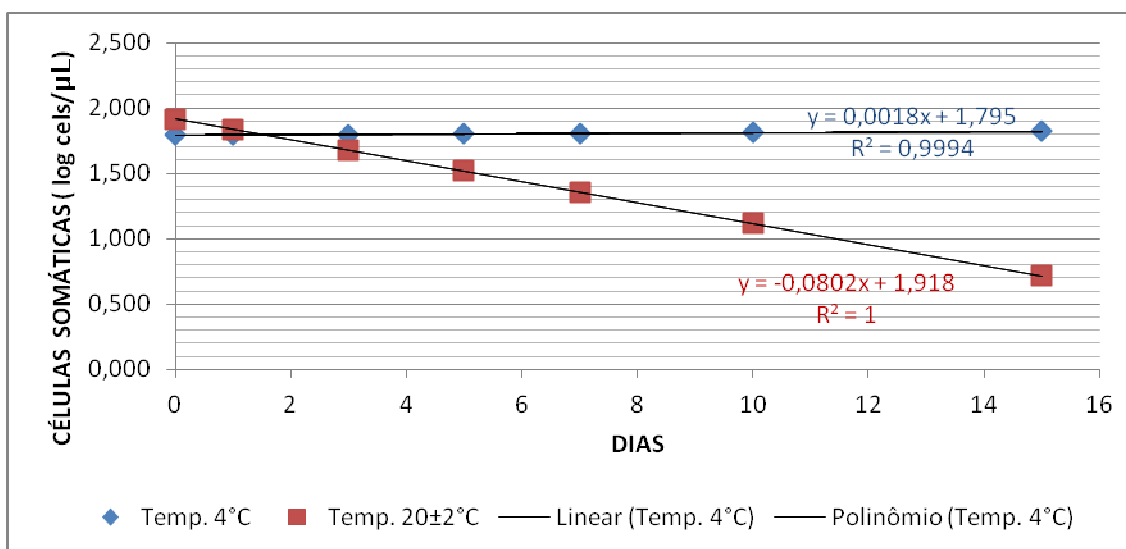


Figura 9- Regressão das médias de contagem de células somáticas (log -cels/ $\mu$ L) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2°C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias.

Tabela 12- Comparação das médias dos teores de gordura (g/100g) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias

Dia	0	1	3	5	7	10	15
<b>Temp. °C</b>							
<b>4</b>	3,15 <sup>aA</sup>	3,16 <sup>aA</sup>	3,16 <sup>aA</sup>	3,16 <sup>aA</sup>	3,17 <sup>aA</sup>	3,19 <sup>aA</sup>	3,18 <sup>aA</sup>
<b>20 ± 2</b>	3,17 <sup>aAB</sup>	3,15 <sup>aA</sup>	3,18 <sup>aAB</sup>	3,19 <sup>aAB</sup>	3,20 <sup>aAB</sup>	3,21 <sup>aB</sup>	3,20 <sup>aAB</sup>

Médias seguidas por letras diferentes (minúsculas) nas colunas (temperaturas) e por letras maiúsculas nas linhas (dias) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

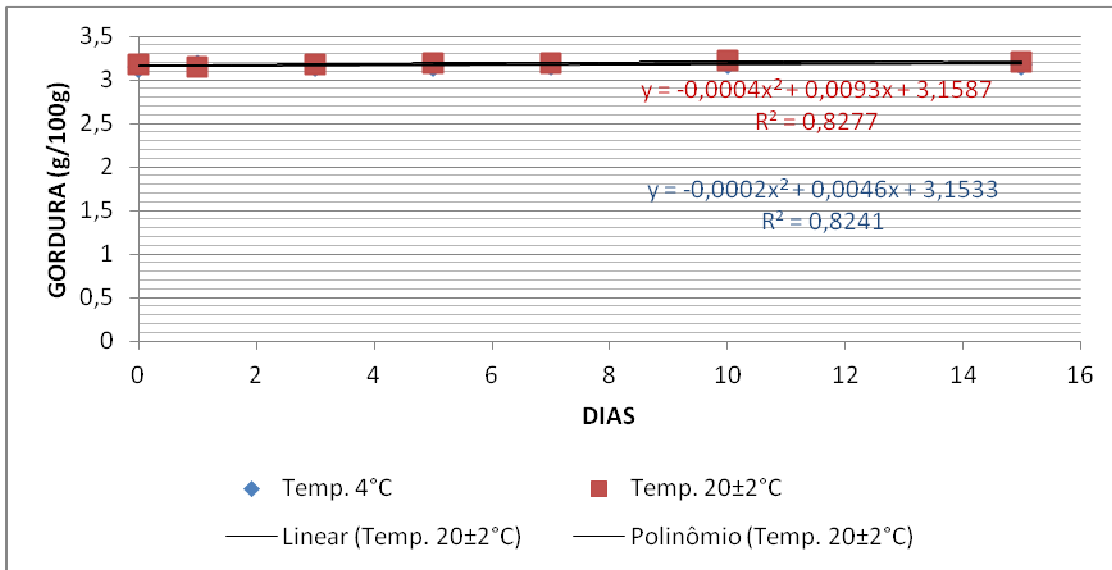


Figura 10- Regressão das médias de gordura (g/100g) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2 °C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias.

Tabela 13- Comparação das médias dos teores de proteína (g/100g) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias

Dia	0	1	3	5	7	10	15
<b>Temp. °C</b>							
<b>4</b>	3,38 <sup>aA</sup>	3,38 <sup>aA</sup>	3,38 <sup>aAB</sup>	3,38 <sup>aAB</sup>	3,38 <sup>aA</sup>	3,39 <sup>aB</sup>	3,38 <sup>aA</sup>
<b>20 ± 2</b>	3,38 <sup>aA</sup>	3,37 <sup>aA</sup>	3,38 <sup>aA</sup>	3,38 <sup>aA</sup>	3,37 <sup>aA</sup>	3,38 <sup>aA</sup>	3,37 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras diferentes (minúsculas) nas colunas (temperaturas) e por letras maiúsculas nas linhas (dias) diferem significativamente (p < 0,05) pelo teste de Tukey.

