

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Análise do ponto de congelamento do leite por método de precisão e por espectroscopia com Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR)**

Rommel Furst Brito

**Belo Horizonte - MG**

**2019**



Rommel Furst Brito

**Análise do ponto de congelamento do leite por método de precisão e por espectroscopia com Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR)**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

**Belo Horizonte - MG**

**2019**

Brito, Rommel Furst, 1989.  
B862a Análise do ponto de congelamento do leite por método de precisão e por espectroscopia com Transformada de Fourier no Infravermelho (FTIR) / Rommel Furst Brito – 2019.  
51p.: il.  
Orientador: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira  
Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.  
1- Leite - Análise – Teses - 2- Leite – Qualidade – Teses – 3 – Leite- Conservantes - Teses  
I - Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho – II – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária – III – Título.

CDD – 637

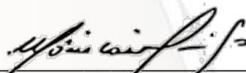
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### ROMMEL FURST BRITO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

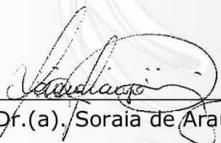
Aprovado(a) em 13 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Dr.(a). Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira  
Presidente – Orientador(a)



Prof(a). Dr.(a). Marcelo Resende de Souza



Prof(a). Dr.(a). Soraia de Araújo Diniz



Dr.(a). Cristiane Viana Guimarães Ladeira

Aos meus pais, Esperendeus Ferraz Brito (*in memorian*) e Maria Aparecida Drummond Furst Brito.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira por me acolher e guiar por esta jornada e por todo o conhecimento compartilhado durante esses dois anos.

À equipe do LabUFMG, Adriana, Claudiane, Fabiana, Fabíola, Márcia, Márcio, Maria dos Anjos, D. Maria, Raquel, Rosemary, Taynara, Wanderlan e Wendel e aos professores Leorges, Mônica Leite e Ronon pela prontidão em ajudar em diversas ocasiões e pelos momentos de companheirismo durante o experimento.

Ao Cássio da CCPR pelo fornecimento do leite para este estudo.

À Márcia da Embalpharma pelo fornecimento dos conservantes para este estudo.

Aos colegas, Aline, Gustavo e Sarah pela colaboração durante a parte experimental.

Às colegas Daniela Cristina e Wanessa pelo café reforçado após horas de análises.

Aos professores Marcos e Soraia pela disponibilidade e por todo o apoio durante as análises estatísticas.

Aos funcionários do DTIPOA, César, Joelma, Marco Antônio e Miltinho pela ajuda com todo o material e documentação necessária.

A todos os outros professores e colegas do DTIPOA pelo interesse neste estudo, pelas opiniões dadas e por terem contribuído com meu aprendizado.

À minha mãe, Maria Aparecida, meus irmãos, Mônica, Erick, Bruno e Karina e a minha namorada, Amanda, por todo o carinho e por estarem sempre ao meu lado.

*Somos todos aprendizes duma arte que nunca ninguém se torna mestre.*

Ernest Hemingway

---

## Sumário

---

	<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	10
	<b>RESUMO</b> .....	11
	<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>3.1.</b>	Produção de leite.....	14
<b>3.2.</b>	Composição físico-química do leite.....	15
<b>3.3.</b>	Ponto de congelamento do leite.....	16
<b>3.4.</b>	Métodos oficiais para análise de adição de água em leite .....	19
<b>3.5.</b>	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite.....	20
<b>3.6.</b>	Espectroscopia com transformada de Fourier no infravermelho.....	21
<b>3.7.</b>	Conservantes das amostras de leite.....	25
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>4.1.</b>	Conservantes e identificação das amostras.....	29
<b>4.2.</b>	Coleta do leite.....	29
<b>4.3.</b>	Recepção do leite e preparo das amostras.....	30
<b>4.4.</b>	Acidez titulável.....	31
<b>4.5.</b>	Calibração e análise pelo crioscópio eletrônico.....	32
<b>4.6.</b>	Calibração e análise pelo FTIR.....	33
<b>4.7.</b>	Análises estatísticas.....	34
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48

---

### Lista de figuras

Figura 1	Desenho esquemático do experimento para avaliação do ponto de congelamento do leite em diferentes condições (conservação, tempo e método de análise).....	31
Figura 2	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias sem adição de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	42
Figura 3	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 2,5 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	43
Figura 4	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 5,0 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	43
Figura 5	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 7,5 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	44
Figura 6	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 10,0 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	44

---

### Lista de tabelas

Tabela 1	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias sem adição de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	37
Tabela 2	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 2,5 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	38
Tabela 3	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 5,0 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	39
Tabela 4	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 7,5 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	40
Tabela 5	Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 10,0 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.....	41
Tabela 6	Médias dos resultados para ponto de congelamento, composição e contagem de células somáticas pelo método de referência e FTIR para diferentes tratamentos e tempos de armazenamento (h) e adições de água (%) .....	46

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

-m°H – mili graus Hortvet negativos  
°C – graus Celsius  
°H – graus Hortvet  
µm – micrómetro  
ANOVA – análise de variância  
CCS – contagem de células somáticas  
DHIA - Dairy Herd Improvement Association  
dL – decilitro  
DMS - Diferença Mínima Significativa  
DQCI - Dairy Quality Control Incorporated  
EST – estrato seco total  
FTIR - Transformada de Fourier no Infravermelho  
g - grama  
h – hora  
HgCl<sub>2</sub> - cloreto de mercúrio  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IC – intervalo de confiança  
IDF – International Dairy Federation  
ISO - International Organization for Standardization  
K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> - dicromato de potássio  
Kg – kilograma  
L – litro  
LabUFMG - Laboratório de Análise da Qualidade do Leite  
LANAGRO – Laboratórios Nacionais Agropecuários  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
mg – miligrama  
MG – Minas Gerais  
min – minutos  
mL – mililitro  
MQP – mínimos quadrados parciais  
N° - número  
NaCl – cloreto de sódio  
NUL – nitrogênio ureico no leite  
pH – potencial hidrogeniônico  
PNQL - Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite  
PVP – polivinilpirrolidona  
RBQL - Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite  
RIISPOA – Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal  
rpm – rotações por minuto  
SNG – sólidos não gordurosos  
ST – sólidos totais  
UF – Unidade Federativa  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## RESUMO

Foram analisadas 480 amostras de leite em quatro repetições com relação a quatro tratamentos por conservantes (sem conservante, Bronopol, Bronolat e Brononata), três tempos de armazenamento em temperatura até 4 °C desde a recepção da amostra (24, 48 e 72 horas), cinco porcentagens de adição de água (0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0%) e dois instrumentos analíticos (crioscópio eletrônico e FTIR). O objetivo foi avaliar o efeito destes parâmetros na determinação do índice crioscópico pelo método de precisão em crioscópio eletrônico e por espectroscopia com transformada de Fourier no Infravermelho, determinando assim as melhores condições analíticas. Entre os conservantes utilizados, Bronolat foi o melhor e Brononata foi o menos eficiente, não sendo, portanto, recomendado para análise de crioscopia por FTIR. O tempo de armazenamento das amostras não interferiu nas determinações analíticas pelo método de precisão e por FTIR.

Palavras-Chave: ponto de congelamento, leite cru, Bronopol, Bronolat, Brononata, crioscópio eletrônico, FTIR, tempo de armazenamento.

## ABSTRACT

*A total of 480 milk samples were analyzed in four repetitions with four preservative treatments (no preservative, Bronopol, Bronolat and Brononata), three storage times at temperatures up to 4 °C (24, 48 and 72 hours after reception), five different water additions (0.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0%) and two analytical instruments (electronic cryoscope and FTIR). The objective of this study was to evaluate the effect of these parameters in the determination of the freezing point by the reference method and by Fourier transform infrared spectroscopy, thus determining the best analytical conditions and establishing a mathematical equation for electronic determination by FTIR spectroscopy. Bronolat was the best preservative and Brononata was the worst and it is not recommended to analyze freezing point by FTIR. The storage time of the samples did not interfere in the analytical determinations by the precision method and by FTIR.*

*Keywords: freezing point, raw milk, Bronopol, Bronolat, Brononata, electronic cryoscope, FTIR, storage time*

## INTRODUÇÃO

O leite é um produto importante no mercado nacional e muito apreciado pelos consumidores, sendo por isso, muito relevante economicamente para produtores e indústrias. Algumas vezes, o acréscimo de substâncias estranhas ao leite é empregado, caracterizando fraude, como forma de dissimular características indesejáveis visando melhorar a aceitação do produto ou aumentar o volume e teores de constituintes sólidos com o intuito de obter vantagens financeiras. A adição de água e de solutos reconstituintes de parâmetros de qualidade do leite submetidos a análises oficiais são exemplos de fraudes que ocorrem principalmente para aumentar o volume (Rezende, Carmo e Esteves, 2015).

Para identificação de possível adição de água ao leite são utilizados os parâmetros densidade e ponto de congelamento, também conhecido como índice crioscópico do leite (Brasil, 2018d). O ponto de congelamento é um importante indicador de qualidade do leite utilizado como prova de precisão por órgãos oficiais e no controle de qualidade pelas indústrias com o intuito de detectar a adição fraudulenta de água ao leite ou por ineficiência na operação dos sistemas de ordenha e para determinar a quantidade de água adicionada (Araújo *et al.* 2011; Zagorska e Ciprovica, 2013).

O método oficial para a aferição do ponto de congelamento é definido pelo Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (2018), assim estabelecido pela Instrução Normativa Nº 30 (Brasil, 2018a). Este método consiste no super congelamento de uma amostra de leite a uma temperatura apropriada, enquanto é aplicada agitação mecânica que ocasiona um rápido aumento da temperatura até um patamar, correspondente ao ponto de congelamento da amostra.

No entanto, os laboratórios de análises oficiais de qualidade do leite utilizam métodos alternativos, previamente validados, por dependerem de instrumentos que possam suportar grande número de amostras, sejam automáticos e proporcionem determinações mais rápidas e eficientes a baixo custo. Estas ferramentas para determinação da composição do leite incluem analisadores de infravermelho médio que usam tecnologia FTIR (Infravermelho com Transformada de Fourier) (Sánchez *et al.* 2007). Devido a essas características peculiares, deve ser adicionado às amostras de leite, um comprimido de conservante específico para esta finalidade, de forma a evitar a deterioração do produto durante o transporte e armazenamento em câmara fria, que poderia afetar o resultado da análise.

Desta forma, a comparação das leituras pelos métodos de precisão (crioscopia) e por espectroscopia com Transformada de Fourier pode gerar curvas que permitam a leitura de grande quantidade de

amostras nos equipamentos eletrônicos, permitindo com maior segurança a identificação de leite anormal. É necessário, no entanto, definir as melhores condições analíticas, incluindo tipo de conservante e tempo transcorrido para a análise, para que sejam obtidos resultados seguros. Trata-se, portanto, de uma importante contribuição como método de triagem à detecção deste tipo de fraude, que leva à redução do valor nutricional do leite, à inserção de substâncias potencialmente perigosas para a saúde e prejuízo financeiro ao consumidor (Rezende, Carmo e Esteves, 2015).

## **OBJETIVOS**

- Avaliar o efeito de três conservantes, do tempo transcorrido para a análise e da adição de água na determinação do ponto de congelamento do leite pelo método de precisão em crioscópio eletrônico e por espectroscopia com transformada de Fourier no Infravermelho.
- Determinar as melhores condições analíticas (conservante e tempo transcorrido para a análise) para uso do equipamento eletrônico para determinação do ponto de congelamento do leite.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 PRODUÇÃO DE LEITE**

Os dados mais recentes de produção anual de leite são de 2018, quando os laticínios que atuavam sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária captaram 24,45 bilhões de litros em todo o território nacional. Esse montante representa um acréscimo de 0,5 % sobre a quantidade registrada em 2017, mantendo certa estabilidade em relação ao ano anterior, quando a produção voltou a subir depois de dois anos seguidos de queda na série histórica anual da aquisição de leite.

Comparado ao ano anterior, houve incremento de 116,60 milhões de litros de leite, em nível nacional, relacionado ao aumento no volume captado em 16 das 26 Unidades da Federação (UFs) participantes da Pesquisa Trimestral do Leite feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Os estados com aumento de produção mais consideráveis foram o Paraná (156,94 milhões de litros), Minas Gerais (82,17 milhões de litros), Bahia (66,95 milhões de litros) e Goiás (58,89 milhões de litros). Em contrapartida, ocorreram quedas em 10 estados, sendo a mais expressiva em São Paulo (144,84 milhões de litros). Minas Gerais manteve a liderança no ranking

das UFs, com 24,8% de participação nacional, seguida por Rio Grande do Sul (13,9%) e Paraná (12,6%).

Em 2018, a maior parte do leite foi captada por estabelecimentos de grande porte, que representam uma pequena parcela do total de laticínios existentes no país. Estabelecimentos que captaram mais de 50 mil litros de leite por dia (13,8% do total de estabelecimentos) foram responsáveis por 83,9% do volume de leite cru captado no ano (IBGE, 2019).

### **3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE**

O Decreto Nº 9.013 de 29 de março de 2017 define leite como o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017). O leite é um dos alimentos mais completos da natureza, com alto valor nutritivo e propriedades físico-químicas, sensoriais e microbiológicas características (Ribeiro *et al.* 2018), sendo o único alimento fonte de lactose, além de possuir proteína de alta qualidade e ser uma excelente fonte de cálcio (Upadhyay *et al.* 2014).

Em relação a sua composição, o leite é uma combinação de diversos elementos sólidos em água, principalmente de lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. Os sólidos totais (ST) ou extrato seco total (EST) engloba todos os componentes do leite com exceção da água, enquanto os sólidos não gordurosos (SNG) compreendem todos os componentes do leite, menos a água e a gordura (Ribeiro, 2017). A composição média do leite é de 87,3% de água, 4,6% de lactose, 3,25% de proteína, 3,9% de gordura, 12,7% de sólidos totais e 8,8% de sólidos não gordurosos (Ribeiro *et al.* 2018).

