

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

ESPECTROSCOPIA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

COMO MÉTODO DE TRIAGEM NA AVALIAÇÃO DA

CRIOSCOPIA DE LEITE

Erika Lopes Duarte

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2018

Erika Lopes Duarte

**ESPECTROSCOPIA POR TRANSFORMADA DE FOURIER COMO MÉTODO DE
TRIAGEM NA AVALIAÇÃO DA CRIOSCOPIA DE LEITE**

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

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de
Produtos de Origem Animal.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2018

D812e Duarte, Erika Lopes, 1992-
Espectroscopia por transformada de Fourier como método de triagem na avaliação da
crioscopia de leite / Erika Lopes Duarte. – 2018.
42 p. : il.

Orientador: Leorges Moraes da Fonseca
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Fourier, Espectroscopia por transformada de – Teses.
3. Crioscopia – Teses. 4. Pontos de congelamento – Teses. I. Fonseca, Leorges Moraes da.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637.1

FOLHA DE APROVAÇÃO

ERIKA LOPES DUARTE

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.

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Leorges Moraes da Fonseca
Presidente - Orientador



Prof^ª. Sandra Maria Pinto
Universidade Federal de Lavras - UFLA



Prof^ª. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Início meus agradecimentos a Jesus, meu Mestre e guia espiritual. Agradeço por ter me dado vida e saúde para correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus pais, Valdir e Edilene, que sempre primaram pela minha educação e fizeram inúmeros sacrifícios para que eu pudesse estar onde estou hoje. Obrigada por todo suporte e incentivo, mesmo diante de todas as dificuldades e limitações. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.

Ao meu irmão, Jasson, pela amizade, parceria e por ser minha inspiração em como levar a vida mais leve e ter paciência nos momentos difíceis.

A minha querida vó Luzia (*in memorian*), por todas as orações, por vibrar comigo a cada conquista, pelas palavras carinhosas e serenas.

Ao meu namorado, Rafael, por todo amor, companheirismo e compreensão. Muito obrigada pela força nos momentos difíceis, por ser tão atencioso e por ter estado ao meu lado nessa fase importante da minha vida. Agradeço também a família do meu namorado, Luiza, Natália, Cacau e Vinícius, pelo auxílio e carinho. Me senti muito bem acolhida em Belo Horizonte por vocês. Vocês são minha segunda família.

As minhas amigas que conquistei durante o mestrado, que conviveram e compartilharam muitos momentos comigo e que fizeram das quartas-feiras sem lei um dos melhores dias da semana. Então, agradeço a Juliana, pela contribuição imensa em diversos momentos, desde a minha busca pelo programa de mestrado até a execução do experimento. Agradeço também pela ótima companhia do dia a dia, por se fazer tão presente quando eu mais preciso. A Kátia pela sua alegria contagiante, pela boa sintonia, pelas conversas intermináveis e por se mostrar disposta a me ajudar. A Mariana por sempre me auxiliar independente das circunstâncias, pelas palavras maduras e sinceras. A Verônica por ter nos proporcionado momentos tão divertidos e animados.

Ao meu orientador, prof. Dr. Leorges, pela paciência, pela confiança e por todo conhecimento transmitido.

Aos meus amigos Jardel, Wanderson, Aline, D^a Joana, Sr. Luíz, Wesley e Willian pelo incentivo, apoio e por acreditarem em mim.

A todos os funcionários do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG), em especial a Rose, Vanderlan, Tata e Fabiana, pela disponibilidade, simpatia e gentileza.

Ao técnico Marco Antônio pela assistência no laboratório de físico-química.

Ao prof. Dr. João Paulo Haddad pelo auxílio nas análises estatísticas.