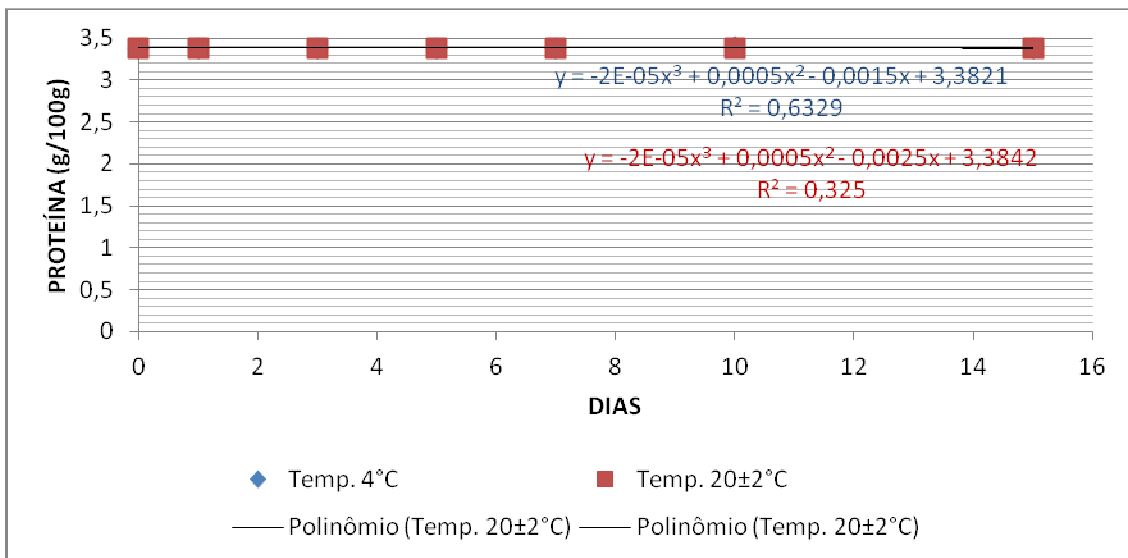


Figura 11- Regressão das médias de proteína (g/100g) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2 °C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias.

Tabela 14- Comparação das médias dos teores de lactose (g/100g) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias

Dia	0	1	3	5	7	10	15
<b>Temp. °C</b>							
<b>4</b>	4,46 <sup>ab</sup>	4,46 <sup>ab</sup>	4,46 <sup>ab</sup>	4,45 <sup>ab</sup>	4,46 <sup>ab</sup>	4,45 <sup>ab</sup>	4,44 <sup>aA</sup>
<b>20 ± 2</b>	4,46 <sup>ab</sup>	4,46 <sup>aAB</sup>	4,46 <sup>aAB</sup>	4,45 <sup>aAB</sup>	4,46 <sup>aAB</sup>	4,46 <sup>ab</sup>	4,44 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras diferentes (minúsculas) nas colunas (temperaturas) e por letras maiúsculas nas linhas (dias) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

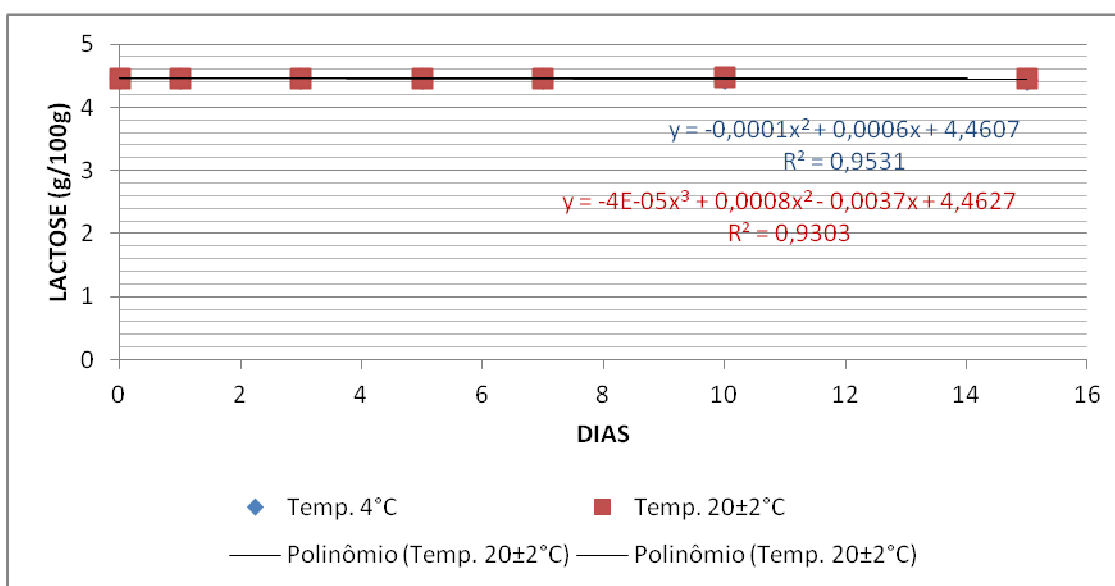


Figura 12- Regressão das médias de lactose (g/100g) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2 °C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias.

Tabela 15- Comparação das médias dos teores de extrato seco desengordurado (ESD) (g/100g) de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias

Dia	0	1	3	5	7	10	15
<b>Temp. °C</b>							
<b>4</b>	8,82 <sup>aA</sup>	8,82 <sup>aA</sup>	8,81 <sup>aA</sup>	8,81 <sup>aA</sup>	8,81 <sup>aA</sup>	8,81 <sup>aA</sup>	8,81 <sup>aA</sup>
<b>20 ± 2</b>	8,82 <sup>ab</sup>	8,82 <sup>ab</sup>	8,81 <sup>aAB</sup>	8,81 <sup>aA</sup>	8,81 <sup>aA</sup>	8,82 <sup>aAB</sup>	8,81 <sup>aAB</sup>

Médias seguidas por letras diferentes (minúsculas) nas colunas (temperaturas) e por letras maiúsculas nas linhas (dias) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

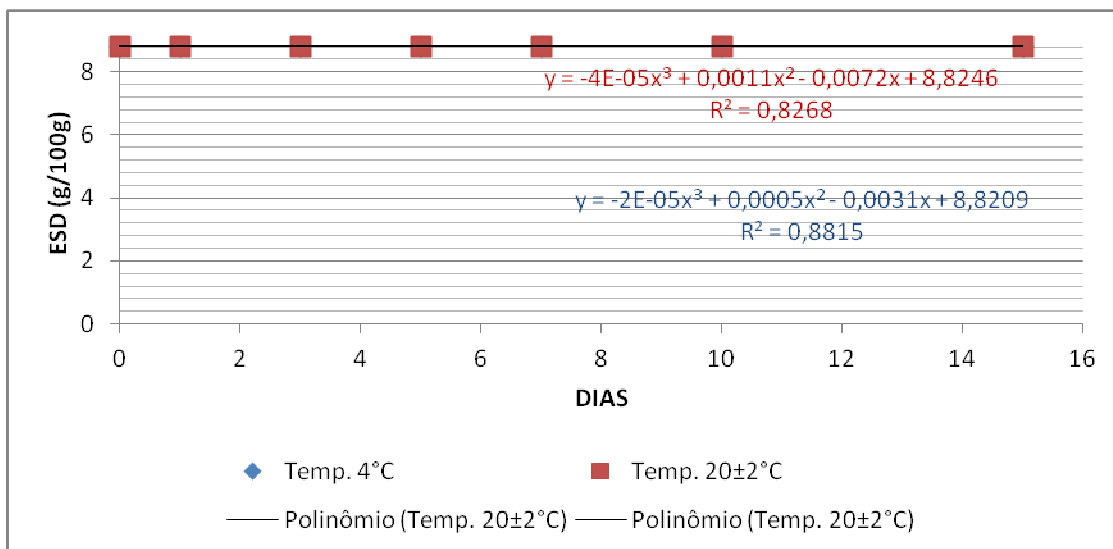


Figura 13- Regressão das médias dos teores de extrato seco desengordurado (ESD) (g/100g) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2°C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias.