O leite cru deve apresentar a composição original, e a retirada de componentes, ou adição de água, conservantes, contaminantes ou qualquer outra substância ao leite cru é ilegal. As consequências das fraudes são enganar o consumidor, colocar em risco a saúde pública, promover concorrência ilegal e deslealdade comercial. O conhecimento dos componentes e características do leite são a base para testes que são projetados para investigar a composição do leite modificado, uma vez que os componentes do leite permanecem em equilíbrio. Uma redução substancial da concentração de lactose ou dos sólidos totais poderia, por exemplo, levantar suspeitas de adição fraudulenta de água ao leite (Ribeiro, 2017; Ribeiro *et al.* 2018).

No entanto, sabe-se que a composição do leite pode variar devido a fatores naturais como raça das vacas, estágio de lactação, alimentação, temperatura, ambiente, ocorrência de mastite, assim como fatores de manejo, como intervalo entre as ordenhas, momento da ordenha e ordem de parição. Por isso, o Decreto Nº 9.013 (2017) e a Instrução Normativa Nº 76 (2018), em consonância, estabelecem os seguintes valores mínimos para os parâmetros físico-químicos: teor mínimo de gordura de 3,0g/100g (três gramas por cem gramas); teor mínimo de proteína total de 2,9g/100g (dois inteiros e nove décimos de gramas por cem gramas); teor mínimo de lactose anidra de 4,3g/100g (quatro inteiros e três décimos de gramas por cem gramas); teor mínimo de sólidos não gordurosos de 8,4g/100g (oito inteiros e quatro décimos de gramas por cem gramas); teor mínimo de sólidos totais de 11,4g/100g (onze inteiros e quatro décimos de gramas por cem gramas) (Brasil, 2017; Brasil, 2018b).

### **3.3 PONTO DE CONGELAMENTO DO LEITE**

O ponto de congelamento, também chamado de índice crioscópico, do leite é determinado pela osmolalidade do leite, isto é, a concentração de constituintes solúveis em água. A soma de lactose, cloretos, citrato e ácido láctico são responsáveis por 79 a 86 % do total do ponto de congelamento do leite, sendo a lactose e cloretos responsáveis por 55 e 25 %, respectivamente. As atribuições remanescentes vêm de outros constituintes solúveis, como sódio, cálcio, potássio, magnésio, fosfato, caseína e ureia (Bjerg, Rasmussen, Nielsen, 2005). O ponto de congelamento do leite é sua propriedade física mais constante, uma vez que o processo secretório da glândula mamária mantém a pressão osmótica entre o sangue e o leite em equilíbrio. Assim, com qualquer diminuição na síntese de lactose, há um aumento compensatório nas concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Embora denominada constante física, o ponto de congelamento do leite íntegro varia dentro de limites estreitos, e a grande maioria das amostras individuais de vacas fica entre  $-0,525\text{ }^{\circ}\text{H}$  e  $-0,565\text{ }^{\circ}\text{H}$  ( $-0,503\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-0,541\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), sendo a média muito próxima de  $-0,540\text{ }^{\circ}\text{H}$  ( $-0,517\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Bradley Jr., 2010).

Acredita-se que o ponto de congelamento do leite seja relativamente constante porque é uma propriedade coligativa e, por isso, depende diretamente do número de partículas dissolvidas. Quando ocorre o aumento das substâncias dissolvidas no leite, o ponto de congelamento pode diminuir, ou seja, se afastar de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por outro lado, se houver adição de água, haverá a diluição dos componentes solúveis do leite e o ponto de congelamento tenderá a se aproximar do ponto de congelamento da água pura, que é  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Duarte, 2018).

Portanto, além da adição de água, a composição química, as propriedades do leite e a presença de substâncias podem influenciar o ponto de congelamento do produto (Zagorska e Ciprovia, 2013). O acréscimo de alguns solutos, tais como cloreto de sódio, ureia, maltodextrina e citrato de sódio, dentre outros, são capazes de corrigir os valores de densidade e índice crioscópico, sendo utilizados para impedir a identificação da fraude (Rezende, Carmo e Esteves, 2015). Além disso, a refrigeração, mais próxima possível do ponto de congelamento, sem, no entanto, congelar o leite, durante os dias anteriores a análise de composição é essencial para a manutenção da integridade da amostra e do correto resultado para o ponto de congelamento. A refrigeração impede o crescimento de bactérias e todas as alterações químicas e físicas decorrentes desse crescimento, enquanto o não congelamento evita a formação de cristais de gelo que geralmente levam à ruptura de estruturas físicas no leite, dificultando a retirada de alíquotas representativas (Kroger, 1985).

Outros fatores além de adulterações causam variações no ponto de congelamento do leite de tanque ao longo de todo o ano. Entre eles, destacam-se as variações no ambiente, manejo, raça, mudanças na ordenha, métodos de limpeza, mastite, acidificação do leite, estágio de lactação e nutrição (Freeman, Kratzer e Bucy, 1972; Slaghuis, 2001; Bradley Jr., 2010). Dados do estudo feito por Bjerg, Rasmussen e Nielsen (2005) na Dinamarca mostram que os valores do ponto de congelamento são mais altos durante o verão e mais baixos durante o inverno. Os autores explicam essa diferença devido ao aumento da temperatura ambiente e do tempo de exposição ao sol durante o verão, levando as vacas a aumentarem a ingestão de água e elevando, conseqüentemente, o ponto de congelamento do leite, especialmente em situações que levam a restrição ao acesso à água. Isto explica o aumento do ponto de congelamento durante o verão em relação ao inverno. Outro ponto ressaltado pelos autores é que pela maior produção de leite, as vacas leiteiras têm maior requerimento de água (Bjerg, Rasmussen e Nielsen, 2005).

Henno *et al.* (2008) observaram variações no ponto de congelamento do leite entre quatro raças bovinas, em que a maior diferença foi de 0,0022 °C, assim como variações no volume de leite e no teor de proteínas. Os autores ressaltaram que a variação observada pode ser decorrente do teor de proteínas associado a fatores genéticos, pois esta, por sua vez, pode influenciar o teor de minerais no leite, de forma que a redução de 0,1% de proteína no leite pode acarretar em aumento de 0,0024 °C do ponto de congelamento. Neste mesmo estudo, Henno *et al.* (2008) observaram o efeito do estágio de lactação das vacas no ponto de congelamento do leite. O ponto de congelamento do leite aumentou do primeiro ao terceiro mês de lactação, seguidos de sua redução até o final deste

período, exceto por dois pequenos aumentos no sexto e oitavo mês. A maior diferença observada foi de 0,0032 °C do terceiro mês até o final da lactação.

Rasmussen *et al.* (2002) observaram o aumento do ponto de congelamento em torno de 0,007 °C após a implantação de sistema automático de ordenha. Este efeito foi explicado pelo aumento da frequência de limpeza do equipamento, uma vez que as vacas com mastite também são ordenhadas por ele. O procedimento de higienização pode deixar resíduos de água nos tubos, conexões e tanques, o que influencia o ponto de congelamento.

Destaca-se ainda que falhas de drenagem de equipamentos de ordenha, de tanques refrigeradores, de equipamentos de indústrias de laticínios (silos, tanques de estocagem de leite, de tubulações e de caminhões de coleta a granel) podem levar à incorporação de água no leite de forma acidental. A presença de furos nos pasteurizadores também pode ocorrer levando a alteração de forma acidental, necessitando estes aspectos, portanto, de monitoramento.

Outros estudos que tentaram determinar se os critérios legais já estabelecidos para a qualidade do leite ainda são apropriados indicaram que a média de ponto de congelamento variou ao longo dos anos (Schukken, Fulton e Leslie, 1992; Coveney, 1993; Slaghuis, 2001). Segundo os autores essa mudança está relacionada com a alteração da composição genética em ascensão à época devido a programas de cruzamento, assim como por mudanças nos métodos de produção de leite, ambos tendo alterado a composição do leite (Coveney, 1993; Slaghuis, 2001).

Henno *et al.* (2008) ressaltaram a importância da estimativa do ponto de congelamento do leite, mantendo um nível legal confiável para evitar que o leite adulterado chegue ao mercado. Os autores indicaram também a relevância do bom entendimento de fatores que afetam o ponto de congelamento do leite e a abrangência de sua influência para interpretação correta dos resultados. De forma semelhante, Glaeser (2003) propôs que o monitoramento oficial de leite para a adição de água deveria levar em conta a variação natural na composição de leite cru, assim como as decisões sobre a aceitação devem ser baseadas em procedimentos estatísticos e que a análise do ponto de congelamento por si só é inadequada, uma vez que o ponto de congelamento do leite cru varia.

### 3.4 MÉTODOS OFICIAIS PARA ANÁLISE DE ADIÇÃO DE ÁGUA EM LEITE

Fraudes por adição de água e reconstituintes de densidade podem ser detectadas por análises rotineiras de densidade, realizadas durante a recepção do leite cru. Porém, se o leite for fraudado com proporção de água e sólidos reconstituintes de forma que esteja dentro dos limites estabelecidos pela legislação, nem sempre é possível detectar a fraude utilizando métodos de rotina simples (Duarte, 2018). Portanto, como a densidade relativa do leite a 15 °C não é um teste muito preciso, uma vez que é influenciado por todos os principais componentes do leite (Beloti *et al.* 2015), outros métodos são necessários para a verificação da adição de água ao leite.

Quando a água é adicionada a um produto alimentício, muitas das constantes físicas são alteradas. Algumas propriedades de soluções dependem do número de partículas de soluto como íons ou moléculas presentes. Essas propriedades são pressão de vapor, ponto de congelamento, ponto de ebulição e pressão osmótica. A medição de qualquer uma dessas propriedades pode ser usada para determinar a concentração de solutos em uma solução. No entanto, o ensaio mais comumente praticado para o leite é a alteração do valor do ponto de congelamento (Bradley Jr., 2010).

O método oficial para a aferição do ponto de congelamento é definido pelo Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (2018) que consiste no super congelamento de uma amostra de leite a uma temperatura apropriada e aplicação de uma agitação mecânica que ocasiona um rápido aumento da temperatura até um patamar o qual corresponde ao ponto de congelamento da amostra. Atualmente, no Brasil, os valores estabelecidos para o índice crioscópico do leite cru são -0,530 °H (quinhentos e trinta milésimos de grau Hortvet negativos) a -0,555 °H (quinhentos e cinquenta e cinco milésimos de grau Hortvet negativos), que são equivalentes a -0,512 °C (quinhentos e doze milésimos de graus Celsius negativos) a -0,536 °C (quinhentos e trinta e seis milésimos de graus Celsius negativos) (Brasil, 2017).

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), publicado e regulamentado em 1952 pelo Decreto Nº 30.691 (Brasil, 1952), estabelecia a prova do índice refratométrico do soro cúprico a 20 °C, como outra prova de precisão para a determinação de possível adição de água ao leite. Em 2017, após 65 anos de publicação do RIISPOA, o Decreto Nº 9013, no entanto, retirou a prova do índice refratométrico da relação dos parâmetros a serem utilizados para considerar o leite normal ou anormal.

### **3.5 REDE BRASILEIRA DE LABORATÓRIOS DE CONTROLE DA QUALIDADE DO LEITE**

Em abril de 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa Nº 37 (BRASIL, 2002), instituiu a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), com o objetivo de realizar análises laboratoriais para a fiscalização de amostras de leite cru, coletadas em propriedades rurais e em estabelecimentos de laticínios para responder à crescente demanda por análises (Silveira *et al.* 2004; Leite, 2006). A RBQL é o conjunto de laboratórios distribuídos em áreas geográficas de abrangência estratégica, com a finalidade precípua de monitorizar e, dessa forma, contribuir para o aperfeiçoamento da qualidade do leite, em consonância com os objetivos do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) (Brasil, 2018c)

A granelização do leite e a implantação de programas de pagamento do leite pela qualidade demandaram a introdução de técnicas rápidas e modernas de análises, uma vez que as metodologias de análises de referência são laboriosas, caras e exigem tempo para serem executadas, não sendo mais recomendadas para o acompanhamento da qualidade do leite de rebanhos com grande número de animais. Por isso, os laboratórios da RBQL são configurados com modernos equipamentos eletrônicos para análise rápida, com custo relativamente baixo e precisa, para fornecer informações sobre a qualidade do leite em tempo adequado, facilitando o controle leiteiro e a avaliação da qualidade do leite. Equipamentos de infravermelho médio, por exemplo, expandiram a capacidade analítica para análise composicional, enquanto os citômetros de fluxo foram usados para contagem de células somáticas e bacterianas em leite cru (Silveira *et al.* 2004; Ribeiro *et al.* 2018).

O leite cru refrigerado, estocado nos tanques de refrigeração individual ou de uso comunitário, bem como o leite recebido em latões devem ser coletados para análise em laboratório da RBQL, com frequência mínima de uma amostra mensal, para avaliação dos seguintes parâmetros: teores de gordura; de proteína total; de lactose anidra; de sólidos não gordurosos; de sólidos totais; contagem de células somáticas; contagem padrão em placas; e detecção de resíduos de produtos de uso veterinário, como antimicrobianos (Brasil, 2018c).

A logística de coleta, envio aos laboratórios oficiais e a análise laboratorial propriamente dita das amostras de leite, consistem em várias etapas, sendo que as amostras devem chegar aos laboratórios com temperatura inferior a 10 °C e serem analisadas no prazo de sete dias após a coleta. Inicialmente, as amostras são coletadas, em geral, pelos transportadores de leite cru refrigerado na

propriedade rural. Logo após, as mesmas são acondicionadas em frascos próprios, adicionadas de conservantes e mantidas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável durante o transporte até a indústria. Após chegar à indústria processadora do leite, as amostras são enviadas por empresas transportadoras ou pelo correio a um dos laboratórios pertencentes à RBQL. Eventualmente, ocorrem atrasos no envio das amostras, prejudicando a temperatura ideal das amostras no momento da recepção no laboratório, assim como o tempo estabelecido para se efetuar as análises. Finalmente, no laboratório, as amostras precisam ser analisadas com rapidez e precisão, fornecendo resultados que retratem a qualidade do leite no momento de sua coleta na fazenda produtora (Leite, 2006).