Agradeço o apoio financeiro da FAPEMIG (CVZ-APQ-01179-14), CNPq (PQ-309801/2014-1) e FUNDEP/Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da EV-UFMG e a CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Relação entre Ponto de Congelamento (PC) e composição química do leite.....	11
3.2 Relação entre Ponto de Congelamento (PC) e Contagem de Células Somáticas (CCS)...	12
3.3 Fraudes em leite	13
3.3.1 Fraude por adição de água e reconstituintes de densidade	13
3.3.2 Fraude por adição de conservantes.....	14
3.3.4 Fraude por adição de neutralizantes de acidez	14
3.4 Crioscópio Eletrônico.....	15
3.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Local de realização do experimento.....	17
4.2 Primeira fase.....	18
4.2.1 Coleta das amostras	18
4.2.2 Preparo e análise das amostras	18
4.2.3 Análise estatística.....	20
4.3 Segunda fase.....	21
4.3.1 Análise estatística.....	22
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	23
5.1 Primeira fase.....	23
5.2 Segunda fase.....	32
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fator de correção e intervalo de confiança do PC obtido por Crioscópio Eletrônico e o FTIR	23
Tabela 2. Média e desvio padrão da composição do leite desnatado e integral adicionados de diferentes porcentagens de água	23
Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos resultados obtidos das análises do PC do leite desnatado e integral avaliados Crioscópio Eletrônico e FTIR	24
Tabela 4. Análise do modelo de regressão linear múltipla da variável PC do leite com diferentes porcentagens de água, tipo de leite e metodologia utilizada	26
Tabela 5. Média e desvio padrão dos teores de gordura das amostras do experimento 2 de acordo com o método de análise e porcentagens de creme adicionados	27
Tabela 6. Média e desvio padrão da composição do leite desnatado adicionados de diferentes porcentagens de gordura e água	27
Tabela 7. Valores médios e desvio padrão dos resultados obtidos de análises de gordura (FTIR) e análise do PC (Crioscópio Eletrônico e FTIR).....	28
Tabela 8. Análise do modelo de regressão linear múltipla da variável PC com diferentes porcentagens de água, porcentagens de gordura e metodologia utilizada.....	29
Tabela 9. Estatística descritiva a partir dos dados de amostras analisadas no LabUFMG com suspeita de fraude, nos meses de setembro e outubro de 2017 (n= 196)	32

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Curva característica do Ponto de Congelamento do leite 15
- Figura 2. Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier 17
- Figura 3. Esquema de preparo das amostras do experimento 1: adição de diferentes porcentagens de água no leite cru integral e leite desnatado, em frascos de 40 ml com conservante Bronolat..... 18
- Figura 4. Esquema de preparo das amostras do experimento 2: adição de diferentes porcentagens de creme e de água no leite desnatado, em frascos de 40 ml com conservante Bronolat 19
- Figura 5. Testes positivos (P) e negativos (N) de amostras de leite com conservante Bronolat para pesquisa de fraude de: (1) Açúcar, (2) Amido, (3) Cloretos, (4) Neutralizantes, (5) Formol e (6) Peróxido de Hidrogênio 22
- Figura 6. Linearidade do PC do de leite desnatado (A) e leite integral (B) adicionados de água e avaliados por Crioscópio Eletrônico e Espectroscopia de FTIR..... 25
- Figura 7. PC do leite desnatado adicionado de diferentes porcentagens de gordura e avaliado por meio de Crioscópio Eletrônico e Espectroscopia de FTIR..... 30
- Figura 8. PC do leite desnatado adicionado de diferentes porcentagens de água e gordura avaliado por Crioscópio Eletrônico* (A) e Espectroscopia de FTIR** (B)..... 31
- Figura 9. Distribuição do Ponto de Congelamento das amostras suspeitas analisadas no LabUFMG nos meses de setembro e outubro de 2017..... 33
- Figura 10. Fraudes encontradas nas amostras suspeitas analisadas no LabUFMG durante os meses de setembro e outubro de 2017 34
- Figura 11. Porcentagem de amostras com resultado positivo para análise de cloretos levando em consideração a relação entre o Ponto de Congelamento e Contagem de Células Somáticas. 35