### 6.6 ESTABILIDADE DO LEITE NA ANÁLISE DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH)

O pH das amostras de leite cru armazenado as temperaturas de 4°C e 20°C, durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias resultaram em médias que tiveram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), a partir do terceiro dia de armazenamento (tabela 16). Foi realizada a análise de regressão das médias dos resultados das análises de pH nas temperaturas de 4°C e 20± 2 °C estimadas nos dias 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 (figura 14).

Houve diminuição progressiva nos valores do pH nas amostras de leite armazenadas por maior tempo à temperatura de 20±2°C, provavelmente devido ao aumento na contagem bacteriana total. Os mesmos resultados foram encontrados no trabalho de Araujo (2009), com a idade da amostra influenciando os resultados de pH apenas quando as amostras foram submetidas à temperatura ambiente. Ela sugere que as amostras de leite necessitam de resfriamento, mesmo que estejam conservadas com bronopol. Possivelmente, com o aumento da idade da amostra, houve multiplicação microbiana a partir do substrato lactose, com produção de ácido lático, resultando em abaixamento do pH (Santos e Fonseca, 2007).

Tabela 16- Comparação das médias dos teores do pH de amostras de leite cru, armazenado durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias.

Dia	0	1	3	5	7	10	15
<b>Temp. °C</b>							
<b>4</b>	6,65 <sup>aA</sup>	6,69 <sup>aA</sup>	6,68 <sup>bA</sup>	6,68 <sup>bA</sup>	6,68 <sup>bA</sup>	6,71 <sup>bA</sup>	6,71 <sup>bA</sup>
<b>20 ± 2</b>	6,65 <sup>aD</sup>	6,64 <sup>aD</sup>	6,38 <sup>aCD</sup>	6,07 <sup>aC</sup>	5,52 <sup>aB</sup>	5,26 <sup>aAB</sup>	4,89 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras diferentes (minúsculas) nas colunas (temperaturas) e por letras maiúsculas nas linhas (dias) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

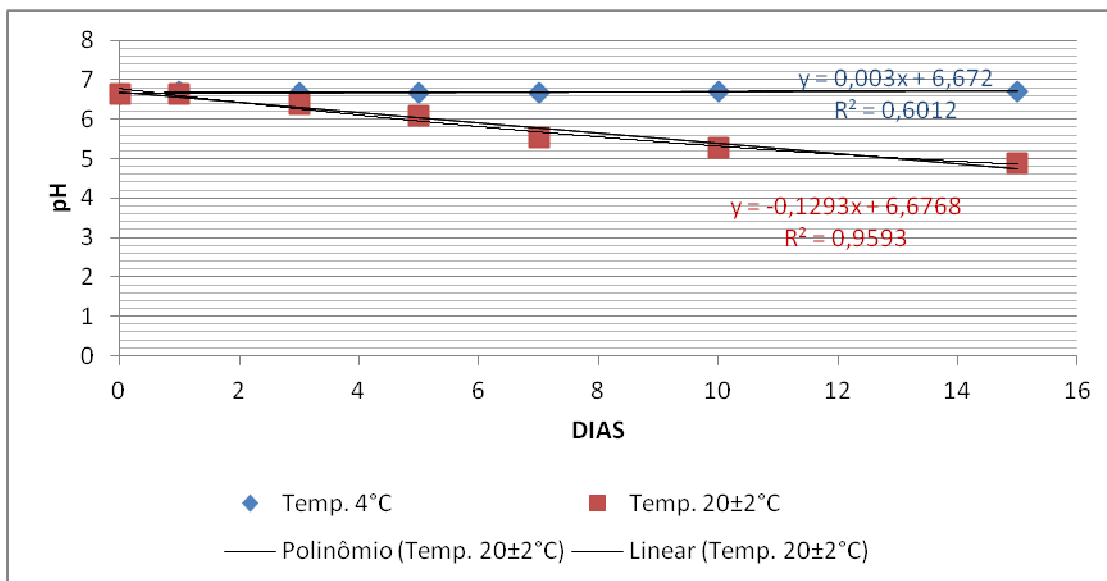


Figura 14- Regressão das médias de pH de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2°C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias.

### 6.7 ESTABILIDADE DA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL (CBT) NO LEITE

A contagem bacteriana total (log UFC/μL) das amostras de leite cru armazenados a 4°C e a 20°C ±2°C, durante 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15 dias resultaram em médias que tiveram diferença significativa ( $p < 0,05$ ), a partir do terceiro dia de armazenamento (tabela 17). As amostras armazenadas na temperatura de 20°C±2°C apresentaram coagulação a partir do terceiro dia de armazenamento, o que pode levar a uma diminuição na confiabilidade dos resultados encontrados nas análises por citometria de fluxo em amostras de leite cru não refrigeradas. A regressão das médias de contagem bacteriana total (log UFC/μL) nas temperaturas de 4°C e 20±2°C estimadas nos dias 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 está representada na figura 15. Os resultados confirmam a necessidade de se manter as amostras sob refrigeração (4°C) no intuito de preservá-las até o momento da análise,

sem que ocorra aumento na contagem bacteriana total original do leite.

De acordo com Leite (2008), amostras adicionadas de azidiol, conservadas em temperaturas de 4°C a 10°C, podem ser usadas na contagem bacteriana por citometria de fluxo, sem que ocorram diferenças significativas nos resultados encontrados, por até 10 dias de armazenamento. Assim o armazenamento de amostras destinadas às análises microbiológicas em temperatura ambiente, mesmo adicionadas do conservante azidiol, não pode ser recomendada em função da alta incidência de amostras não conformes.

No trabalho de Cassoli *et al.* (2010), avaliou-se o efeito da temperatura de armazenamento e da idade da amostra sobre a contagem bacteriana total de amostras de leite conservadas com azidiol. Eles concluíram que a amostra para contagem bacteriana total pode ser analisada até sete dias após a coleta, desde que conservada com azidiol e mantida sob refrigeração a 7°C, sem aquecimento ou congelamento.