### **3.6 ESPECTROSCOPIA COM TRANSFORMADA DE FOURIER NO INFRAVERMELHO**

Os processos tecnológicos utilizados na indústria de laticínios tiveram um progresso muito importante devido ao maior interesse pelo controle das matérias-primas, processos e produtos acabados. Isto ocorreu por causa da demanda pela melhor qualidade dos produtos por parte dos consumidores, à disponibilidade de laboratórios de controle nas fábricas e às legislações as quais os produtos comercializados têm que ser ajustados. Os métodos tradicionais de análise dos principais componentes, como gordura, proteína e ainda, umidade, são lentos e caros e precisam de pessoal altamente qualificado, não sendo suficientemente eficazes para cobrir a crescente demanda e os baixos custos que a indústria precisa. Com o grande desenvolvimento da indústria alimentícia, é necessário realizar um grande número de análises, tanto da matéria-prima quanto dos produtos elaborados. Para atender a essa solicitação, várias técnicas analíticas instrumentais foram desenvolvidas (Rodriguez-Otero, Hermida e Centeno, 1997).

A espectroscopia de infravermelho médio é uma destas novas tecnologias, que apresenta, como grandes vantagens, a determinação simultânea de gordura, proteína e lactose em uma única amostra sem tratamento prévio, a rapidez (até 400 amostras/hora), a ausência de reagentes químicos e a total automação do processo (Rodriguez-Otero, Hermida e Centeno, 1997). Tal metodologia apresenta grandes vantagens em relação às metodologias de referência: rapidez, 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 (Oliveira, 2011). Silveira *et*

*al.* (2004) relataram que os resultados obtidos na análise eletrônica da composição de leite não foram diferentes daqueles feitos por métodos de referência. Assim, a análise eletrônica pode ser utilizada com segurança na avaliação da composição do leite bovino.

Esses instrumentos requerem calibração a partir de leites que possuem valores de referência conhecidos para gordura (extração de éter Mojonnier), proteína (nitrogênio total) e lactose (enzimática espectrofotométrica) conforme determinado por métodos químicos de referência (Kaylegian *et al.* 2006). Atualmente, duas abordagens são usadas para o infravermelho médio na análise do leite: uma abordagem usa pares (referência e amostra) de comprimentos de onda bem definidos para medir cada componente e a outra abordagem usa mínimos quadrados parciais (MQP), baseados em modelos de previsão que não usam pares fixos de comprimentos de onda, mas sim uma série de coeficientes de regressão MQP juntamente a um número maior de diferentes comprimentos de onda na faixa de 3 a 10  $\mu\text{m}$  (Kaylegian *et al.* 2009). Os modelos de calibração baseados em MQP diferem entre os fabricantes de instrumentos e podem diferir de um modelo de instrumento para outro pelo mesmo fabricante. Geralmente, os comprimentos de onda usados nos modelos de predição MQP e os coeficientes de regressão fornecidos por um fabricante de instrumentos para as análises de rotina do leite, são considerados informações proprietárias (Barbano, Wojciechowski e Lynch, 2010). Silveira *et al.* (2004) demonstraram que as amostras-padrão de origem americana e canadense apresentaram composição adequada para a calibração dos equipamentos de infravermelho.

A primeira geração de analisadores de infravermelho médio de leite requeria filtros de interferência óptica, que são feitos de camadas de cristais minerais selecionados para permitir a transmissão dos comprimentos de onda da luz desejados. Os comprimentos de onda de referência são posicionados na mesma faixa dos comprimentos de onda da amostra para cada componente. Os filtros de interferência usados nos analisadores de infravermelho médio de leite são discos circulares montados em uma roda de filtro que move cada filtro sequencialmente para o caminho da luz e permite que uma faixa de comprimentos de onda de luz passe através da amostra. Variações nas características de transmissão dos filtros ópticos entre os instrumentos podem causar variações na predição dos componentes do leite de um instrumento para o outro para os filtros de gordura A e gordura B. A variação das características do filtro óptico (isto é, comprimentos de onda do centro e larguras de banda) é a base para algumas das variações dos fatores de inter-correção de um instrumento para outro do mesmo modelo. Por sua vez, a segunda geração de analisadores de infravermelho médio de leite são os instrumentos com transformada de Fourier. Em um analisador

de leite de infravermelho médio com transformada de Fourier, todo o espectro de luz passa por um divisor de feixe, cada parte do feixe de luz passa através de um respectivo espelho, através da amostra e para o detector. As diferenças nas intensidades de luz no detector que resulta da diferença no caminho entre os dois feixes são usadas para criar um interferograma, que é então convertido em um espectro de infravermelho médio usando matemática de transformada de Fourier. O instrumento de infravermelho médio por transformada de Fourier produz um espectro completo, com subtração de absorção de água de fundo, para cada amostra. Os dados desse espectro podem ser usados de diferentes maneiras para a análise do leite (Kaylegian *et al.* 2009).

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, nas quais existem 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. Geralmente, as transições vibracionais estão relacionadas com a região do Infravermelho (Oliveira, 2011).

O princípio fundamental de todos os analisadores de infravermelho de leite baseia-se 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. A região de infravermelho é a faixa que varia de 0,78  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$  do espectro infravermelho. Essa faixa é dividida em três regiões, de acordo com o comprimento de onda: o infravermelho próximo que abrange a faixa de 0,7 $\mu\text{m}$  a 2,5 $\mu\text{m}$ , o infravermelho médio que compreende a região de 2,5 $\mu\text{m}$  a 25 $\mu\text{m}$  e o infravermelho distante que varia de 25 $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$  (Oliveira, 2011). De acordo com a lei de Beer-Lambert, a porcentagem de cada constituinte é relacionada com a quantidade de energia absorvida. Ela estabelece que a absorvância da luz por uma solução, numa determinada espessura, é diretamente proporcional à concentração de um componente (Silveira *et al.* 2004). Os comprimentos de onda convencionais são baseados na absorção de infravermelho em 5,73  $\mu\text{m}$ , 6,46  $\mu\text{m}$  e 9,60  $\mu\text{m}$  para gordura, proteína e lactose, respectivamente. Os grupos químicos absorventes específicos são carbonila ( $> \text{C}=\text{O}$ ) das ligações éster dos triglicerídeos, amida (-CONH) das ligações peptídicas das proteínas e hidroxila (-OH) da lactose. 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 4,3 $\mu$ m dos grupos hidroxila das moléculas de água. Os aparelhos também podem ser obtidos com o comprimento de onda (3,4 -3,5  $\mu$ m) para determinação de gordura, usualmente chamado de filtro B. Entre as 3,4 e as 3,5  $\mu$ m, a absorção é baseada na ligação carbono-hidrogênio (C-H). Com isso espera-se teoricamente que a determinação seja menos dependente das variações no peso molecular da gordura do leite, devido à proporcionalidade entre o número de ligações C-H e peso molecular (Sjaunja, 1984; Biggs *et al.* 1987; Oliveira, 2011).

Os equipamentos de infravermelho não são capazes de fazer a leitura direta do ponto de congelamento do leite, porém, são capazes de calculá-los a partir dos componentes que contribuem para esse parâmetro. As concentrações de gordura, proteína e lactose podem ser medidas por meio de infravermelho, mas os sais e ácidos dissolvidos não podem ser determinados dessa forma. Então é utilizada a condutividade elétrica para determinar principalmente os sais, levando em consideração que os outros componentes e a água também influenciam nessa medida. Combinando-se a condutividade com os teores de gordura, proteína e lactose, é possível calcular a contribuição de cada componente para o ponto de congelamento do leite. Utilizando-se a Regressão Linear Múltipla entre o ponto de congelamento, que é a variável dependente, e os conteúdos de gordura, proteína e lactose em conjunto com a condutividade, que são as variáveis independentes, é possível calcular coeficientes que atuam no ponto de congelamento (Arnvidarson *et al.* 1998; Duarte, 2018).

Uma causa de variação no resultado quando as amostras são submetidas a analisadores de infravermelho médio que usam tecnologia FTIR pode estar relacionada ao tipo de conservante empregado. Os conservantes são utilizados, com ou sem refrigeração, nas amostras de leite para evitar a deterioração dos componentes do leite (Chalermisan *et al.* 2004). Quando o ponto de congelamento é obtido por meio destes equipamentos, utilizam-se conservantes, o que reduz os valores do ponto de congelamento. Segundo Shipe (1959), essa redução pode ser explicada por alterações na osmolaridade do leite atribuídas ao aumento dos constituintes hidrossolúveis das amostras. Como conservantes são amplamente utilizados para a preparação de amostras de leite em laboratórios oficiais de análise da qualidade do leite, os efeitos de suas diferentes concentrações no ponto de congelamento devem ser levados em conta quando for verificada possível adição de água ao leite. Neste sentido, o uso de conservantes pressupõe a adição de solutos ao leite. Desta forma, seus efeitos sobre o ponto de congelamento do leite devem ser considerados durante a interpretação dos resultados (Sánchez *et al.* 2007; Araújo *et al.* 2011).

### 3.7 CONSERVANTES DAS AMOSTRAS DE LEITE

O problema da preservação de amostras de leite é comum em muitos países porque os laboratórios de diagnóstico estão geralmente distantes das comunidades de produtores de leite, e o transporte das amostras para o laboratório de análises é inadequado. Estes problemas são agravados pela necessidade de instalações para manter o leite frio, a fim de minimizar a proliferação bacteriana e a deterioração da amostra antes da análise. Quando a refrigeração da amostra não é possível ou viável, deve-se recorrer à conservação química (Kroger, 1985). Como o leite e os produtos lácteos são muito perecíveis e se deterioram rapidamente devido ao alto teor de umidade, os conservantes químicos são adicionados às amostras de leite para que a composição não mude até a análise (Sešĕna e Jankevica, 2007; Upadhyay *et al.* 2014).

Conservantes podem influenciar a resposta das amostras submetidas a instrumentos infravermelhos, assim como o resultado das análises. Os efeitos podem variar para componentes diferentes e configurações do instrumento. Portanto, é importante que esses efeitos sejam analisados antes de implementar qualquer prática de conservação de amostras em um esquema de calibração (Zajác *et al.* 2016). Outros fatores como idade da amostra e condições de transporte podem interferir na avaliação da qualidade. Por exemplo, amostras de leite conservadas com o Bronopol, geralmente podem ser mantidas por dez dias a temperaturas de até 10 °C (Leite, 2006). Chalermnan *et al.* (2004) relataram que na Tailândia, dependendo da distância e da carga de trabalho do laboratório, o leite cru com conservante pode ser armazenado por uma ou duas semanas até a análise.

Por isso, o requisito mínimo para um conservante químico de amostra de leite adequado é que ele deve assegurar a "estabilidade da amostra". Isto significa que a amostra de leite deve manter a sua composição original desde o momento da ordenha até o momento da análise e que a substância não afete o resultado do teste (Kroger, 1985). Segundo Kroger (1985) outros requisitos são:

- a) atividade de amplo espectro: a habilidade do conservante em agir contra micro-organismos no leite. Quanto maior o espectro, melhor a utilidade. Deve ser eficaz contra todos os tipos de micro-organismos que ocorrem no leite;
- b) concentração inibitória mínima eficiente: o conservante deve ser eficaz em baixas concentrações no leite para minimizar a diluição da amostra, minimizar os custos e agilizar os procedimentos de manuseio;
- c) alta solubilidade em água: como a amostra de leite tem em média cerca de 87 % de água, é imperativo que o conservante tenha a capacidade de funcionar onde os micro-organismos

estão, na fase aquosa. A alta solubilidade em água também asseguraria fácil dissolução sem agitação excessiva;

- d) estabilidade: o conservante deve ser estável na maioria das condições de armazenamento;
- e) presença de cor: ao contrário dos conservantes para cosméticos, uma qualidade desejável de um conservante de leite é que ele confira alguma cor à amostra de leite tratada para fins de identificação e segurança;
- f) compatibilidade: um bom conservante de leite deve ser tão eficaz em um *pool* de amostras de leite quanto em amostras individuais de vacas ou outros mamíferos e ser adequado para amostras de leite com alto teor de gordura e baixo teor de gordura;
- g) atividade de vida de prateleira: um conservante de leite adequado deve ser eficaz por um período razoavelmente longo; cerca de 90% das amostras da Dairy Herd Improvement Association (DHIA) são testadas no prazo de três dias;
- h) toxicidade e descartabilidade: o conservante deve ser não alergênico e não ser tóxico para manipuladores ou outros que entrem em contato com ele. Apesar de sua propriedade biocida necessária, não deve se tornar um risco ambiental após o descarte;
- i) economia: o custo deve ser mínimo e o conservante deve estar prontamente disponível;
- j) capacidade de distribuição: dispensar em forma sólida, como em comprimidos, seria preferível à forma líquida, devido à dificuldade inerente no manuseio de líquidos e à maior precisão na distribuição de sólidos.