RESUMO

O ponto de congelamento do leite está correlacionado com os componentes solúveis e pode ser um indicador de adição fraudulenta de água. O objetivo deste estudo foi investigar a interferência do teor de gordura do leite no ponto de congelamento obtido pelo infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), e avaliar a relação entre ponto de congelamento, componentes do leite e contagem de células somáticas (CCS). Uma fração de leite cru foi desnatada, obtendo creme e leite desnatado. Leite integral e desnatado foram adicionados com água (0, 2, 5, 10, 15 e 20%; experimento 1). O leite desnatado remanescente foi adicionado com creme (5, 10, 15, 20%) e água (0, 2, 5, 10, 15 e 20%; experimento 2). As amostras foram analisadas quanto ao ponto de congelamento (crioscópio eletrônico) e ponto de congelamento e composição (CombiScope FTIR, Delta Instruments). Além disso, 4.000 amostras de leite cru de tanque a granel com características anormais (ponto de congelamento, composição e SCC) foram selecionadas e analisadas quanto à adulteração (açúcar, amido, sal, formaldeído, neutralizantes e peróxido de hidrogênio). O ponto de congelamento analisado pelo FTIR foi altamente correlacionado com o método do crioscópio eletrônico (acima de 98,5%) e, como esperado, a adição de água foi significativa ($P \leq 0,001$) ao aumentar o ponto de congelamento do leite em ambos os métodos. No entanto, o alto teor de gordura no leite cru resultou em um ponto de congelamento decrescente ao usar o FTIR ($P \leq 0,001$). Cento e noventa e seis amostras (4,9%) foram rastreadas como suspeitas de um total de 4.000 amostras de leite cru de tanque rotineiramente analisadas no laboratório. Destes, 74,5% apresentaram ponto de congelamento acima de $-0,512$ ° C, indicando potencial adição fraudulenta de água. Apesar de açúcar, amido, neutralizadores ou inibidores não terem sido encontrados, altas concentrações de cloreto foram encontradas em 12,2% das amostras. No entanto, altos valores de CCS e ponto de congelamento foram encontrados em 7% das amostras. A CCS está correlacionada com alta concentração de cloreto. A maioria das amostras suspeitas apresentou adição fraudulenta de água, o que reforça a importância do monitoramento constante do ponto de congelamento do leite. Como a adição de água causou o efeito inverso do alto teor de gordura no ponto de congelamento medido pelo FTIR, é importante considerar o teor de gordura do leite para evitar interpretações errôneas do ponto de congelamento ao usar o método FTIR.

ABSTRACT

The milk freezing point is correlated with the soluble components and can be an indicator of fraudulent addition of water. The objective of this study was to investigate the interference of milk fat content upon the freezing point obtained by Fourier-transform infrared (FTIR), and to evaluate the relationship among freezing point, milk components, and somatic cell count (SCC). A fraction of raw milk was skimmed, obtaining cream and skim milk. Whole and skim milk were added with water (0, 2, 5, 10, 15, and 20%; experiment 1). The remaining skim milk was added with cream (5, 10, 15, 20%) and water (0, 2, 5, 10, 15, and 20%; experiment 2). Samples were analyzed for freezing point (thermistor cryoscope) and freezing point and composition (CombiScope FTIR, Delta Instruments). Additionally, 4,000 bulk tank raw milk samples with abnormal characteristics (freezing point, composition, and SCC) were screened and analyzed for adulteration (sugar, starch, salt, formaldehyde, neutralizers and hydrogen peroxide). Freezing point measured by FTIR was highly correlated with thermistor cryoscope method (above 98.5%) and, as expected, water addition was significant ($P \leq 0.001$) upon increasing milk freezing point in both methods. However, high fat content in raw milk resulted in decreasing freezing point when using FTIR ($P \leq 0.001$). One hundred and ninety-six samples (4.9%) were screened as suspect from a total of 4,000 bulk tank raw milk samples routinely analyzed in the laboratory. From these, 74.5% presented freezing point above -0.512°C , indicating potential fraudulent addition of water. Although sugar, starch, neutralizers or inhibitors were not found, high chloride concentrations were found in 12.2% of the samples. However, high values of SCC and freezing point were found in 7% of the samples. SCC is correlated with high chloride concentration. Most of the suspected samples presented fraudulent addition of water, which reinforces the importance of constant monitoring of the milk freezing point. Because water addition caused the inverse effect of high fat on freezing point measured by FTIR, it is important to consider the fat content of milk to avoid misinterpretation of freezing point when using FTIR method.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior produtor de leite no cenário mundial, atrás da União Europeia, Estados Unidos, Índia e China. O leite contribuiu com mais de 39 bilhões ao valor da produção agropecuária nacional em 2016, o que demonstra que a atividade desempenha um papel importantíssimo no sistema agroindustrial, gerando milhões de empregos e renda para a população (IBGE, 2016).

Com a crescente demanda por produtos lácteos de qualidade, que não ofereçam riscos para o consumidor, a cadeia produtiva de leite no Brasil tem passado por progressivas adaptações para se ajustar às exigências do mercado consumidor.

A implementação da Instrução Normativa 51 (IN 51) em 2002 foi um marco para a concretização de novas diretrizes no setor leiteiro (BRASIL, 2002). Para atender à demanda nacional, foi criada nesse mesmo ano, a Rede Brasileira de Laboratórios para o Controle da Qualidade do Leite (RBQL). Esses laboratórios contam com equipamentos eletrônicos modernos rápidos e precisos, com alta capacidade analítica.