Tabela 17- Comparação das médias de Contagem bacteriana Total (log UFC/μL) em amostras de leite cru, armazenadas nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 15.

Dias	0	1	3	5	7	10	15
<b>Temp. °C</b>							
<b>4</b>	2,64 <sup>aA</sup>	2,62 <sup>aA</sup>	2,55 <sup>aA</sup>	2,38 <sup>aA</sup>	2,52 <sup>aA</sup>	2,21 <sup>aA</sup>	2,61 <sup>aA</sup>
<b>20 ± 2</b>	2,65 <sup>aA</sup>	2,62 <sup>aA</sup>	3,49 <sup>bB</sup>	3,75 <sup>bBC</sup>	4,05 <sup>bBC</sup>	4,11 <sup>bC</sup>	4,09 <sup>bC</sup>

Médias seguidas por letras diferentes (minúsculas) nas colunas (temperaturas) e por letras maiúsculas nas linhas (dias) diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

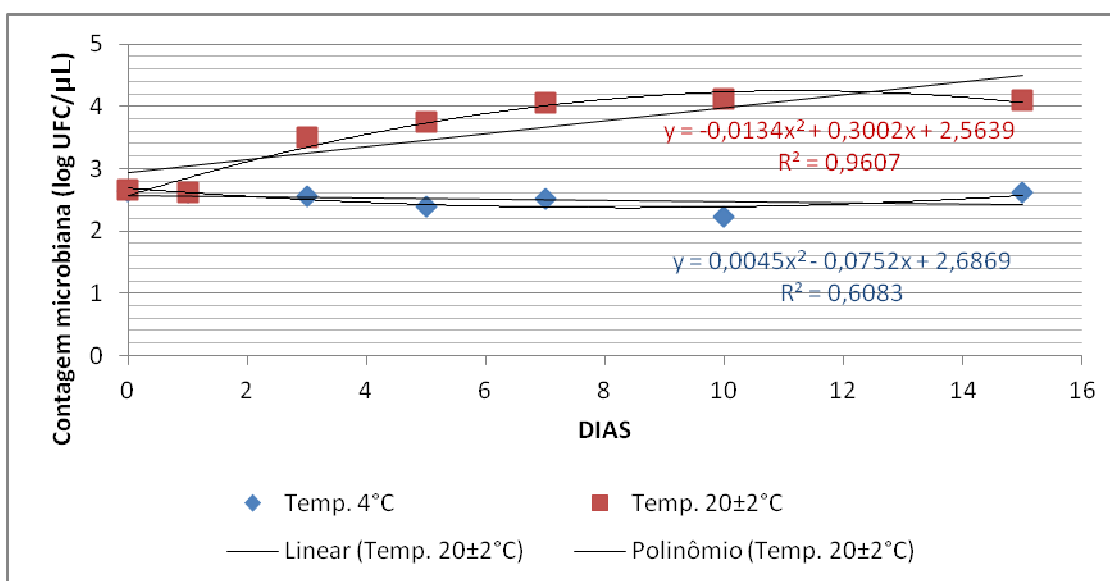


Figura 15- Regressão das médias de Contagem bacteriana Total (log UFC/μL) de leite cru armazenado a 4°C e 20± 2°C durante 0, 1, 3, 5, 7,10 e 15 dias.

## 7. CONCLUSÕES

O equipamento CombiScope FTIR apresentou boa precisão e acurácia na repetibilidade e na reprodutibilidade para a análise de uréia na forma de nitrogênio uréico no leite cru (NUL), apresentando boa confiabilidade e alto coeficiente de correlação quando comparado com a metodologia enzimática de determinação de uréia.

O equipamento FTIR não detectou acuradamente uréia adicionada ao leite em níveis de 40mg/dL.

A adição de uréia ao leite não afetou os resultados analíticos de proteína. Níveis elevados de uréia adicionada (40mg/dL) não foram detectados linearmente.

Os teores de uréia no leite cru permaneceram estáveis sob armazenamento

a 4°C durante 15 dias. Porém à temperatura de 20°C, a partir do terceiro dia houve um aumento nos teores de uréia do leite.

Os teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado permaneceram estáveis às temperaturas de armazenamento de 4°C e 20°C durante até 15 dias de armazenamento.

A CCS sofreu redução após o terceiro dia de armazenamento à temperatura ambiente, mesmo com a utilização do conservante bronopol nas amostras.

Os valores do pH nas amostras de leite cru conservados com bronopol diminuíram após armazenamento à temperatura de 20°C a partir do terceiro dia, provavelmente devido à proliferação microbiana.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREATTA, E. ; DE OLIVEIRA, C. A. F.; MARQUES, M. C. *et al.* Avaliação do Rendimento e Proteólise do Queijo Minas Frescal Produzido com Diferentes Níveis de Células Somáticas: Resultados Preliminares. *Brazilian Journal of Food Technology*, III JIPCA, p.71-74, 2006.
- ANDREWS, A. T.; OLIVERCRONA, T.; BENGTTSSON-OLIVERCRONA, G. *et al.* Indigenous enzymes in milk. In: FOX, P. F. (Ed). *Food Enzymology*. New York: Elsevier Applied Science, v.1, p.53-129, 1991.
- AOAC International. Official Methods of Analysis of the AOAC, 15 th ed. Mid-infrared spectroscopic Method 972.16 for fat, lactose, protein, and solids in milk. Association of Official Analytical Chemists International, 2200 Wilson Boulevard, Arlington, VA 22201, 1990.
- AOAC International. Official Methods of Analysis of the AOAC. Method 941.04 for urea and ammoniacal nitrogen in animal feed, urease method, Association of Official Analytical Chemists International, 2200 Wilson Boulevard, Arlington, VA 22201, 1994.
- ARAÚJO, V. M. *Avaliação da metodologia do infravermelho com Transformada de Fourier para análises de pH e ponto de congelamento em leite bovino.* 52 p. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ARUNVIPAS, P.; DOHOO, I.; VANLEEUEWEN, J. *et al.* The effect of non-nutritional factors on milk urea nitrogen levels in Ayrshire dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.85, suppl.1, p.320, 2002.
- ARUNVIPAS, P.; VANLEEUEWEN, J.; DOHOO, I. *et al.* Evaluation of the reliability and repeatability of automated milk urea nitrogen testing. Short Communication- *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.63, p.67-60, 2003.
- AULDIST, M. J., HUBLLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*. v.53, n.1, p.28-36, 1998.
- BARBOSA, L. C. DE A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: UFV, 2007.
- BAUMGARTNER, M.; FLÖCK, M.; WINTER, P. *et al.* Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectrometry for the routine determination of urea in milk. *Milchwissenschaft*, v.58, p.599-602, 2003.
- BEHMER, M. L. A., Tecnologia do Leite – Produção, Industrialização e Análise, SP, Nobel, 1985.
- BENDELJA, D.; ANTUNAC, N.; MIKULEC, N. Urea concentration in sheep's milk. *Mljekarstvo*, v.59, n.1, p. 3-10, 2009.