Nenhum conservante comercial para testes de leite atende a todos os requisitos mencionados anteriormente (Barbano, Wojciechowski e Lynch, 2010). Historicamente, o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) foi amplamente utilizado para preservar leite de conjunto mantido à temperatura ambiente por 15 dias. Enquanto o  $\text{HgCl}_2$  impediu o crescimento microbiano, foram obtidos teores de gordura mais baixos em amostras de leite com aumento do tempo de armazenamento, devido à hidrólise lipolítica causada pela lipase do leite. Embora os conservantes químicos inibam o crescimento microbiano, eles não inibem a atividade das enzimas do leite. Como o  $\text{HgCl}_2$  é corrosivo e altamente tóxico, o uso de  $\text{HgCl}_2$  foi descontinuado no final da década de 1960. Como resultado, o interesse em encontrar conservantes alternativos para uso em testes de leite aumentou (Kroger, 1985; Barbano, Wojciechowski e Lynch, 2010). O cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) foi aprovado nos EUA como conservante de amostras de leite cru e frequentemente vendido em comprimidos com outros agentes oxidantes misturados. No final da década de 1960, o uso de  $\text{HgCl}_2$  como conservante de leite foi descontinuado devido à percepção de riscos ambientais após seu descarte. Além disso, sua toxicidade relativamente alta (dose letal mediana = 37 mg / kg, por via oral em ratos), torna o

HgCl<sub>2</sub> um risco ocupacional. Além disso, sua corrosividade contribui para o desgaste dos materiais nos laboratórios que realizam a análise instrumental.

Após a proibição do HgCl<sub>2</sub>, o dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) foi adotado como conservante de amostras de leite. A substância tem um grande número de usos industriais, como couro curtido, tingimento, estamperia, decoração de porcelana, impressões de pigmentos, pirotecnia, fósforos de segurança, branqueamento de óleos de palma e como oxidante de produtos químicos orgânicos. Farmaceuticamente é utilizado principalmente como agente oxidante. Uma análise de vários conservantes mostrou que K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (0,1 %) e HgCl<sub>2</sub> (0,1 %) foram os melhores produtos químicos para estabilizar as medidas de densidade e porcentagem de gordura em amostras de leite analisadas por até 4 meses. O K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> funciona bem como conservante de leite, mas é um conhecido irritante da pele, pode causar dermatite alérgica e é um biocida, com potencial para causar problemas de esgoto e níveis elevados de cromo na água potável. O dicromato é tóxico (também é carcinogênico e um oxidante) para os seres humanos e é considerado um veneno corrosivo. O dicromato de potássio aparece como vermelho-alaranjado brilhante devido à formação do íon dicromato (Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>=</sup>). Não é higroscópico ou deliquescente (comparado ao dicromato de sódio) (Kroger, 1985). Um possível substituto para o K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> é a azida sódica, também tóxica, mas baixos resultados de testes foram relatados ao medir gordura e proteína com um Foss MilkoScan. Os baixos resultados foram atribuídos a NaCl (200 mg/comprimido) que foi utilizado como carga nas pastilhas conservantes. O problema causado pelo NaCl nos tabletes conservantes aumentou a consciência de que outros ingredientes em um comprimido conservante podem ter um efeito nos resultados do teste. A principal razão pela qual a azida sódica não era comumente usada como conservante de leite na América do Norte era a possibilidade de explosões espontâneas causadas pela azida sódica reagindo com metais em tubulações de sistemas residuais em prédios de laboratórios e sistemas de esgoto (Kroger, 1985; Barbano, Wojciechowski e Lynch, 2010).

Por causa das questões ambientais e de segurança dos trabalhadores com os primeiros conservantes, o Bronopol (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>BrNO<sub>4</sub>; 2-bromo-2-nitro-1, 3-propanodiol) foi escolhido como uma possível alternativa. Várias formulações de conservantes à base de Bronopol são comumente usadas em testes de leite. Bronopol é usado em baixas concentrações como conservante em alguns produtos cosméticos, porque não causa reações cutâneas em humanos. Isso faz do Bronopol uma escolha melhor do que o K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> do ponto de vista de saúde e segurança do trabalhador. Quando adicionado ao leite, o Bronopol puro, ao contrário do HgCl<sub>2</sub> e do K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, não produz alterações na cor. No entanto, seu custo atual é maior entre os preservativos de amostra de leite adequados. Não

se pode determinar visualmente se um leite foi conservado quando somente o Bronopol é usado e, portanto, no mínimo, é necessário um aditivo de cor. Devido à necessidade de encontrar um conservante de leite ambientalmente e ocupacionalmente aceitável, tornou-se comum nos anos 80, usar o Bronopol como conservante de leite. Muitos conservantes de leite comerciais contêm outros ingredientes além do agente antimicrobiano ativo, e esses outros ingredientes podem ter um efeito na análise do leite de infravermelho médio, embora o próprio agente antimicrobiano ativo tenha pouco ou nenhum efeito (Kroger, 1985; Barbano, Wojciechowski e Lynch, 2010).

Idealmente, os materiais adicionados a uma amostra de leite não devem absorver luz na região do espectro infravermelho (3 a 10  $\mu\text{m}$ ) onde os componentes do leite estão sendo medidos. O dicromato de potássio é muito bom a este respeito porque não absorve luz no intervalo de 3 a 10  $\mu\text{m}$ . A azida sódica absorve fortemente a luz infravermelha a 4,67  $\mu\text{m}$  (uma área dos espectros não usada tipicamente na análise do leite à base de filtro infravermelho médio) e fracamente a 7,64  $\mu\text{m}$  (na região onde a lactose é medida). Bronopol tem dois grupos  $\text{CH}_2$  em sua estrutura e, portanto, absorve luz nos comprimentos de onda do estiramento  $\text{CH}$  onde a medição de gordura B é feita, além da absorvância nos comprimentos de onda onde a proteína e a lactose são medidas. Felizmente, a concentração de Bronopol que é usada para preservar o leite é baixa (isto é, 0,01 a 0,02 %), portanto, a intensidade da absorvância é pequena, mas a concentração pode afetar os resultados da análise do leite pelo equipamento infravermelho. A natamicina é usada em uma concentração ainda mais baixa (0,0075 %) do que o Bronopol, mas devido à sua estrutura grande e complexa, a natamicina absorve luz nas regiões dos espectros nas quais a gordura B, proteína e gordura A são medidas (Barbano, Wojciechowski e Lynch, 2010).

Portanto, avaliar diferentes conservantes para análise de leite e particularmente seu efeito na determinação do ponto de congelamento do leite é imprescindível para garantir que os resultados analíticos obtidos por espectroscopia com transformada de Fourier sejam corretos e robustos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CONSERVANTES E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Três conservantes a base de Bronopol (2-bromo-2-nitro-1, 3-propanodiol) com os seguintes nomes comerciais, Bronopol, Bronolat e Brononata, foram utilizados neste trabalho. Os conservantes foram fornecidos pela Embalpharma (Pescaria Brava, Santa Catarina – Brasil), assim como seus respectivos frascos e os frascos vazios utilizados para o tratamento “sem conservante”. Os frascos suportam o volume de 40 mL de forma a manter a devida proporção de soluto (conservante) e solvente (leite) recomendada pela empresa.

A composição descrita nas fichas técnicas de cada um dos conservantes é a seguinte: **Bronopol:** Bronopol (8 mg), Natamicina (0,30 mg), excipiente inerte na pastilha (10 mg); **Bronolat:** Bronopol (8 mg), Natamicina (0,4 mg), corante amarelo crepúsculo (0,5 mg) e **Brononata:** Bronopol (quantidade não especificada), Natamicina (12,5 %), corante amarelo crepúsculo (20,67 %), NaCl (quantidade não especificada) e solução PVP (quantidade não especificada).

Para cada repetição, foram utilizados 30 frascos sem qualquer conservante, 30 frascos contendo Bronopol, 30 frascos contendo Bronolat e 30 frascos contendo Brononata. De cada um destes 30 frascos, 15 eram identificados com as etiquetas impressas com códigos de barra para a inserção no sistema informatizado, contendo informações quanto ao tratamento por conservante, por adição de água, por tempo de armazenamento e por qual metodologia seria analisada e outras 15 identificadas por etiquetas escritas manualmente com a identificação quanto ao tratamento por conservante, por adição de água, pelo tempo de armazenamento e por qual metodologia seria analisada.

### 4.2 COLETA DO LEITE

O leite utilizado nas quatro repetições deste trabalho foi coletado em tanques refrigeradores de propriedades rurais de Minas Gerais no período de setembro a novembro de 2018 e mantido sob refrigeração até a entrega no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG), tentando manter mais próximo possível de uma coleta real de leite para análise oficial.

A coleta foi realizada segundo a Norma IDF 50C:1995 (IDF, 1995) e, após a homogeneização do leite no tanque refrigerador, cinco litros foram acondicionados em um recipiente mantido em caixa de isopor com gelo reciclável até o momento da entrega no LabUFMG, para cada repetição.

### **4.3 RECEPÇÃO DO LEITE E PREPARO DAS AMOSTRAS**

O leite foi recebido na sala de recepção de amostras e imediatamente armazenado na câmara-fria (4°C) até o momento de sua homogeneização e sempre que não fora manipulado. Para a homogeneização dos 5 litros de leite foi utilizado um tonel de plástico com torneira e um agitador mecânico (Fisatom 715) na potência de 500 rotações por minuto durante 10 minutos. Uma amostra de 20 mL foi retirada para o teste de acidez por titulação (Brasil, 2018d) com o intuito de avaliar o estado de conservação do leite, a fim de evitar o uso de amostras com alterações que pudessem influenciar o resultado das análises. O leite foi então dividido em cinco provetas, correspondendo aos volumes decrescentes de 1L, 975 mL, 950 mL, 925 mL e 900 mL que representavam cada um dos tratamentos com diferentes percentuais de adição de água (0%; 2,5%; 5%; 7,5%; 10,0%). Após, foi retirada uma alíquota de aproximadamente 40 mL de cada proveta para os frascos sem conservante para análise pelo CombiScope FTIR 400® (Delta Instruments; Drachten, Holanda). O objetivo deste procedimento era garantir a eficiência da homogeneização por meio do resultado do teor de gordura e demais componentes do leite.

Confirmada a eficiência da homogeneização, as provetas eram completadas em seu volume (1 L) com água, sendo mantida a primeira sem adição de água; a segunda com adição de 25 mL; 50 mL para a terceira; 75 mL para a quarta e 100 mL para a quinta proveta (Figura 1). Os conteúdos eram vertidos para béqueres de plástico para que pudessem ser novamente homogeneizados utilizando o agitador mecânico (500 rpm/5 min) para incorporar a água, sendo novamente verificada a eficiência da homogeneização pelo resultado do teor de gordura na análise do FTIR. Verificada a eficiência da homogeneização, o leite de cada béquer (tratamento de adição de água) era vertido para um total de 24 frascos, sendo seis para cada tratamento de conservante (sem conservante, Bronopol, Bronolat e Brononata). Dentre estes seis frascos de cada tratamento de conservantes eram destinados três para a análise pelo crioscópio eletrônico e três para a análise pelo FTIR, sendo que cada um destes três era referente a um dos três tempos de armazenamento em câmara-fria a 4 °C até o momento da análise (até 24 horas da recepção, até 48 horas da recepção e até 72 horas da recepção). Após o preenchimento dos frascos, estes eram homogeneizados manualmente para promover a dissolução

do comprimido de conservante no leite. Para as amostras analisadas até 24 horas foi estabelecido o período de uma hora em câmara-fria para garantir o contato entre a amostra de leite e os conservantes em questão e as amostras até 48 horas e até 72 horas foram analisadas a partir do mesmo horário nos dias subsequentes. A figura 1 ilustra os procedimentos desde o momento da recepção do leite até a análise.

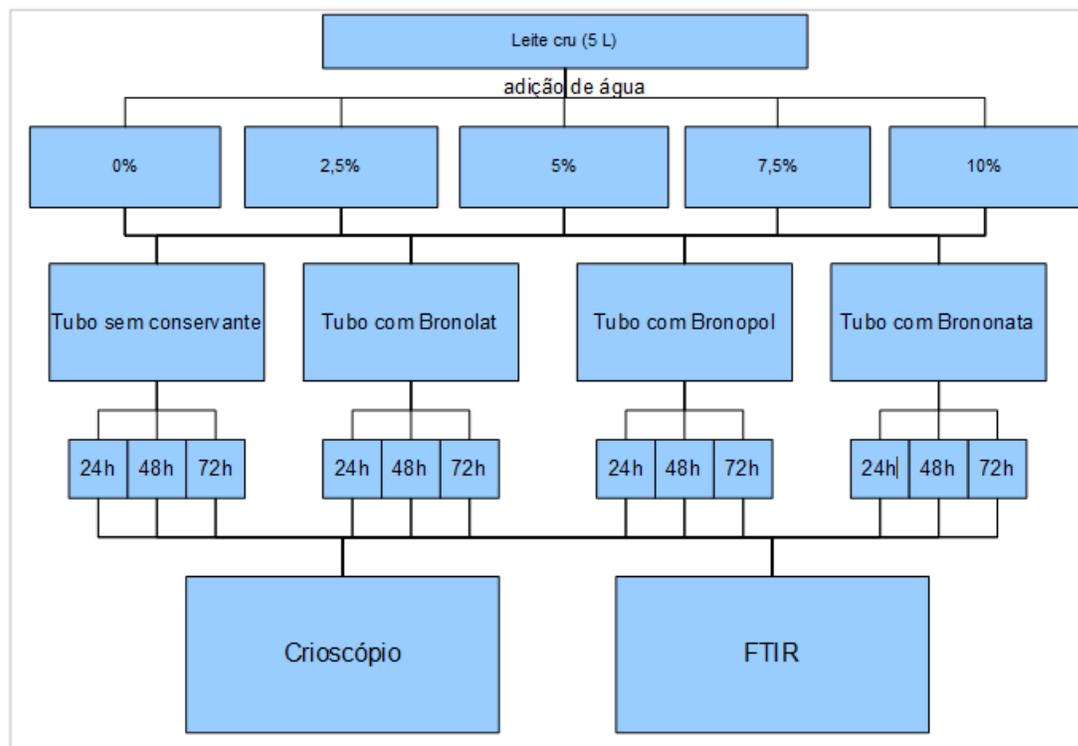


Figura 1. Desenho esquemático do experimento para avaliação do ponto de congelamento do leite em diferentes condições (conservação, tempo e método de análise).