Contudo, em dezembro de 2011, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa nº 62 (IN 62) (BRASIL, 2011) que alterou a IN 51. A IN 62 prorrogou os prazos para atender os limites de Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) no leite cru refrigerado. Em 2016, o MAPA estendeu os prazos por mais dois anos para CCS e CBT, por meio da Instrução Normativa 07 (IN 07) (BRASIL, 2016).

Devido à importância socioeconômica e nutricional do leite, suas características de integridade devem ser preservadas, o que motiva a investigação de desvios da sua composição natural. De acordo com a legislação vigente, a indústria laticinista deve realizar uma série de análises no leite entregue nos caminhões diariamente (BRASIL, 2011). Essas análises são muito importantes, pois, dependendo da alteração na matéria-prima, pode afetar a qualidade do produto final causando prejuízos para a indústria, colocar em risco a saúde do consumidor, bem como afetar a credibilidade da empresa no mercado.

Um dos parâmetros analíticos exigidos é o Índice Crioscópico (IC), também conhecido como Ponto de Congelamento (PC) ou Depressão do Ponto de Congelamento, que indica o ponto de congelamento do leite em relação ao da água. O PC é considerado um importante indicador da qualidade do leite, utilizado principalmente para verificar adulteração pela adição de água. Essa análise é utilizada praticamente em todo mundo por ser considerada uma técnica oficial precisa e os resultados apresentarem pouca variabilidade (SHIPE, 1959; MATYSEK *et al.*, 2011; ZAGORSKA E CIPROVICA, 2013).

A IN 62 estabelece um valor máximo de PC de $-0,530^{\circ}\text{H}$ (equivalente a $-0,512^{\circ}\text{C}$) e valor mínimo de $-0,550^{\circ}\text{H}$ (equivalente a $-0,531^{\circ}\text{C}$) (BRASIL, 2011). Porém, o novo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) alterou o limite mínimo para $-0,555^{\circ}\text{H}$, que equivale a $-0,536^{\circ}\text{C}$ (BRASIL, 2017).

O PC é uma medida diretamente ligada aos componentes solúveis do leite, em especial a lactose e cloretos. Considera-se que as proteínas e gordura não interferem no PC do leite, pois estão em solução coloidal e na forma de emulsão, respectivamente. Porém, alguns estudos verificaram que as proteínas podem promover variação no PC de forma indireta (HENNO *et al.* 2008; SALA *et al.*, 2010). Já em relação à gordura, existem poucos estudos com o objetivo de

verificar sua influência sobre o PC determinado por metodologia de referência ou alternativa, possivelmente por que os estudos até então não encontram correlação significativa (GENCUIROVA *et al.*, 2008; SENEVIRATHNE *et al.*, 2016).

Os Crioscópios Eletrônicos são utilizados como metodologia de referência para determinar o IC. No entanto, esse método apresenta algumas desvantagens por ser laborioso, gerando grande demanda de tempo para realizar análise de um único parâmetro. Por isso, muitos laboratórios de análise da qualidade do leite utilizam equipamentos eletrônicos, como os baseados na Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR – Fourier Transform Infrared), que possibilitam análise de multiparâmetros e de um grande número de amostras. Além disso, essa metodologia é eficiente, versátil e necessita de pouca mão de obra, além de pouca ou nenhuma preparação de amostra para análise, etc (OLIVEIRA, 2011).

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram:

- Verificar a interferência de diferentes teores de gordura e de adição de água ao leite na crioscopia avaliada por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e comparar os resultados com o método de referência utilizando-se Crioscópio Eletrônico,
- avaliar a crioscopia do leite em relação ao teor de componentes (lactose, proteína, gordura e sólidos totais) e à Contagem de Células Somáticas do leite cru.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Relação entre Ponto de Congelamento (PC) e composição química do leite

Julius Hortvet foi o pioneiro na utilização do PC como análise qualitativa em leite quando, em 1921, em seu trabalho original, utilizou um termômetro calibrado pelo *United States Bureau of Standards* para determinar o PC de solução de sacarose de 7% e de 10%. O autor concluiu que estes eram $-0,422^{\circ}\text{C}$ e $-0,621^{\circ}\text{C}$, respectivamente, e as soluções passaram a ser utilizadas na calibração de outros termômetros crioscópicos. Estudos posteriores observaram que o verdadeiro PC são $-0,408^{\circ}\text{C}$ e $-0,600^{\circ}\text{C}$, mas os valores de Hortvet já tinham sido consagrados internacionalmente, e então passou-se a utilizar as duas escalas, Hortvet ($^{\circ}\text{H}$) e Celsius ($^{\circ}\text{C}$) (HARDING, 1983).