BENTLEY INSTRUMENTS INC.  
**Somacount 300 operator's manual.**  
Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997.  
116 p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC.  
**Bentley 2000 operator's manual.**  
Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998.  
79p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC.  
**ChemSpec<sup>®</sup> 150 operator's manual.**  
Chaska: Bentley Instruments Inc., 1999.  
30p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC.  
**BactoCount 150 operator's manual.**  
Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002.  
49p.

BIGGS, D. A.; JOHANSSON, G.;  
SJAUNJA, L. O. Analysis of fat,  
protein, lactose and total solids by infra-  
red absorption. In: Monograph on rapid  
indirect methods for measurement of  
the major components of milk. *Bulletin  
of the International Dairy Federation*,  
n.2008, p.21-29, 1987.

BONFATTI, V.; GRIGOLETTO, L.;  
CECCHINATO, A. *et al.* Validation of  
a new reversed-phase high-performance  
liquid chromatography method for  
separation and quantification of bovine  
milk protein genetic variants. *Journal of  
Chromatography A*, v.1195, n.9, p.101-  
106, 2008.

BRADLEY Jr., R. L. Dairy Products.  
In: HORWITZ, W. (editor). *Official  
methods of analysis of AOAC  
International*. 17. ed. Gaithersburg:  
AOAC International, 2000, cap. 33.

BRASIL. *Instrução normativa n.51, de  
18 de setembro de 2002. Regulamentos  
técnicos de produção, identidade,  
qualidade, coleta e transporte de leite.*  
Brasília, DF: Ministério da Agricultura,  
Secretaria de Inspeção de Produto  
Animal, 2002, 39p.

BRASIL. *Instrução normativa n°22 de  
14 de abril de 2003. Métodos analíticos  
oficiais físico-químicos para controle  
de leite e Produtos lácteos.* Brasília,  
DF: Ministério da Agricultura,  
Secretaria de Inspeção de Produto  
Animal, 2003, 137p.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.;  
ARCURI, E. *et al.* Composição do  
Leite. *Agência de Informação  
EMBRAPA Agronegócio do Leite.*  
EMBRAPA. Disponibilidade  
<[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/  
Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_128\\_217  
20039243.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html) > . Acesso em 5 de maio  
de 2009.

BRODERICK, G.A.; CLAYTON, M.K.  
A statistical evaluation of animal and  
nutritional factors influencing  
concentration of milk urea nitrogen.  
*Journal of Dairy Science*, v.80, n.11,  
p.2964-2971, 1997.

BROUTIN P. J. Evaluation of an  
enzymatic method for the rapid and  
specific determination of urea in raw  
milk. In: Proceedings of the 32nd  
Biennial Session of ICAR, Bled,  
Slovenia, n.98, p.121-125, 2000.

BROUTIN, P. J. New applications of  
Mid-infra-red Spectrometry for the  
Analysis of Milk and Milk Products-

Casein. *Bulletin of the International Dairy Federation* 406/2006.

BUTLER, W. R.; CALAMAN, J. J.; BEAM, S. W. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *Journal of Animal Science*, v.74, n.4, p.858-865, 1996.

CARLSSON, J.; BERGSTRÖM, J. The diurnal variation of urea in cow's milk and how milk fat content, storage and preservation affects analysis by a flow injection technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.35, n.1, p.67-77, 1994.

CARLSSON, J.; BERGSTRÖM, J.; PEHRSON, B. Variations with breed, age, season, yield, stage of lactation, and breed in the concentration of urea in bulk milk and individual cow's milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.36, p.245-254, 1995.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.2, p.434-439, 2010.

CHAVEZ, E. C.; TOMASZEWSKI, D. C.; CHERBONNIER, D. C. *et al.* Evaluation of five alternative milk preservatives for the DHI System. *Journal of Dairy Science*, v.74, suppl.1, p.223, 1991.

COATES, J. Vibrational Spectroscopy: Instrumentation for infrared and Raman spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, v.33, p.267-425, 1998.

COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Application of genetic algorithms in the variable selection in mid infrared spectroscopy: simultaneous determination of glucose, maltose and fructose. *Química Nova*, v.25, n.1, p.46-52, 2002.

DAL ZOTTO, R.; DE MARCHI, M.; CECCHINATO, A. *et al.* Reproducibility and repeatability of measures of milk coagulation properties and predictive ability of Mid-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, v.91, p.4103-4112, 2008.

DELTA INSTRUMENTS, An Advanced Instruments Company. **LactoScope FTIR user's guide**. Milk and Liquid Dairy Product Analyzer. Netherlands: Delta Instruments, 2007. 138p.

DELTA INSTRUMENTS, An Advanced Instruments Company. **SomaScope MKII user manual**. Netherlands: Delta Instruments, 2009. 44p.

DE MARCHI, M.; BONFATTI, V.; CECCHINATO, A. *et al.* Prediction of protein composition of individual cow milk using mid-infrared spectroscopy. *Italian Journal Animal Science*, v.8, (Suppl. 2), p.399-401, 2009a.

DE MARCHI, M.; FAGAN, C. C.; O'DONNELL, C.P. *et al.* Prediction of coagulation properties, titratable acidity, and pH of bovine milk using mid-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.423-432, 2009b.

- DePETERS, E. J.; CANT, J. P. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *Journal of Dairy Science*, v.75, n.8, p.2043-2070, 1992.
- DePETERS, E. J.; FERGUSON, J. D.; BAKER, L. D. Nonprotein Nitrogen and protein distribution in the milk of cows. In: SYMPOSIUM ON PROTEIN DEFINITION, 1, 1993. *Proceedings of the symposium on protein definition*. Minneapolis: International Dairy Federation, 1993, p.7-31.
- DURIG, J. R.; SULLIVAN, J. F. Vibrational spectroscopy, Fourier transforms and analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, v.9, n.4, p.104-106, 1990.
- DUTRA, R.C. L.; TAKAHASHI, M.F.K.; DINIZ, M. F. Importância da preparação de amostras em espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR) na investigação de constituintes em materiais compostos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.5, n.1, p.41-46, 1995.
- EICHER, R.; BOUCHARD, E.; TREMBLAY, A. Cow level sampling factors affecting analysis and interpretation of milk urea concentrations in 2 dairy herds. *Canadian Veterinary Journal*, v.40, n.7, p.487-492, 1999.
- EIKREM, L. O. Process Fourier transform infrared spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, v.9, n.4, p.107-109, 1990.
- ESTEVES, E. G. *Componentes nitrogenados: metodologias analíticas e associações com outros indicadores de qualidade do leite cru refrigerado*. 2006. 127 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- EURACHEM. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Teddington, Eurachem, 1998.
- FAUST, M. A.; KILMER, H. Variability of milk urea nitrogen results. In: Of the Professional Dairy Management Seminar, 1996, Dubuque. **Proceeding...** Dubuque, 1996. p.133-136.
- FERGUSON, J. D.; CHALUPA, W. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.72, n.3, p.746-766, 1989.
- FERGUSON, J. D.; THOMSEN, N.; SLESSER, D. *et al.* Pennsylvania DHIA milk urea testing. *Journal of Dairy Science*, v.80, suppl.1, p.161, 1997.
- FERGUSON, J. D. Milk Urea Nitrogen. 1999. Acessado em 23 de março de 2011. Online. Disponível na internet. Online: <http://research.vet.upenn.edu/DairyPoultrySwine/DairyCattle/MUN/MilkUreaNitrogen/tabid/1596/Default.aspx>
- FERRÃO, M. F.; CARVALHO, C. W.; MULLER, E. I. *et al.* Determinação simultânea dos teores de cinza e

proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.24, p.333-340, 2004.

FERREIRA, M. G.; SOUZA, L. T.; PELEJA, L. *et al.* Uréia e qualidade do leite. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*- Publicação científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça/FAMED, ano III, n.6, p.1-3, 2006.

FONSECA, L. F. L. Pagamento por qualidade: situação atual e perspectivas para o Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE –INTERLEITE, 5, 2001, Belo Horizonte. **Anais... Belo Horizonte: Instituto Fernando Costa – SP, 2001.** p.193.

FONSECA, C. S. P. *Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais*. 2005. 62p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FOX, P. F., MORRISSEY, P. A. Enzymes and food processing. In: BIRCH, G. C., BLAKEBOROUGH, N., PARKER, K. J. (Ed). *Enzymes and Food Processing*. London: Applied Science Publishers, p. 213-238, 1981.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Londres: Thomson Science, 1998, 396p.

GAONA, R. C. Alguns indicadores metabólicos no leite para avaliar a relação nutrição: fertilidade. In: 29º Congresso Nacional de Medicina Veterinária. 29, 2002, Gramado, RS. **Anais...** Gramado: Conbravet, 2000. p.40-48.

GODDEN, S. M.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F. *et al.* Analytic validation of an infrared milk urea assay and effects of sample acquisition factors on milk urea results. *Journal of Dairy Science*, v.83, n.1, p.435–442, 2000.

GODDEN, S. M.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F. *et al.* Factors Associated with Milk Urea Concentrations in Ontario Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v.84, n.1, p.107–114, 2001.

GONZALEZ, H. L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R. *et al.* Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.6, p.1531-1543, 2004.

GUIMARÃES, C. P. A.; MESQUITA, A. J. M.; COELHO, K. O. *et al.* Influência da adoção do pagamento por qualidade sobre a contagem bacteriana total do leite cru. II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL), Goiânia, Goiás, p.1-3, 2006.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D. A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.1228-1232, 2000.

GUSTAFSSON, A. H.; PALMQUIST, D. L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. *Journal of Dairy Science*, v.76, n.2, p.475-84, 1993.

HAMMOND, A. C. Update on BUN and MUN as a guide for protein supplementation in cattle. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 1997. Gainesville: University of Florida. PROCEEDINGS... Acessado em 20 de março de 2011. Online. Disponível na Internet:

<http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/1997/frns1997.pdf>

HANSEN, P. W. Screening of dairy cows for ketosis by use of infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.2005-2010, 1999.

HARDING, F. Bases and experiences of expressing the protein content of milk – England and Wales. *Journal of Dairy Science*, v.75, n.11, p.3218-3220, 1992.

HARDING, F. *Milk quality*. New York: Blackie Academic & Professional, 1995. 165 p.

HELPER, G. A.; FERRÃO, M. F.; FERREIRA, C. V. *et al.* Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.4, p. 779-786, 2006.

HERING, P.; HANUŠ, O.; FRELICH, J. *et al.* Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. *Czech Journal of Animal Science*, v.53, n.2, p.64–76, 2008.

HEWAVITHARANA, A. K.; BRAKEL, B. V. Fourier Transform Infrared Spectrometric Method for the Rapid Determination of casein in raw milk. *The Analyst*, v.122, p.701–704, 1997.

IDF. *International IDF Standard 100B:1991*: Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C. Bruxelas, 1991, 3 f.

IDF. *International IDF Standard 148A:1995*: Milk – Enumeration of somatic cell. Bruxelas, 1995 (a), 8 f.

IDF. *International IDF Standard 50C:1995*: Milk and milk products – guidance on sampling. Bruxelas, 1995 (b), 19 p.

IDF. *International IDF Standard 128A:1999*: Milk – definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis. Application to calibration procedure and quality control in the dairy laboratory. Bruxelas, 1999, 12 f.

IDF. *International IDF Standard 141C:2000*: Whole milk –

determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Bruxelas, 2000, 15 f.

INMETRO. *Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*. Duque de Caxias, INMETRO 2002.

IÑÓN, F. A.; GARRIGUES, S.; LA GUARDIA, M. Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta*, v.513, p.401-412, 2004

JANKOVSKÁ, R.; ŠUSTOVÁ, K. Analysis of Cow Milk by Near-infrared Spectroscopy. *Czech Journal of Food Science*, v.21, p.123-128, 2003.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; ERDMAN, R. A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.10, p. 2681-2692, 1998.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; HIGH, J. Use of milk urea nitrogen to improve dairy cow diets. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.4, p.939-946, 2002.

KALASINSKY, K. S. Industrial applications of vibrational spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, v.9, n.3, p.83-89, 1990.

KAUFFMAN, A. J.; St-PIERRE, N. R. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein

and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, v.84, n.10, p.2284-2294, 2001.

KITCHEN, B. J. Reviews of the progress of dairy science: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, v.48, n.2, p.167-188, 1981.

KOHN, R. A.; KALSCHEUR, K.F.; RUSSEK-COHEN, E. Evaluation of models to estimate urinary nitrogen and expected milk urea nitrogen. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.1, p.227-233, 2002.

LEITE, M. O. *Fatores que interferem na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol*. 63p. 2006. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LICATA, E. Subclinical mastitis and urea determination in cow's milk. *Obiettivi e Doc-Vet*. v.6, n.12, p.65-67, 1985.

LIMA, J. L. F. C., DELERUE-MATOS, C.; VAZ, M. C. V. F. Flow injection system with potentiometric detection for the determination of urea content in milks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.4, p.1386-1389, 1998.

LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M.; SCHWEISTHAL, M. *et al.* Precalibration evaluation procedures for mid infrared milk analyzers. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.2761-2774, 2006.

- MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D. M. *et al.* Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, v.83, n.1, p.1-11, 2000.
- MAGALHÃES, A. C. M. *Teores de nitrogênio no leite e no plasma de vacas mestiças*. 45p. 2003. Tese (Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MARENJAK, T., POLJIČAK-MILAS, N.; STOJEVIĆ, Z. The aim of urea determination in cow's milk. *Praxis Veterinaria*, v.52, n.3, p.233-241, 2004.
- MELLENDEZ, P.; DONOVAN, A.; HERNANDEZ, J. Milk Urea Nitrogen and infertility in Florida Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.83, n.3, p.459-463, 2000.
- MENDES, M. H. A. F. *Produção higiênica do leite: Boas Práticas Agrícolas. Curso de Pós-graduação "Lato Sensu": Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal*. 42 p. 2006. Universidade Castelo Branco, Brasília.
- MEYER, P. M. *Fatores não nutricionais que afetam as concentrações de nitrogênio uréico no leite*. 131 p. 2003. Tese (doutor em agronomia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz) Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MEYER, P. M.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Validação de modelos de predição de nitrogênio uréico no leite, estimando-se o consumo individual pelo consumo do rebanho. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.28, n.1, p.73-79, 2006.
- MIETTINEN, P. V. A; JUVONEN, R. O. Diurnal variations of serum and milk urea levels in dairy cows. *Acta Agriculturae Scandinavica*, v.40, n.3, p.289-294, 1990.
- MITCHELL, R. G.; G. W. ROGERS, G. W.; DECHOW, C.D. *et al.* Milk Urea Nitrogen concentration: heritability and genetic correlations with reproductive performance and disease. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.4434-4440, 2005.
- MOLLER, S.; MATTHEW, C.; WILSON, G. F. Pasture protein and soluble carbohydrate levels in spring dairy pasture and associations with cow performance. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, v.54, p.83-86, 1993.
- MONARDES, H. G.; MOORE, R. K.; CORRIGAN, B. *et al.* Preservation and storage mechanisms for raw milk samples for use in milk-recording schemes. *Journal of Food Protection*, v.59, n.2, p.151-154, 1996.
- MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F. *et al.* Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.1, p.25-31, 2005.
- NASCIMENTO, A. R.; ZIOLLI, R. L.; ARARUN JR. J. T. *et al.* Avaliação do desempenho analítico do método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbon) por detecção no

- infravermelho. *Eclética Química* [online], 2008, v.33, n.1, p.35-42, 2008.
- NEVES, R. B. S. Ações da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite- RBQL. *Informativo CBQL*, ano 1, n.008, 2010.
- NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E. *et al.* Variability of test-day milk production and composition and relation of somatic cells count with yield and compositional changes of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v.67, n.2, p.361-366, 1984.
- OLTNER, R.; SJAUNJA, L. O. Evaluation of a rapid method for the determination of urea in cow's milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.23, n.1, p.39-45, 1982.
- OLTNER, R.; EMANUELSON, M.; WIKTORSSON, H. Urea concentrations in milk in relation to milk yield, live weight, lactation number and amount and composition of feed given to dairy cows. *Livestock Production Science*, v.12, p.47-57, 1985.
- PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. Determination of cholesterol in dairy products using infrared techniques: 1. FTIR spectroscopy. *International Journal of Dairy Technology*, v.55, p.127-132, 2002.
- PERES, J. R. O leite como ferramenta de monitoramento nutricional. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Editado por González, F. H. D.; Durr, J. W. ; Fontaneli, R. S. Porto Alegre, 2001, p.30-45.
- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Vencendo a luta contra a mastite. 1° ed. Campinas: Westfalia, 2002. 192 p.
- RAJALA-SCHULTZ, P. J.; SAVILLE, W. J. A.; FRAZER, G. S. *et al.* Association between milk Urea Nitrogen and fertility in Ohio dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.84, n.2, p.482-489, 2001.
- REIS, G. L.; ALVES, A. A.; LANA, A. M. Q. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico química e a contagem de células somáticas. *Ciência Rural*, v.37, n.4, p.1134-1138, 2007.
- RIBAS, N. P. Laboratório processa 300 mil amostras de leite. *Revista Gado Holandês*, n.489, p.11, 2000.
- RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. Analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.45, n.8 p. 2815-2818, 1997.
- RODRIGUEZ-SAONA, L. E. ; KOCA, N.; HARPER, W. J. *et al.* Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, v.89, n.5, p.1407-1412, 2006.
- ROMA JÚNIOR, L. C.; FISCHER, P. C.; AMARAL, T. G. R. *et al.* Influência da fraude com uréia sobre os componentes do leite durante

armazenamento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006, Goiânia, GO *Anais...* Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2006.

ROPSTAD, E.; REFSDAL, A. O. Herd reproductive performance related to urea concentration in bulk milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.28, n.1, p.55-63, 1987.

ROSELER, D. K.; FERGUSON, J. D.; SNIFFEN, C. J. *et al.* Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk non-protein nitrogen in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.76, n.2, p.525-534, 1993.

ROY, B.; SUDIPTA GHOSH, S.; BAGHEL, K. K. S. *et al.* Estimation of milk urea level as a potential tool for dairy herd management. *Serva Manav Vikas Samiti- Smvs' Dairy Year Book 2010 - Farm management & diseases*, p.66-71, 2010.

SALIBA, E. O. S.; GONTIJO NETO, M. M.; RODRIGUES, N. M. *et al.* Predição da Composição Química do Sorgo pela Técnica de Espectroscopia de Refletância no Infravermelho Próximo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.3, 2003.

SALA, O. Fundamentos da espectroscopia Raman e no Infravermelho, 1.ed. Unesp: São Paulo, 223p., 1996.

SAMPAIO, I. B. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e

Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 264p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Composição e propriedades físico-químicas do leite. In: CURSO ONLINE SOBRE MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE. Agripont, 2000. Módulo 1. Disponível em: <http://www.unitins.br/ates/arquivos/Pecu%20C3%A1ria/Bovinocultura/Bovinocultura%20de%20Leite/Qualidade%20do%20Leite%20-%20Curso/Qualidade%20do%20Leite%20-%201.pdf> Acessado em: 8/04/2011.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotóxicas sobre a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, v.15, n.82, p.13-19, 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégia para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. 1º Edição. Barueri: Editora Manole Ltda, 2007, 314 p.

SANTOS, M. V.; MA, Y.; BARBANO, D. M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2491-2503, 2003a.

SANTOS, M. V.; MA, Y. ; CAPLAN, Z. *et al.* Sensory threshold of off-flavors caused by proteolysis and lipolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.1601-1607, 2003b.