#### 4.4 ACIDEZ TITULÁVEL

Após homogeneização do leite cru, 20 mL da amostra foram pipetados e transferidos para um béquer de 100 mL. Foram adicionados ao béquer 40 mL de água livre de gás carbônico e em seguida 2 mL da solução de fenolftaleína a 1% (m/v). Titulou-se com solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ molL}^{-1}$  até aparecimento de coloração rósea forte persistente. As amostras foram analisadas em triplicata (BRASIL, 2018d).

Os resultados obtidos foram calculados com a seguinte fórmula:

$$\text{Acidez em g de ácido láctico/100mL} = \frac{V \times f \times 0,1 \times 0,09 \times 100}{20}$$

sendo:

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 molL<sup>-1</sup> gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 molL<sup>-1</sup>;

0,09 = fator de conversão para ácido láctico;

0,1 = molaridade de solução de hidróxido de sódio;

20 = volume da amostra.

Os resultados foram expressos em g de ácido láctico/100g.

#### **4.5 CALIBRAÇÃO E ANÁLISE PELO CRIOSCÓPIO ELETRÔNICO**

As soluções de calibração crioscópica -0,422 °H, -0,530 °H e -0,621 °H foram preparadas utilizando água deionizada e NaCl nas devidas proporções e homogeneizadas com agitador magnético (BRASIL, 2018d e INTERNATIONAL STANDARD, 2009a).

O crioscópio eletrônico LK-7000 (Londrina, Paraná – Brasil) foi calibrado diariamente momentos antes de cada sequência de análise segundo as indicações do seu manual e da IDF 108:2009 (ISO 5764:2009a) conforme descrito no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (MAPA, 2018d) estabelecido pela Instrução Normativa Nº 30 (Brasil, 2018a). O procedimento de calibração e preparação do equipamento LK-7000 (Londrina, Paraná – Brasil) consistia em ligar o aparelho, completar o banho com solução refrigerante (150 mL de água, 150 mL de glicerina e 300 mL de álcool) com o auxílio de um funil e esperar atingir a temperatura ideal para as análises de acordo com o monitor do computador do equipamento. Após atingida a temperatura foram pipetadas três amostras de 2,5 mL da solução padrão de -0,621 °H e outras três amostras da solução padrão de -0,422 °H em tubos de ensaio limpos e secos, sendo analisadas de acordo com a função de calibração total do aparelho. Após esta etapa, foram pipetadas três amostras da solução de -0,530 °H que foram analisadas de acordo com a função ajuste de *offset* do aparelho.

Terminada a calibração era testada uma amostra da solução padrão de  $-0,530\text{ }^{\circ}\text{H}$  para verificar se o crioscópio eletrônico estava calibrado, sendo permitido resultados entre  $-0,530 \pm 0,002\text{ }^{\circ}\text{H}$ .

No momento da análise, as amostras foram retiradas uma a uma da câmara fria, para evitar qualquer possível alteração devido a exposição a temperatura ambiente por tempo prolongado. A amostra que seria analisada era então homogenizada manualmente vertendo o frasco por pelo menos 10 vezes. A amostra era destampada e 2,5 mL eram pipetados para cada um dos três tubos de ensaio limpos e secos para análise em triplicata. Para cada amostra era utilizada uma pipeta de 5 mL específica, a fim de evitar a contaminação das amostras com conteúdo das anteriores. Cada tubo era inserido no equipamento após a secagem do misturador automático com papel toalha macio para evitar o efeito *carry over* da amostra anterior, o que poderia influenciar no resultado. Ao fim de cada análise os resultados foram anotados e foram feitas as médias aritméticas dos resultados para as análises estatísticas. Ao desligar o equipamento, era posicionado um tubo para crioscópio vazio e apertado o botão de análise e, só então, após a completa oclusão da área de análise o equipamento era desligado. Um tubo de ensaio vazio era mantido no suporte do equipamento sempre que as análises não estavam sendo feitas, como no intervalo entre o fim da calibração e o início das análises, para evitar a perda da solução refrigerante por evaporação, a contaminação da solução refrigerante por sujidades e um acionamento indevido do crioscópio que pudesse danificar a sonda.

#### **4.6 CALIBRAÇÃO E ANÁLISE PELO FTIR**

A citometria de fluxo acoplada a espectrometria no infravermelho médio com transformada de Fourier foi feita utilizando o CombiScope FTIR 400® (Delta Instruments; Drachten, Holanda). O equipamento foi calibrado e verificado (branco e *check*) diariamente seguindo as Instruções do Manual do Equipamento, das Instruções de Trabalho do LabUFMG e da ISO 8196-1|IDF 128 (International Standard, 2009b; International Standard, 2009c). As soluções padrão para a calibração são adquiridas do LANAGRO (Laboratórios Nacionais Agropecuários, MG, Brasil) para CCS, Eurofins DQCI (Dairy Quality Control Incorporated, Estados Unidos) para ponto de congelamento e Valacta (Dairy Production Centre of Expertise, Quebec, Canadá) para composição, caseína e nitrogênio ureico no leite. Primeiramente foi realizada a limpeza do aparelho, seguida da determinação de zeros (análise de amostra branco), o teste de *carry over* e de repetibilidade. Foram utilizadas três amostras de valores baixo, médio e alto para cada uma das soluções de calibração. Estas amostras foram aquecidas a temperatura de  $40 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos em banho-maria, enquanto os valores de referência são adicionados ao programa. Após estes 15 minutos, as amostras

foram homogeneizadas e analisadas pelo equipamento em ordem crescente e então retornam ao banho-maria. Após a calibração, as amostras foram analisadas para a conferência dos valores.

O ponto de congelamento e a composição foram determinados automaticamente pelo analisador automático de composição baseado em infravermelho médio e a CCS do leite por citometria de fluxo. O equipamento foi calibrado para as análises de contagem de células somáticas (CCS), composição do leite (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, caseína), ponto de congelamento e nitrogênio ureico no leite (NUL) conforme documentação da qualidade do LabUFMG.

As amostras submetidas as análises pelo FTIR foram primeiramente identificadas pelo leitor de código de barras na sala de recepção de amostras, onde também receberam um código para a identificação de toda a *rack*, possibilitando a inserção das amostras no sistema informatizado e a futura comparação de dados. Logo em seguida, as amostras foram levadas para a sala de CCS e submetidas ao banho-maria a temperatura de 40 °C por 20 minutos para a homogeneização das mesmas. Ao final desta etapa, utilizava-se o código estabelecido na recepção para a inclusão da *rack* no sistema. As amostras eram então destampadas e colocadas na esteira do FTIR para a análise automática. No momento da análise, o equipamento extrai uma alíquota da amostra atual e um bastão automático faz homogeneização da amostra subsequente. Findadas as análises das 20 amostras, os resultados eram impressos ou enviados por e-mail. As amostras foram submetidas a duplicata segundo a IDF 128 e foram feitas as médias aritméticas dos resultados para as análises estatísticas.

#### **4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

O delineamento experimental foi fatorial (5 x 4 x 3 x 2), sendo cinco adições de água, quatro tratamentos, três tempos e dois métodos analíticos.

Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade e a homocedasticidade das variáveis. Aquelas variáveis que não apresentaram normalidade ou homocedasticidade foram submetidas a transformação com objetivo de normalizar as variáveis.

Os parâmetros de tratamento por conservantes em diferentes tempos e adições de água para cada método e o parâmetro tempo de armazenamento para diferentes tratamentos por conservantes com diferentes adições de água para cada método foram avaliados utilizando o software InfoStat versão

2008 (Di Rienzo, *et al*, 2008). Para a realização destas análises, foram feitas a análise de variância (ANOVA) e os resultados comparados pelo teste de Tukey com base na Diferença Mínima Significativa (DMS), em nível de significância de 95 %. Os métodos foram comparados pelos intervalos de confiança para os mesmos tratamentos por conservantes, tempos de armazenamento e adições de água (Sampaio, 2015).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados médios para os testes de acidez titulável em cada uma das repetições foram 0,15; 0,15; 0,14 e 0,16 gramas de ácido láctico/100 mL. Os quatro resultados estão dentro do padrão estabelecido (entre 0,14 e 0,18 gramas de ácido láctico/100 mL) pelo Decreto 9.013 (Brasil, 2017) e pela Instrução Normativa N° 76 (Brasil, 2018b), o que comprova o bom estado de conservação do leite cru utilizado neste estudo.

Foram observados resultados para a composição do leite cru (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) dentro dos valores permitidos pela legislação com adições de até 5 % de água e para cada um destes parâmetros separadamente, com até 10 % de adição de água. Resultados semelhantes também foram percebidos por Duarte (2018) em adições de até 10 % de água. Estes resultados reforçam a necessidade da verificação, de forma eficiente, do ponto de congelamento porque mesmo quando o leite tem valores normais de componentes, fraudes por adição de água podem ocorrer.

Os resultados obtidos pela comparação de métodos de análise de leite utilizando frascos sem conservante, com Bronopol e Bronolat não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) para o ponto de congelamento pelo Método de Referência (crioscópio eletrônico) e por FTIR. Isto indica que é possível armazenar as amostras de leite com esses três tratamentos em câmara fria por até três dias após a recepção nos laboratórios de análise sem afetar a confiabilidade do resultado para o ponto de congelamento (Tabelas 1 a 5).

Os resultados obtidos estão de acordo com dados da literatura. Chalermisan *et al.* (2004) recomendaram que, em situação de produção de leite cru em regiões tropicais, o mesmo deve ser mantido sob refrigeração a 4 °C e analisado dentro de 7 dias. Da mesma forma, Sešĕkĕna e Jankevica (2007) aconselharam não mais do que 96 horas do momento da coleta da amostra conservada com produtos à base de Bronopol e armazenados a 4 °C até a análise, para garantir a estabilidade do

leite, enquanto que Araújo *et al.* (2011) verificaram que amostras conservadas com Bronopol a 7 °C podem ser analisadas até 9 dias após a coleta sem alterações no ponto de congelamento e pH. No entanto, diferença significativa foi observada quando o conservante Brononata foi utilizado, em todos os tempos de armazenamento ( $p \leq 0,05$ ). O uso, portanto, deste conservante para análise de ponto de congelamento do leite por FTIR não é recomendado, uma vez que há resultados diferentes quando comparados com análise pelo método de referência (Tabelas 1 a 5).

Dentro do mesmo tempo de armazenamento e método utilizado, o conservante Bronolat foi o mais estável quando comparado com o resultado de amostras sem conservante, sem e com diferentes percentuais de adição de água ( $p \leq 0,05$ ) (Tabelas 1 a 5), havendo diferença significativa apenas no tempo de 48 h para a adição de 10% de água (Tabela 5). O ponto de congelamento do leite mantido com Bronopol apresentou resultados variáveis quando comparado com amostras sem conservante no tempo de 48 h, o mesmo ocorreu para o Brononata nos três tempos analisados (24, 48 e 72 h) (Tabela 1). Com adição de 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 % de água, o ponto de congelamento do leite de amostras com Bronopol e Brononata foram diferentes ( $p > 0,05$ ) dos resultados obtidos de amostras sem conservantes, em todos os tempos, demonstrando interferência na determinação analítica pelo Método de referência (Tabela 2 a 5). Por outro lado, os resultados obtidos pelo método FTIR não diferiram entre o Bronopol e Bronolat ( $p > 0,05$ ), o que preocupa porque pelo Método de Referência, houve interferência destes conservantes. Recomenda-se, portanto, revisão das formulações utilizadas na produção do Bronopol e Brononata para que os mesmos possam também ser utilizados na determinação do ponto de congelamento do leite, sem interferência significativa no método de referência.

Tabela 1: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias sem adição de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento (h)

Tratamento	Tempo (h)	Método de referência		FTIR	
		Média	IC (95%)	Média	IC (95%)
Sem conservante	24	524,50 <sup>a</sup>	516,87   532,13	531,50 <sup>a</sup>	521,23   541,77 <sup>A</sup>
Bronopol		539,75 <sup>a</sup>	531,00   548,50	533,50 <sup>a</sup>	522,75   544,25 <sup>A</sup>
Bronolat		526,00 <sup>a</sup>	512,19   539,81	539,75 <sup>a</sup>	527,82   551,68 <sup>A</sup>
Brononata		592,00 <sup>b</sup>	573,67   610,33	534,50 <sup>a</sup>	523,14   545,86 <sup>B</sup>
Sem conservante	48	526,50 <sup>a</sup>	522,71   530,29	528,67 <sup>a</sup>	506,40   550,93 <sup>A</sup>
Bronopol		540,25 <sup>b</sup>	534,99   545,51	532,33 <sup>a</sup>	511,21   553,46 <sup>A</sup>
Bronolat		530,50 <sup>a</sup>	524,91   536,09	539,00 <sup>a</sup>	519,60   558,40 <sup>A</sup>
Brononata		594,75 <sup>c</sup>	587,83   601,67	533,33 <sup>a</sup>	512,21   554,46 <sup>B</sup>
Sem conservante	72	530,50 <sup>a</sup>	521,36   539,64	528,25 <sup>a</sup>	512,21   544,29 <sup>A</sup>
Bronopol		541,50 <sup>a</sup>	534,32   548,68	533,25 <sup>a</sup>	521,04   545,46 <sup>A</sup>
Bronolat		531,75 <sup>a</sup>	526,03   537,47	539,00 <sup>a</sup>	526,47   551,53 <sup>A</sup>
Brononata		600,00 <sup>b</sup>	585,89   614,11	534,50 <sup>a</sup>	522,42   546,58 <sup>B</sup>

*Linhas com letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) entre amostras de mesmo tratamento e tempo de armazenamento analisadas por métodos diferentes*

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )*

Uma possível explicação para esta diferença perceptível entre a média do ponto de congelamento entre o Brononata (-0,592 °C, sem adição de água analisado em 24 h) e a amostra de leite sem conservante (-0,5245 °C, sem adição de água analisado em 24 h) pelo crioscópio eletrônico seria a presença de NaCl em sua composição, uma vez que lactose e sais são os principais componentes conhecidos por reduzir o ponto de congelamento no crioscópio eletrônico (Tabela 1). No entanto, devido à falta de informações completas sobre a composição dos comprimidos de cada um dos conservantes, assim como das concentrações de cada componente não é possível afirmar isto.