A Federação Internacional de Laticínios utiliza a seguinte fórmula para conversão entre as escalas $^{\circ}\text{C}$ e $^{\circ}\text{H}$ (HARDING, 1983):

$$^{\circ}\text{C} = 0,96418^{\circ}\text{H} + 0,00085$$

$$^{\circ}\text{H} = 1,03711^{\circ}\text{C} - 0,00085$$

A composição química média do leite de vaca é: 87,4% de água, 3,9% de gordura, 3,2% de proteínas, 4,6% de lactose e 0,9% de sais minerais e esta pode variar conforme a raça, espécie, alimentação, estresse, tempo de gestação, mastite, dentre outros fatores (HARDING, 1995; HENNO *et al.*, 2008; TAFFAREL *et al.*, 2015). Acredita-se que o PC do leite é 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 PC pode diminuir, ou seja, se afastar de 0°C. Por outro lado, se houver adição de água, haverá a diluição dos componentes solúveis do leite e o PC tenderá a se aproximar do PC da água pura, que é 0°C.

Portanto, a crioscopia está intimamente relacionada com os componentes do leite que estão em solução verdadeira, principalmente a lactose e os cloretos, sendo responsáveis por 80% do total do PC. A lactose contribui com 55% do PC e os cloretos com 25%. O restante (20%) são outros constituintes dissolvidos na água do leite tais como ácido láctico, fosfatos, citratos, potássio, cálcio, magnésio, etc (BRATHEN, 1983; ZAGORSKA E CIPROVICA, 2013; FAGNANI *et al.*, 2014). Muitos estudos confirmam a contribuição do teor lactose sobre IC, como o realizado por Hanus *et al.* (2015) que encontraram correlação altamente significativa, -0,764 ($p < 0,001$), entre o PC e conteúdo de lactose. Santana *et al.* (2015) também verificaram que a crioscopia diferiu significativamente com o teor de lactose no leite ($p < 0,05$). Os autores observaram que, com o aumento da porcentagem de lactose, o PC diminuiu.

Acredita-se que as proteínas e gordura não interfiram no PC do leite por estarem em solução coloidal e em forma de emulsão, respectivamente. Algumas pesquisas confirmam que não há qualquer interferência provocada pelo teor de gordura sobre o PC, como a realizada por Senevirathne *et al.* (2016) que não encontraram diferenças significativas entre PC do leite contendo diferentes teores de gordura avaliado por meio de Crioscópio Eletrônico.

Em contrapartida, o teor de proteínas parece promover variação no PC do leite de forma indireta. Henno *et al.* (2008) e Sala *et al.* (2010) observaram que houve aumento no PC do leite com baixo teor de proteína. Segundo Gaucheron (2005), isso acontece por que a composição mineral pode ser influenciada pela concentração de proteínas. Ule *et al.* (2016) mostraram que o aumento de 0,1% do teor de proteínas lácteas pode resultar na diminuição de 0,00069 °C no PC.

3.2 Relação entre Ponto de Congelamento (PC) e Contagem de Células Somáticas (CCS)

As células somáticas são compostas principalmente por células brancas ou leucócitos (75% a 98% do total de células) e células epiteliais (2% a 25% do total de células). As células brancas migram do sangue para o úbere em resposta a danos no tecido, como infecções e lesões, e as células epiteliais são oriundas do desprendimento do tecido de revestimento e secretor da glândula mamária (RIBAS, 2001; PHILPOT E NICKERSON, 2002).

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária provocada principalmente por microrganismos. Essa doença pode se manifestar de duas formas: mastite clínica, em que é possível verificar sinais evidentes da inflamação, e subclínica, que é a mais importante, por ausência de sinais clínicos. Quando algum agente patogênico invade a glândula mamária, o organismo do animal envia células de defesa (leucócitos) para tentar reverter o processo infeccioso. As células de defesa, somadas as células epiteliais, são chamadas de células somáticas, como já definido. Por isso, a CCS é de fundamental importância para a avaliação da qualidade do leite, utilizada como indicador de mastite subclínica. Dessa forma, quando há inflamação da glândula mamária, a CCS aumenta. A CCS pode ser mensurada no leite proveniente de quartos individuais, vacas individuais, todo o rebanho ou um grupo de rebanhos (PHILPOT E NICKERSON, 2002).