SANTOS, M. V.; OLIVEIRA, C. A. F.; LIMA, Y. V. R. *et al.* Remoção de células somáticas pela microfiltração não afeta a composição e a proteólise do

leite. *Ciência Rural*, v.36, n.5, p. 1486-1493, 2006.

SCHEPERS, A. J.; MEIJER, R. G. M. Evaluation of the utilization of dietary nitrogen by dairy cows based on urea concentration in milk. *Journal of Dairy Science*, v.81, n.2, p.579-584, 1998.

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

SILVA, P. H. F.; PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L. *et al.* *Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos*. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 1997. 190p.

SILVEIRA, T. M. L. *Comparação dos métodos de referência e de análise eletrônica na determinação da composição e da contagem de células somáticas do leite bovino*. 2002. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; CANÇADO, S. V. *et al.* Comparação entre os métodos de referência e a análise eletrônica na determinação da composição do leite bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, n.6, p.782-787, 2004.

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; LAGO, T. B. N. *et al.* Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina*

*Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.1, p.128-132, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SOCORRO, E. P.; PAULE, B. J. A.; NEVES, A. P. *et al.* Influência da proteína bruta e do NDT da dieta no teor de uréia do leite em rebanhos leiteiros do Recôncavo Baiano. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.2, n.3, p. 74-80, 2001.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5.ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 836 p., 2002.

SKOOG, D. A.; LEARY, J.J. *Principles of Instrumental Analysis*, 4.ed., Saunders: London, 1992.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacteria count in raw milk. *Bulletin of the IDF*, n.358, p.36-48, 2000.

TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n.1, p.345-357, 1992.

TORRENT, J. Nitrogênio uréico no leite e qualidade do leite. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça

Holandesa/Universidade Federal do Paraná, p.27-29, 2000.

TRONCO, V. M. *Manual para a Inspeção da Qualidade do Leite*. Santa Maria: Editora UFSM. 1997. 166 p.

TYRRELL, H. C.; MOE, P. W. Effect of intake on digestive efficiency. *Journal of Dairy Science*, v.58, n.8, p.1151-1163, 1975.

ULBERTH, F.; HENNINGER, M. Quantification of *trans* fatty acids in milk fat using spectroscopic and chromatographic methods. *Journal of Dairy Research*, v.61, p.517-527, 1994.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ithaca: Cornell University Press New York. 1994. 476p.

VINNE, R. V. D. A análise da uréia no leite como ferramenta no monitoramento da alimentação de vacas leiteiras. Site da APCBRH/PARLPR- Associação Paranaense de criadores de Bovinos da raça holandesa e Programa de análise de Rebanhos leiteiros do Paraná. Acessado em 20 de março de 2011. Online. Disponível na Internet: <http://www.holandeparana.com.br/artigos/artigo2.html>

ZENI, D. *Nitrogênio uréico no leite de vacas mantidas em pastagens de aveia e azevém*. 47p. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de

Concentração: Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Santa Maria.

WANG, C.; LIU, J. X.; YUAN, Z. P. *et al.* Effect of level of metabolizable protein on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.90, n.6, p.2960-2965, 2007.

WEBSTER, L.; SIMPSON, P.; SHANKS, A. M. *et al.* The authentication of olive oil on the basis of hydrocarbon concentration and composition. *Analyst*, London, v.125, p.97-104, 2000.

WILLIAMS, P. C. *Commercial Near-Infrared Reflectance Analyzers*. In: WILLIAMS, P. C.; NORRIS, K. H. (Ed) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1987. p.1074-142.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. *Investigations on the amount and composition of NPN in milk*. Munich, 1981. 121p. Thesis (PHD) - University of Munich.

YOUNG, A. Milk urea nitrogen test (MUN). AG/Dairy -01. Utah State University Extension- electronic publishing- Logan, Utah, 2001. Disponível em: <[http://extension.usu.edu/files/publications/publication/AG\\_Dairy-01.pdf](http://extension.usu.edu/files/publications/publication/AG_Dairy-01.pdf)>. Acesso em: 5 jan. 2011.

**ANEXO - EXEMPLO DE LAUDO DAS 12 AMOSTRAS PADRÃO DO DQCI PARA CALIBRAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS**



**CASEIN RAW MILK STANDARDS CHEMICAL RESULTS**

Division of Diversified Laboratory Testing LLC  
 5205 Quincy Street, Mounds View, MN 55112  
 Phone: 763-785-0484, Fax 763-785-0584

**SET: 1414      DATE: 04/04/11**

**ATTENTION: MILK LAB!!!**

SAMPLE NUMBER	MOJONNIER FAT%	TOTAL N. TRUE PROTEIN			TOTAL SOLIDS %	CALCULATED VALUES**					UREA mg/DL
		%	%	CASEIN%		By Diff. LACTOSE %	Other Solids%		SNF%		
							Tot. Pro.	Tru. Pro.			
1	3.21	2.99	2.79	2.26	11.63	4.69	8.43	5.44	5.64	14.0	
2	2.90	3.18	3.00	2.51	11.76	4.95	8.86	5.68	5.87	10.7	
3	3.53	3.24	3.06	2.53	12.25	4.76	8.72	5.48	5.66	9.6	
4	3.84	2.97	2.77	2.21	12.19	4.65	8.34	5.37	5.58	12.9	
5	3.97	3.46	3.26	2.67	13.04	4.86	9.06	5.60	5.80	13.3	
6	5.48	4.01	3.80	3.18	15.09	4.81	9.61	5.60	5.81	14.3	
7	3.30	3.15	2.97	2.46	12.01	4.84	8.71	5.56	5.74	10.8	
8	3.51	3.18	3.03	2.51	12.29	4.88	8.78	5.60	5.75	4.6	
9	3.72	3.38	3.21	2.61	12.71	4.87	8.99	5.61	5.78	8.1	
10	3.99	3.37	3.15	2.62	12.91	4.80	8.92	5.55	5.77	15.0	
11	4.48	3.39	3.22	2.65	13.36	4.76	8.88	5.49	5.66	8.2	
12	4.72	3.82	3.63	3.02	14.06	4.74	9.35	5.53	5.71	11.9	
<b>AVG.(1-12)</b>	<b>3.89</b>	<b>3.34</b>	<b>3.16</b>	<b>2.60</b>	<b>12.77</b>	<b>4.80</b>	<b>8.89</b>	<b>5.54</b>	<b>5.73</b>	<b>11.1</b>	

References: SMEDP 15.8F, 15.12B, 15.10C, 15.9B, 15.8A, CH10

AOAC:989.05, 991.20, 991.21, 991.23, 990.20, 990.21, 989.04

\*\*calculations: lactose by diff= total solids - fat - total N protein- ash  
 Tot. Pro. other solids = total solids - fat - total N protein

SNF = total solids - fat  
 Tru. Pro. other solids = total solids - fat - true protein