Tabela 2: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 2,5 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento (h)

Tratamento	Tempo (h)	Método de referência		FTIR	
		Média	IC (95%)	Média	IC (95%)
Sem conservante	24	510,00 <sup>a</sup>	503,50   516,50	519,00 <sup>a</sup>	508,53   529,47 <sup>A</sup>
Bronopol		526,75 <sup>b</sup>	517,62   535,88	519,75 <sup>a</sup>	509,82   529,68 <sup>A</sup>
Bronolat		517,00 <sup>a,b</sup>	509,20   524,80	526,50 <sup>a</sup>	515,29   537,71 <sup>A</sup>
Brononata		581,75 <sup>c</sup>	566,92   596,58	520,50 <sup>a</sup>	511,09   529,91 <sup>B</sup>
Sem conservante	48	512,50 <sup>a</sup>	509,19   515,81	517,00 <sup>a</sup>	497,28   536,72 <sup>A</sup>
Bronopol		526,25 <sup>b</sup>	521,87   530,63	519,00 <sup>a</sup>	501,09   536,91 <sup>A</sup>
Bronolat		516,75 <sup>a,b</sup>	511,66   521,84	525,00 <sup>a</sup>	505,28   544,72 <sup>A</sup>
Brononata		582,00 <sup>c</sup>	564,19   599,81	519,67 <sup>a</sup>	500,69   538,64 <sup>B</sup>
Sem conservante	72	516,25 <sup>a</sup>	508,74   523,76	516,25 <sup>a</sup>	502,23   530,27 <sup>A</sup>
Bronopol		526,75 <sup>b</sup>	521,49   532,01	519,75 <sup>a</sup>	508,85   530,65 <sup>A</sup>
Bronolat		517,25 <sup>a</sup>	512,87   521,63	526,00 <sup>a</sup>	514,82   537,18 <sup>A</sup>
Brononata		578,50 <sup>c</sup>	571,56   585,44	520,25 <sup>a</sup>	509,43   531,07 <sup>B</sup>

*Linhas com letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) entre amostras de mesmo tratamento e tempo de armazenamento analisadas por métodos diferentes*

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )*

Na comparação das médias do ponto de congelamento (-m°C) pelo teste de Tukey, diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) (representadas por letras minúsculas diferentes ao lado das respectivas médias) não foram observadas para os tratamentos por conservantes pelo FTIR, em nenhum dos diferentes tempos de armazenamento e adições de água (Tabelas 1 a 5), apesar de haver uma pequena redução do ponto de congelamento para todos os tratamentos com conservantes, conforme observado por Araújo *et al.* (2011). É interessante que seja adotado um conservante para a análise do ponto de congelamento, em que a diferença nestes resultados não ocorra ou seja a menor possível, de forma a garantir maior precisão no resultado, além de potencialmente evitar a necessidade do cálculo de fator de correção tornando a medição mais direta (Tabelas 1 a 5).

Tabela 3: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 5,0 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento (h)

Tratamento	Tempo (h)	Método de referência		FTIR	
		Média	IC (95%)	Média	IC (95%)
Sem conservante	24	496,25 <sup>a</sup>	489,09   503,41	504,75 <sup>a</sup>	494,57   514,93 <sup>A</sup>
Bronopol		513,00 <sup>b</sup>	504,68   521,32	505,75 <sup>a</sup>	494,62   516,88 <sup>A</sup>
Bronolat		502,50 <sup>a,b</sup>	494,44   510,56	512,00 <sup>a</sup>	501,53   522,47 <sup>A</sup>
Brononata		572,75 <sup>c</sup>	561,93   583,57	506,25 <sup>a</sup>	495,20   517,30 <sup>B</sup>
Sem conservante	48	497,75 <sup>a</sup>	494,74   500,76	503,00 <sup>a</sup>	480,92   525,08 <sup>A</sup>
Bronopol		513,50 <sup>b</sup>	507,91   519,09	504,67 <sup>a</sup>	483,98   525,35 <sup>A</sup>
Bronolat		503,50 <sup>a</sup>	498,55   508,45	510,33 <sup>a</sup>	491,04   529,63 <sup>A</sup>
Brononata		567,00 <sup>c</sup>	558,09   575,91	505,67 <sup>a</sup>	484,98   526,35 <sup>B</sup>
Sem conservante	72	501,25 <sup>a</sup>	493,97   508,53	502,25 <sup>a</sup>	487,42   517,08 <sup>A</sup>
Bronopol		512,50 <sup>b</sup>	505,81   519,19	505,25 <sup>a</sup>	493,32   517,18 <sup>A</sup>
Bronolat		503,00 <sup>a,b</sup>	497,34   508,66	511,50 <sup>a</sup>	499,21   523,79 <sup>A</sup>
Brononata		571,00 <sup>c</sup>	559,75   582,25	506,25 <sup>a</sup>	494,53   517,97 <sup>B</sup>

*Linhas com letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) entre amostras de mesmo tratamento e tempo de armazenamento analisadas por métodos diferentes*

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )*

Como ressaltado por Sánchez *et al.* (2011), os efeitos dos conservantes devem ser considerados durante a interpretação do ponto de congelamento do leite nos dois métodos para se evitar interpretações errôneas sobre possível adição de água ou presença de substância estranhas, em amostras com conservantes químicos, e até mesmo prevenir que pequenas alterações no ponto de congelamento possam classificar de forma equivocada, amostras próximas aos valores mínimos e máximos permitidos pela legislação. Estes erros de interpretação podem gerar punições indevidas aos produtores de leite ou permitir o beneficiamento de leite fraudado.

Tabela 4: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 7,5 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento (h)

Tratamento	Tempo (h)	Método de referência		FTIR	
		Média	IC (95%)	Média	IC (95%)
Sem conservante	24	482,75 <sup>a</sup>	474,81   490,69	491,25 <sup>a</sup>	481,07   501,43 <sup>A</sup>
Bronopol		498,50 <sup>b</sup>	489,83   507,17	492,00 <sup>a</sup>	481,69   502,31 <sup>A</sup>
Bronolat		490,25 <sup>a,b</sup>	482,52   497,98	497,75 <sup>a</sup>	487,82   507,68 <sup>A</sup>
Brononata		555,00 <sup>c</sup>	541,07   568,93	492,75 <sup>a</sup>	482,82   502,68 <sup>B</sup>
Sem conservante	48	485,75 <sup>a</sup>	482,74   488,76	489,67 <sup>a</sup>	470,69   508,64 <sup>A</sup>
Bronopol		500,00 <sup>b</sup>	496,33   503,67	490,67 <sup>a</sup>	474,13   507,21 <sup>A</sup>
Bronolat		490,50 <sup>a</sup>	486,71   494,29	497,00 <sup>a</sup>	477,28   516,72 <sup>A</sup>
Brononata		552,75 <sup>c</sup>	548,77   556,73	492,00 <sup>a</sup>	474,09   509,91 <sup>B</sup>
Sem conservante	72	489,00 <sup>a</sup>	482,38   495,62	489,25 <sup>a</sup>	475,36   503,14 <sup>A</sup>
Bronopol		500,50 <sup>b</sup>	495,06   505,94	492,00 <sup>a</sup>	480,67   503,33 <sup>A</sup>
Bronolat		490,00 <sup>a</sup>	484,97   495,03	498,00 <sup>a</sup>	486,02   509,98 <sup>A</sup>
Brononata		555,75 <sup>c</sup>	545,99   565,51	493,00 <sup>a</sup>	481,82   504,18 <sup>B</sup>

*Linhas com letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) entre amostras de mesmo tratamento e tempo de armazenamento analisadas por métodos diferentes*

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )*

Em relação aos equipamentos utilizados para a aferição do ponto de congelamento (crioscópio eletrônico e FTIR), como já mencionado anteriormente, o tratamento com o conservante Brononata foi o único a obter resultados significativamente diferentes entre eles para todos os três tempos de armazenamento e as cinco quantidades de adições de água (Tabelas 1 a 5). Todos os outros três tratamentos por conservantes não foram significativamente diferentes entre métodos para quaisquer dos três tempos e das cinco concentrações de adição de água. Estes resultados estão de acordo com Conrado *et al.* (2012), que não encontraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o ponto de congelamento avaliado por método de referência e pelo FTIR em amostras de leite cru conservado com o Bronopol.

Tabela 5: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 10,0 % de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento (h)

Tratamento	Tempo (h)	Método de referência		FTIR	
		Média	IC (95%)	Média	IC (95%)
Sem conservante	24	468,00 <sup>a</sup>	461,91   474,09	476,25 <sup>a</sup>	466,07   486,43 <sup>A</sup>
Bronopol		485,50 <sup>b</sup>	478,09   492,91	477,75 <sup>a</sup>	467,57   487,93 <sup>A</sup>
Bronolat		474,75 <sup>a</sup>	468,47   481,03	483,25 <sup>a</sup>	473,07   493,43 <sup>A</sup>
Brononata		545,50 <sup>c</sup>	540,73   550,27	478,25 <sup>a</sup>	468,94   487,56 <sup>B</sup>
Sem conservante	48	470,25 <sup>a</sup>	468,73   471,77	475,33 <sup>a</sup>	453,63   497,04 <sup>A</sup>
Bronopol		484,75 <sup>c</sup>	482,03   487,47	476,67 <sup>a</sup>	455,98   497,35 <sup>A</sup>
Bronolat		475,25 <sup>b</sup>	470,50   480,00	483,33 <sup>a</sup>	465,71   500,96 <sup>A</sup>
Brononata		543,00 <sup>d</sup>	538,89   547,11	477,67 <sup>a</sup>	458,69   496,64 <sup>B</sup>
Sem conservante	72	473,50 <sup>a</sup>	467,34   479,66	475,00 <sup>a</sup>	461,50   488,50 <sup>A</sup>
Bronopol		485,25 <sup>b</sup>	481,07   489,43	477,00 <sup>a</sup>	466,21   487,79 <sup>A</sup>
Bronolat		475,00 <sup>a</sup>	470,32   479,68	483,50 <sup>a</sup>	472,14   494,86 <sup>A</sup>
Brononata		539,75 <sup>c</sup>	527,54   551,96	478,00 <sup>a</sup>	468,11   487,89 <sup>B</sup>

*Linhas com letras maiúsculas diferentes são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) entre amostras de mesmo tratamento e tempo de armazenamento analisadas por métodos diferentes*

*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na coluna são estatisticamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )*

Para a escolha do conservante mais adequado para a preservação das amostras de leite até o momento da análise deve-se considerar não só a confiabilidade dos resultados para ponto de congelamento de um mesmo conservante entre os dois equipamentos como dito anteriormente (igualdade entre o FTIR e o método de referência), mas também a preservação da amostra de leite por tempo prolongado. Isto deve ser feito para, principalmente, influenciar minimamente o resultado das análises, fazendo com que o resultado obtido seja o mais próximo possível ao resultado real obtido pelo teste do leite cru sem adições a fim de evitar resultados não conformes em lotes dentro dos parâmetros permitidos por lei. Levando em consideração que o método de triagem utilizado para a análise do ponto de congelamento do leite pelos laboratórios da rede RBQL é o FTIR, pode-se classificar o Bronolat como o melhor conservante para verificação do ponto de congelamento em amostras de leite cru, uma vez que com este conservante não houve resultados significativamente diferentes entre o método de referência e o método de triagem (FTIR), as amostras foram preservadas por até 72 h sem influenciar o seu resultado e ainda obteve a maior quantidade de resultados iguais aos das amostras sem

conservante no FTIR evitando a utilização de fator de correção ou pelo menos minimizando o seu efeito.

Os efeitos do conservante Brononata sobre a leitura do ponto de congelamento do leite podem ser facilmente percebidos pelas Figuras 2 a 6. Estas alterações mesmo em testes de triagem como deve ser considerado o teste de FTIR podem impactar na avaliação de produtores pelas indústrias e/ou órgãos oficiais de inspeção. Esta análise, mesmo sendo considerada de triagem, deve ser realizada considerando o melhor conservante e as melhores condições. Nos laboratórios da RBQL, por exemplo, cuidados devem ser tomados no sentido de alertar produtores e industriais sobre a cautela na interpretação dos resultados, investigação nas propriedades e análises complementares por meio de provas de precisão.

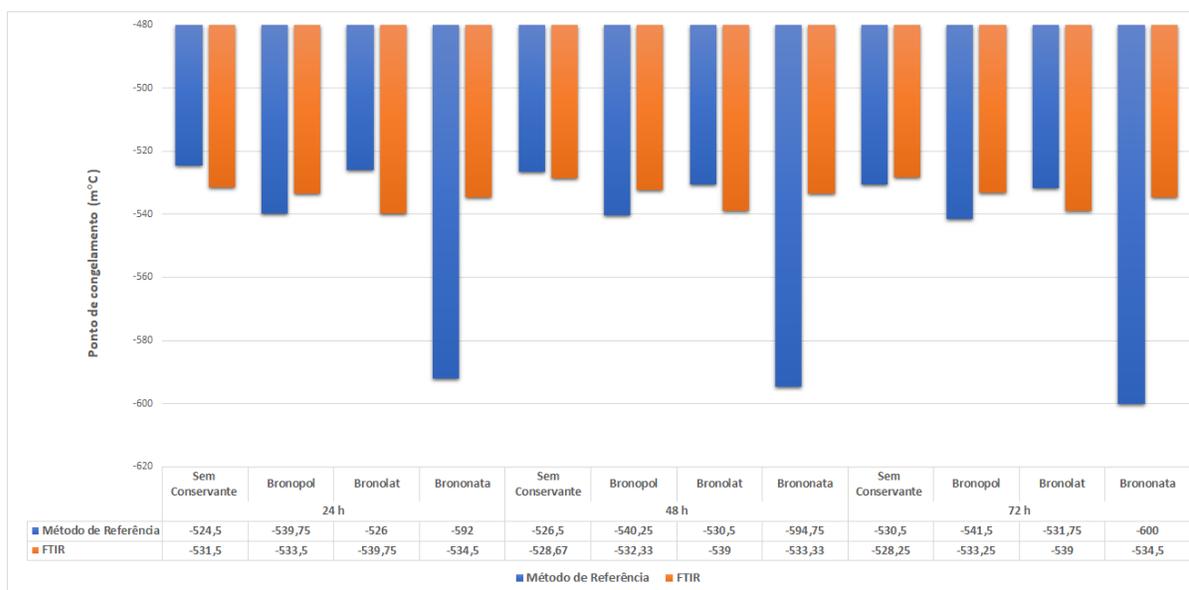


Figura 2: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias sem adição de água em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.