Como consequência do aumento da CCS, há alterações nos componentes do leite, como a diminuição da concentração de caseína, lactose e potássio e o aumento da concentração de

sódio, cloro e proteínas do soro (RIBAS, 2001). Além disso, há aumento da atividade proteolítica e lipolítica do leite. Essas alterações resultam em impactos importantes para o produtor e para as indústrias de laticínios, interferindo de forma negativa na qualidade, rendimento e vida de prateleira dos produtos lácteos (GARGOURI *et al.*, 2013).

Sendo assim, como PC e CCS estão relacionados com a composição do leite, a relação entre os dois parâmetros é objeto de vários estudos. No trabalho de Matysek *et al.* (2011), os autores observaram que o leite com CCS maior do que 400.000 CS/mL apresentou PC um pouco mais baixo do que o leite com CCS menor do que 400.000 CS/mL. Silva *et al.* (2012) encontraram valores mais baixos de PC em amostras com CCS elevada (>750.000 CS/mL), indicando alteração na composição do leite.

3.3 Fraudes em leite

De acordo com o RIISPOA, são consideradas fraudadas, as matérias-primas ou produtos que tenham sido privados parcial ou totalmente de seus componentes, adicionados de ingredientes, aditivos, coadjuvantes de tecnologia ou substâncias de qualquer natureza (BRASIL, 2017).

3.3.1 Fraude por adição de água e reconstituintes de densidade

Um dos fatores que mais interferem no PC do leite é a adição fraudulenta de água com o objetivo de aumentar seu volume. Infelizmente esta prática é ainda muito utilizada e é realizada de forma isolada ou associada a outras substâncias que compensam a alteração do PC. Essas substâncias são denominadas reconstituintes da densidade, a exemplo do sal, açúcar, farinha, amido, entre outros. A adição de água reduz a densidade do leite e aumenta seu PC porque dilui as concentrações dos componentes que estão em solução na água do leite, enquanto a adição de reconstituintes produz o efeito inverso (TRONCO, 1997).

Fraudes por adição de água e reconstituintes de densidade podem ser detectadas por análises rotineiras de crioscopia e 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. Por isso, a legislação orienta que seja feita diariamente a pesquisa de reconstituintes da densidade no leite cru refrigerado (BRASIL, 2011).

Silva *et al.* (2008) coletaram 348 amostras de leite pasteurizado tipo C em 17 miniusinas durante o período de 12 meses no estado de Alagoas. Estes autores verificaram que o PC de 89 (25,6%) amostras não atendeu aos padrões exigidos pela legislação, podendo ser indício de fraude por adição de água. Mendes *et al.* (2010) observaram que 50% das amostras de leite informal comercializadas na cidade de Mossoró/RN apresentaram valores de crioscopia em desacordo com a legislação vigente, seguida do Extrato Seco Desengordurado (ESD) (40,6%), Extrato Seco Total (EST) (21,9%), densidade (18,8%) e acidez (6,2%). Júnior *et al.* (2013) avaliaram a qualidade do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. Na avaliação do PC, foram encontrados 8,10% do total de 74 amostras com valores mais próximos de zero em relação ao padrão de $-0,530^{\circ}\text{H}$, indicando a adição de água. Estes mesmos autores observaram que 13 (17,56%) do total de amostras apresentaram PC mais baixo que $-0,550^{\circ}\text{H}$. Dessas, 11 (84,61%) estavam ácidas. As outras duas (15,39%) amostras provavelmente estavam fraudadas com água e reconstituintes. Silva J. *et al.* (2015) coletaram amostras de leite de três usinas de beneficiamento do Rio Grande do Norte que fazem parte do Programa do Leite e verificaram que 100% dos resultados de PC encontrados apresentaram valores superiores ao permitido, indicando fraude no leite por adição de água.

A água, além de reduzir de forma significativa o valor nutritivo do leite, por diluir seus componentes naturais, prejudica a qualidade microbiológica do mesmo dependendo das condições em que a água foi obtida. Quando o leite é contaminado por microrganismos e manipulado de maneira inadequada, uma das principais alterações que ocorre é o aumento da acidez. O desenvolvimento da acidez ocorre devido à fermentação da lactose em ácido lático, e conseqüentemente pode precipitar as proteínas do leite (JAY, 1996; BECHI, 2003). A adição fraudulenta de água não só prejudica economicamente a indústria de leite e derivados, como também reflete a falta de comprometimento com a produção de leite com qualidade para o consumidor (BECHI, 2003).

3.3.2 Fraude por adição de conservantes

Quando os procedimentos higiênico-sanitários não são realizados de maneira adequada durante a ordenha, o leite pode apresentar alta carga microbiológica que, por sua vez, pode alterar o pH e a acidez titulável. Durante a recepção do leite nos laticínios, os testes realizados são capazes de detectar facilmente essas alterações provocadas pela elevada carga microbiológica, e o leite pode ser recusado devido à perda de qualidade. Por isso, a fim de possibilitar a aceitação do leite pela indústria, são praticadas ações ilegais que envolvem as fraudes por adição de conservantes como formol, peróxido de hidrogênio, cloro e hipocloritos, que têm por objetivo reduzir ou eliminar microrganismos presentes no leite (TRONCO, 2008).

Firmino *et al.* (2010) verificaram presença de formol em 13% das amostras analisadas em leite cru dos tanques de expansão na região de Rio Pomba, Minas Gerais. Rosa-Campos *et al.* (2011) analisaram 72 amostras de leite pasteurizado tipo C de oito marcas produzidas no Distrito Federal entre janeiro e dezembro de 2010 e verificaram que nenhuma marca apresentou fraude por adição de formol, porém, aproximadamente 10% apresentaram adição de peróxido de hidrogênio. Souza *et al.* (2011) coletaram 100 amostras de leite UAT processado em plantas industriais localizadas em diferentes estados do Brasil e detectaram 44% das amostras positivas para presença de formaldeído, 30% positivas para peróxido de hidrogênio e 12% para cloro. O cloro e o hipoclorito são os sanitizantes mais comumente utilizados em propriedades leiteiras e laticínios, devido a sua alta eficiência e baixo custo e por isso, esses autores afirmaram que o cloro pode ter sido encontrado, provavelmente, por falhas durante a higienização dos equipamentos utilizados tanto na ordenha como na indústria.

O leite adulterado com conservantes não só indica um produto de baixa qualidade, comercializado sem o conhecimento do consumidor, mas também pode oferecer riscos à saúde pública. O formol é considerado cancerígeno pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) desde junho de 2004. Segundo a agência reguladora, mesmo em baixas concentrações, o formol apresenta riscos à saúde, pois a substância não possui uma dose segura de exposição (ANVISA, 2013).

3.3.4 Fraude por adição de neutralizantes de acidez

A qualidade microbiológica do leite está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com a relação entre o binômio tempo/temperatura em que o leite é armazenado. Por sua vez, a produção de ácido lático no leite ocorre principalmente pela multiplicação de microrganismos que fermentam a lactose. Conseqüentemente, o leite contaminado apresenta alta acidez titulável quando analisado, o que causa recusa do leite nas indústrias (JAY, 1996).

A neutralização ilegal da acidez do leite pode ser realizada utilizando hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, citrato de sódio, entre outros produtos alcalinos que ocultam a acidez titulável do leite (MILAGRES, 2008).

O uso de neutralizantes de acidez no leite foi reportado por Rosa-Campos *et al.* (2011) que encontraram bicarbonato de sódio em cinco marcas de leite pasteurizado, de um total de oito marcas produzidas no Distrito Federal entre janeiro e dezembro de 2010. Barham *et al.* (2014), encontram em um total de 100 amostras de leite cru, 20% fraudadas com hidróxido de sódio.

3.4 Crioscópio Eletrônico

A metodologia de referência utilizada para determinar o ponto de congelamento do leite é por meio de Crioscópios Eletrônicos (IDF, 2009). Nesse método, 2,5 ml de leite são pipetados e transferidos para um tubo de ensaio limpo e seco, que posteriormente é colocado no crioscópio previamente calibrado. Ao iniciar a análise, a sonda e o homogeneizador são introduzidos na amostra e o tubo de ensaio abaixa para dentro do banho refrigerante. A amostra é agitada para que essa não congele antes de atingir -3°C . A partir do momento em que essa temperatura for alcançada, uma forte agitação é aplicada fazendo com que a amostra libere calor de fusão. Esse processo fará com que a temperatura aumente até atingir seu ponto de congelamento, permanecendo assim durante um determinado tempo, denominado *plateau* (Figura 1) (IAL, 2008; IDF, 2009).