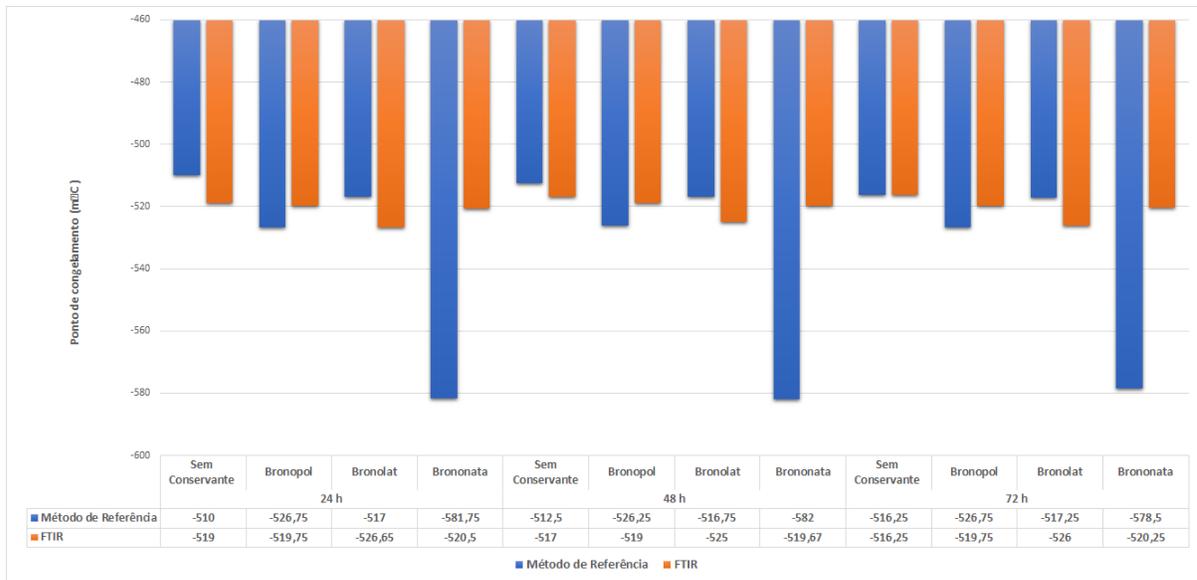


Figura 3: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 2,5% de água, em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.

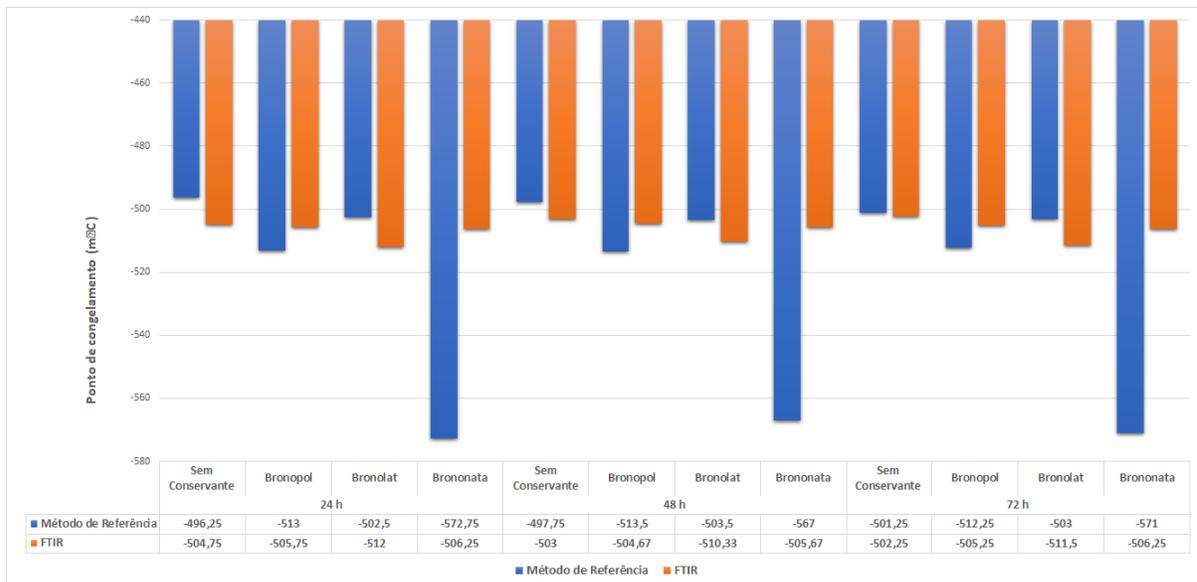


Figura 4: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 5,0% de água, em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.

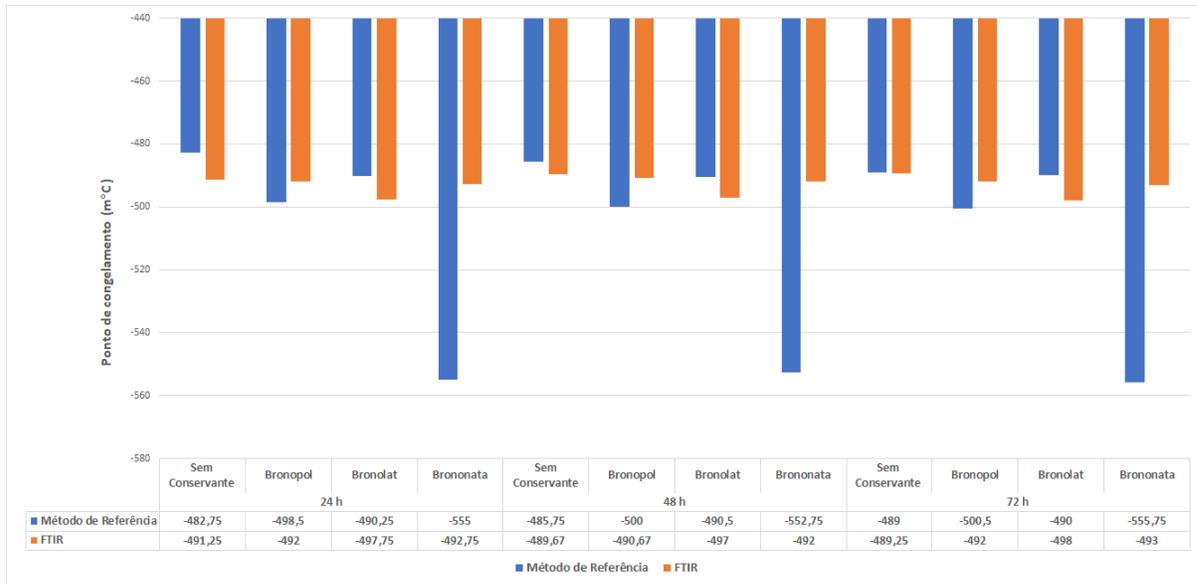


Figura 5: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 7,5% de água, em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.

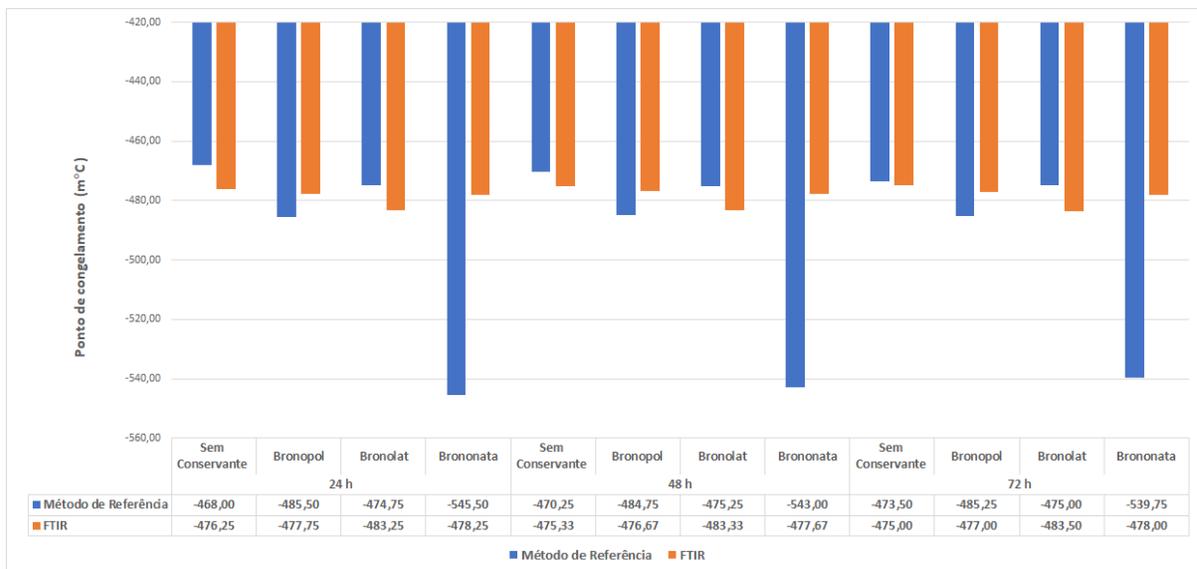


Figura 6: Ponto de congelamento de leite cru (-m°C) por duas metodologias com adição de 10,0% de água, em diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.

Os resultados da composição e da CCS do leite acondicionado em frascos com diferentes conservantes e por diferentes tempos de armazenamento estão descritos na Tabela 6. Pelas médias, verificam-se poucas alterações nos resultados de teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e CCS. Aparentemente, os diferentes conservantes não interferiram na leitura dos componentes do leite por espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR) e de CCS por citometria de fluxo. No entanto, o uso destes conservantes deve ser avaliado com cuidado pela interferência no ponto de congelamento do leite, especialmente no caso do Brononata (Figuras 2 a 6).

Desta forma, métodos automatizados são importantes porque possibilitam a análise de grande número de amostras, mas para cada analito, considerações técnico-científicas devem sempre ser avaliadas para minimizar a emissão de resultados que possam comprometer o produtor e a indústria de laticínios.

Tabela 6: Médias dos resultados para ponto de congelamento, composição química e contagem de células somáticas pelo método de referência e FTIR para diferentes tratamentos e tempos de armazenamento (h) e adições de água (%)

Tratamento	Água (%)	Tempo (h)	PC (-m°C)		Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lactose (g/100g)	Sólidos Totais (g/100g)		Caseína (g/100g)	CCS (LOG)
			Método de referência	PC (-m°C) FTIR				NUL (mg/dL)	(g/100g)		
Sem conservante		24	524,5	531,50	3,75	3,16	4,58	12,46	14,48	2,48	5,64
Bronopol	0	24	526,00	533,50	3,77	3,17	4,58	12,48	14,80	2,49	5,67
Bronolat		24	539,75	539,75	3,77	3,17	4,65	12,55	16,10	2,49	5,70
Brononata		24	592,00	534,5	3,76	3,17	4,58	12,48	14,59	2,49	5,65
Sem conservante		24	510,00	519,00	3,67	3,09	4,45	12,18	15,58	2,41	5,65
Bronopol	2,5	24	526,75	519,75	3,68	3,10	4,46	12,21	15,05	2,42	5,66
Bronolat		24	517,00	526,50	3,69	3,10	4,54	12,29	16,53	2,42	5,68
Brononata		24	581,75	520,50	3,67	3,09	4,46	12,20	14,78	2,42	5,67
Sem conservante		24	496,25	504,75	3,59	3,02	4,33	11,90	15,48	2,35	5,64
Bronopol	5	24	513,00	505,75	3,60	3,02	4,34	11,94	14,95	2,36	5,66
Bronolat		24	502,50	512,00	3,60	3,02	4,41	12,00	15,68	2,35	5,67
Brononata		24	512,75	506,25	3,59	3,02	4,34	11,92	14,33	2,36	5,65
Sem conservante		24	482,75	491,25	3,50	2,95	4,22	11,64	14,65	2,29	5,63
Bronopol	7,5	24	498,50	492,00	3,50	2,96	4,22	11,66	14,33	2,30	5,64
Bronolat		24	490,25	497,75	3,51	2,95	4,28	11,72	14,85	2,29	5,66
Brononata		24	555,00	492,75	3,50	2,95	4,22	11,65	13,73	2,30	5,64
Sem conservante		24	468,00	476,25	3,41	2,87	4,08	11,35	14,18	2,22	5,61
Bronopol	10	24	485,50	477,75	3,40	2,88	4,10	11,35	14,33	2,24	5,62
Bronolat		24	474,75	483,25	3,41	2,88	4,16	11,42	14,58	2,23	5,65
Brononata		24	545,50	478,25	3,39	2,87	4,10	11,33	12,15	2,24	5,62
Sem conservante		48	526,50	528,67	3,74	3,17	4,55	12,43	14,23	2,48	5,68
Bronopol	0	48	540,25	532,33	3,74	3,17	4,57	12,46	13,67	2,49	5,70
Bronolat		48	530,50	539,00	3,74	3,17	4,64	12,52	14,77	2,49	5,71
Brononata		48	594,75	533,33	3,73	3,17	4,57	12,45	12,97	2,49	5,69
Sem conservante		48	512,50	517,00	3,66	3,10	4,43	12,16	14,33	2,42	5,68
Bronopol	2,5	48	526,25	519,00	3,65	3,10	4,45	12,18	12,90	2,42	5,67
Bronolat		48	516,75	525,00	3,66	3,09	4,51	12,25	13,57	2,42	5,69
Brononata		48	582,00	519,67	3,64	3,09	4,45	12,17	12,43	2,43	5,68
Sem conservante		48	497,75	503,00	3,57	3,02	4,31	11,88	14,27	2,35	5,67
Bronopol	5	48	513,50	504,67	3,56	3,02	4,33	11,89	12,93	2,36	5,67
Bronolat		48	503,50	510,33	3,57	3,02	4,39	11,96	13,53	2,35	5,69
Brononata		48	567,00	505,67	3,56	3,02	4,34	11,90	11,93	2,36	5,67
Sem conservante		48	485,75	489,67	3,47	2,95	4,20	11,60	13,47	2,29	5,65
Bronopol	7,5	48	500,00	490,67	3,47	2,95	4,21	11,61	12,37	2,29	5,65
Bronolat		48	490,50	497,00	3,48	2,95	4,27	11,69	13,80	2,29	5,68
Brononata		48	552,75	492,00	3,46	2,95	4,21	11,60	11,20	2,30	5,66
Sem conservante		48	470,25	475,33	3,39	2,88	4,07	11,32	13,40	2,23	5,64
Bronopol	10	48	484,75	476,67	3,39	2,87	4,08	11,33	11,67	2,23	5,64
Bronolat		48	475,25	483,33	3,39	2,88	4,16	11,4	13,37	2,23	5,67
Brononata		48	543,00	477,67	3,37	2,87	4,09	11,31	11,20	2,24	5,65
Sem conservante		72	530,5	528,25	3,78	3,17	4,55	12,47	17,10	2,47	5,61
Bronopol	0	72	541,5	533,25	3,78	3,17	4,57	12,49	15,05	2,48	5,64
Bronolat		72	531,75	539,00	3,79	3,16	4,64	12,56	16,60	2,48	5,67
Brononata		72	600,00	534,50	3,77	3,16	4,58	12,49	15,13	2,48	5,64
Sem conservante		72	516,25	516,25	3,70	3,11	4,42	12,20	17,65	2,41	5,64
Bronopol	2,5	72	526,75	519,75	3,69	3,09	4,46	12,22	15,53	2,41	5,64
Bronolat		72	517,25	526,00	3,70	3,09	4,53	12,30	16,43	2,41	5,67
Brononata		72	578,50	520,25	3,68	3,09	4,46	12,21	14,60	2,42	5,63
Sem conservante		72	501,25	502,25	3,61	3,02	4,30	11,91	17,18	2,34	5,60
Bronopol	5	72	512,5	505,25	3,61	3,02	4,33	11,94	14,68	2,35	5,64
Bronolat		72	503,00	511,50	3,61	3,01	4,40	12,00	16,33	2,34	5,68
Brononata		72	571,00	506,25	3,60	3,02	4,34	11,93	14,53	2,36	5,64
Sem conservante		72	489,00	489,25	3,53	2,96	4,19	11,65	16,78	2,28	5,60
Bronopol	7,5	72	550,50	492,00	3,52	2,95	4,22	11,66	14,30	2,29	5,62
Bronolat		72	490,00	498,00	3,52	2,95	4,28	11,73	16,00	2,29	5,66
Brononata		72	555,75	493,00	3,51	2,95	4,22	11,66	13,8	2,30	5,62
Sem conservante		72	473,50	475,00	3,44	2,88	4,06	11,36	15,48	2,22	5,58
Bronopol	10	72	485,25	477,00	3,42	2,88	4,09	11,36	13,60	2,22	5,62
Bronolat		72	475,00	483,50	3,43	2,87	4,16	11,44	14,95	2,22	5,64
Brononata		72	539,75	478,00	3,40	2,87	4,10	11,35	12,95	2,23	5,60

## CONCLUSÕES

Bronolat foi o melhor conservante utilizado para análise do ponto de congelamento do leite por FTIR por não apresentar interferência nas leituras obtidas pelo Método de Referência nos diferentes tempos de armazenamento e condições (sem e com adição de água), exceto em uma condição experimental (10% de adição de água em até 48 h pelo Método de Referência), demonstrando ser o conservante mais estável para a aferição do ponto de congelamento.

Brononata foi o pior conservante por apresentar interferência na determinação do ponto de congelamento do leite pelo Método de Referência e apresentar diferença significativa para o ponto de congelamento entre métodos para todos os tempos de armazenamento e condições (sem e com adição de água) testadas.

Bronopol apresentou interferência na determinação do ponto de congelamento do leite pelo Método de Referência em vários tempos de armazenamento e condições (sem e com adição de água).

Amostras preservadas quimicamente com o conservante Bronolat e armazenadas até 4 °C desde o momento de sua recepção podem ser analisadas em até 72 h sem alterações significativas no resultado do ponto de congelamento pelo FTIR e pelo método de referência.

Recomenda-se a realização periódica de análises do leite sem conservante e com o conservante utilizado pelos laboratórios da RBQL pelos métodos de referência e por FTIR para evitar possíveis interferências nos resultados analíticos.

São necessários novas pesquisas para correlacionar a composição do leite e o ponto de congelamento seguindo os parâmetros deste estudo com o intuito de verificar se algum dos sólidos do leite influencia o resultado do ponto de congelamento quando analisados pelo FTIR, uma vez que o equipamento utiliza os teores de gordura, proteína e lactose para calcular o ponto de congelamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, V. M. de; CASSOLI, L. D.; ZAMPAR, A.; SILVA, A. C. L. da; DIAS, C. T. dos S.; MACHADO, P. F. Comparação de metodologias para a determinação do pH e do ponto de congelamento do leite bovino cru sob diferentes características de conservação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 7, p. 1619-1624, 2011.

ARNVIDARSON, N. B.; NYGAARD, G. L.; HANSEN, H. P. W. Determination of extraneous water in milk samples, or the freezing point depression of milk samples. *United States Patent*, US005739034A, p. 1 – 18. 1998.

BARBANO, D. M.; WOJCIECHOWSKI, K. L.; LYNCH, J. M. Effect of preservatives on the accuracy of mid-infrared milk component testing. *Journal of Dairy Science*, v. 93, n. 12, p. 6000 – 6011. 2010.

BELOTI, V.; RIOS, E. A.; SILVA, M. R.; TAMANINI, R.; YAMADA, A. K.; SILVA, L. C. C. da. Determinação do parâmetro de crioscopia para leite UHT. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 5, p. 3181-3188, 2015.

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. 208, p. 21-29, 1987.

BJERG, M.; RASMUSSEN, M. D.; NIELSEN, M. O. Changes in freezing point of blood and milk during dehydration and rehydration in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 9, p. 3174-3185, 2005.

BRADLEY, JR., R. L. Capítulo 6: Moisture and total solids analysis. In: NIELSEN, S. S. *Food Analysis*, Springer, 4ª edição, West Lafayette, IN, EUA. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691 de 29/03/1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013 de 29/03/2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõe sobre a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37 de 18/04/2002. Institui a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite, com o objetivo de realizar análises laboratoriais para fiscalização de amostras de leite cru, recolhidas em propriedades rurais e em estabelecimentos de laticínios, nos termos fixados pela Secretaria de Defesa Agropecuária deste Ministério. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 26/06/2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, indexado ao International Standard Book Number (ISBN) sob o número 978-85-7991-111-8, disponível no sítio eletrônico do MAPA, para realização de ensaios em amostras de produtos de origem animal, oriundas dos programas e controles oficiais do MAPA, cuja adoção é compulsória pelos laboratórios integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção a Sanidade Agropecuária. 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76 de 26/11/2018. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, de leite pasteurizado e de leite pasteurizado tipo A. 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77 de 26/11/2018. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. 2018c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Manual de Métodos Oficiais para a Análise de Alimentos de Origem Animal. Brasília, 2018d.

CHALERMSAN, N.; VIJCHULATA, PRAVEE.; CHIRATTANAYUTH, P.; SINTIWANIT, S.; SURAPAT, S.; ENKGAGUL, A. Effects of preservatives on raw milk components analyzed by infrared spectrophotometry. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, v. 38, n. 1, p. 38-43, 2004.

CONRRADO, R. S.; OLIVEIRA, M. C. P. P.; FONSECA, L. M. BORGES, L. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; RODRIGUES, R.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Freezing point of raw milk by Fourier transform infrared methodology (FTIR). *Journal Animal Science*, v. 90, 2012.

COVENEY, L. The freezing point depression of authenticated and bulk vat milk: results of surveys 1989-91. *Journal of the Society of Dairy Technology*, v. 46, n. 2, p. 43-46, 1993.

DI RIENZO, J; CASANOVES, F; BALZARINI, M; GONZALES, L; TABLADA, M; ROBLEDO, C. 2018. InfoStat - Statistical Software Versão 2008. Disponível em: <http://www.infostat.com.ar/>.

DUARTE, E. L. Espectroscopia por transformada de Fourier como método de triagem na avaliação da crioscopia de leite. 2018. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FREEMAN, T. R.; KRATZER, D. D.; BUCY, J. L. Relationship of freezing point of herd milk to production conditions. *Journal of Milk Food Technology*, v. 35, n. 4, p. 189-190, 1972.

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

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária out. – dez. 2018. 2019.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). 1995. Milk and Milk Products: Guidance on Sampling. *International Dairy Federation, Standard 50C*, Brussels, Belgium.

INTERNATIONAL STANDARD – ISO 5764|IDF 108. Milk – Determination of freezing point – Thermistor cryoscope method (Reference method). 2009a.

INTERNATIONAL STANDARD – ISO 8196|IDF 128-1. Milk - Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis - Part 1: Analytical attributes of alternative methods. 2009b.

INTERNATIONAL STANDARD – ISO 8196|IDF 128-2. Milk - Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis - Part 2: Calibration and quality control in the dairy laboratory. 2009c.

KAYLEGIAN, K. E.; HOUGHTON, G. E.; LYNCH, J. M.; FLEMING, J. R.; BARBANO, D. M. Calibration of infrared milk analyzers: modified milk versus producer milk. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 2817-2832, 2006.

KAYLEGIAN, K. E.; LYNCH, J. M.; FLEMING, J. R.; BARBANO, D. M. Influence of fatty acid chain length and unsaturation on mid-infrared milk analysis. *American Dairy Science Association*, v. 92, p. 2485-2501, 2009.

KROGER, M. Milk sample preservation. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 783-787, 1985.

LEITE, M. O. Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol. 2006. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, M. C. P. P. Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): validação da análise do teor de ureia e de outros parâmetros de qualidade do leite. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RASMUSSEN, M. D.; BJERRING, M.; JUSTESEN, P.; JEPSEN, L. Milk quality on danish farms with automatic milking systems. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2869–2878, 2002.

REZENDE, P. S.; CARMO, G. P.; ESTEVES, E. G. Avaliação do efeito do congelamento de amostras de leite na determinação do índice de refração do soro cúprico. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, v. 6, n. 1, p. 9-15, 2015.

RIBEIRO, D. C. S. Z. Interferência dos adulterantes, sacarose e amido, na análise do leite cru por espectroscopia pela transformada de Fourier. 2017. 34f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RIBEIRO, D. C. S. Z.; TAVARES, W. L. F.; LEITE, M. O.; CERQUEIRA, M. O. P.; LIMA, J. S.; FERREIRA, L. F.; FEIJÓ, F. A. C.; HADDAD, J. P.; FONSECA, L. M. Adulterants interference on Fourier Transform Infrared analysis of raw milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 70, n. 5, p.1649-1654, 2018.

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. 2815-2819, 1997.

SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 4ª edição. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015. 265 p.

SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; CORRALES, J. C.; FE, C. de la; MORALES, C. T.; CONTRERAS, A.; GONZALO, C. Evaluation of the MilkoScan FT 6000 Milk Analyzer for determining the freezing point of goat's milk under different analytical conditions. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 7, p. 3153-3161, 2007.

SCHUKKEN, Y. H., FULTON, C. D., LESLIE, K. E. Freezing point of bulk milk in Ontario - an observational study. *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 12, p. 995-998, 1992.

SEŠĶĒNA, R.; JANKEVICA, L. Influence of chemical preservatives on the quality and composition indices of raw milk samples. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, v. 723, p. 171-180, 2007.

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

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M. CANÇADO, S. V.; FERRAZ, V. 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.

SJAUNJA, L. O. Studies on milk analysis of individual cow milk samples. *Acta Agricultura e Scandinavica*, v.34, p.249-259, 1984.

SLAGHUIS, B. A. The freezing point of authentic and original farm bulk tank milk in the Netherlands. *International Dairy Journal*, v. 11, p. 121-126, 2001.

UPADHYAY, N.; GOYAL, A.; KUMAR, A.; LAL GHAI, D.; SINGH, R. Preservation of milk and milk products for analytical purposes. *Food Reviews International*, v. 30, p. 203–224, 2014.

ZAGORSKA, J.; CIPROVICA, I. Evaluation of factors affecting freezing point of milk. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, v. 7, n. 2, p. 106-111, 2013.

ZAJÁC, P.; ZUBRICKÁ, S.; ČAPLA, J.; ZELENÁKOVÁ, L.; ŽIDEK, R.; ČURLEJ, J. Effect of preservatives on milk composition determination. *International Dairy Journal*, v. 61, p. 239-244, 2016.