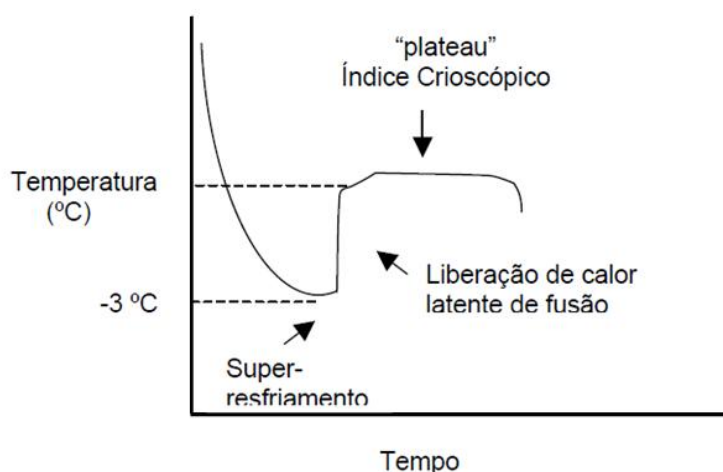


Figura 1. Curva característica do Ponto de Congelamento do leite.

Fonte: SILVA, (2002)

3.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

As metodologias de referência para determinação da crioscopia e composição do leite são limitadas, pois os aparelhos possuem reduzida capacidade analítica. A espectroscopia no infravermelho se tornou uma alternativa interessante por ser um método rápido e preciso.

Esse método fundamenta-se nas mudanças de estados energéticos vibracionais causados pela interação da radiação eletromagnética com a matéria na região do infravermelho, que apresenta comprimentos de onda que vão de aproximadamente de $0,78$ a $1000\ \mu\text{m}$. Essa faixa é dividida em três áreas: a radiação no infravermelho próximo (NIR – Near Infrared), que compreende o

intervalo entre 0,78 a 2,5 μm ; a radiação no infravermelho médio (Middle Infrared), que vai de 2,5 a 50 μm ; e a radiação no infravermelho distante (FIR – Far Infrared), que abrange a faixa de 50 a 1000 μm (HSU, 1997). A absorção de radiação infravermelha, em diferentes comprimentos de ondas, permite obter informações químicas qualitativas, quantitativas e físicas, as quais são intrínsecas de cada átomo e molécula (STUART, 2004).

A espectroscopia de infravermelho próximo e médio é muito utilizada para determinar constituintes do leite (RODRIGUEZ-OTERO *et al.*, 1997; STUART, 2004; RODRIGUEZ-SAONA *et al.*, 2006). Os grupos químicos específicos dos diferentes componentes do leite, como gordura, proteína e lactose, absorvem diferentes comprimentos de onda. A gordura absorve radiação no comprimento de onda de 5,73 μm através dos grupos carbonila (C=O) das ligações éster dos triglicerídeos, as proteínas 6,46 μm através dos grupos amida (CONH) das ligações peptídicas e a lactose 9,53 μm através dos grupos hidroxila (OH) (IDF, 1991 apud OLIVEIRA, 2011). Os sólidos totais podem ser obtidos pelo somatório do conteúdo de proteína, gordura e lactose, acrescidos de uma constante de minerais, ou por meio da absorção da radiação no comprimento de onda 4,3 μm dos grupos hidroxilas da água (BIGGS *et al.*, 1987).

Os equipamentos de infravermelho não fazem leitura direta do PC do leite, mas calculam os componentes que contribuem para esse parâmetro. A concentração 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 no PC do leite. Utilizando-se a Regressão Linear Múltipla entre o PC, 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 PC (ARNVIDARSON *et al.*, 1998; DELTA INSTRUMENTS, 2005, 2008).

A espectroscopia por infravermelho ganhou impulso com o surgimento da espectroscopia com transformada de Fourier e a utilização do interferômetro de Michelson, que tornou a técnica ainda mais rápida (SALIBA *et al.*, 2003). Hoje essa metodologia faz parte da rotina dos laboratórios de análise da qualidade do leite. O interferômetro de Michelson consiste basicamente em dois espelhos (um fixo e um móvel) e um divisor de feixes (espelho semitransparente). A radiação proveniente da fonte incide sobre o divisor de feixes que transmite metade da radiação para o espelho móvel e reflete a outra metade para o espelho fixo. Os espelhos refletem os dois feixes para o divisor e recombinam-se. Mas as diferenças de caminhos dos dois feixes causam interferências que podem ser tanto construtivas como destrutivas. Se os dois espelhos se encontram equidistantes do divisor, combinam-se construtivamente, porém se o espelho móvel se mover a determinadas distâncias do divisor, as amplitudes combinam-se destrutivamente. O feixe resultante passa pela amostra e em seguida, é redirecionado para o detector. Para a radiação no infravermelho (policromática), a soma de todas as interações construtivas e destrutivas para cada componente resulta num sinal complexo chamado de interferograma. Como o interferograma não pode ser interpretado, é empregada a técnica matemática chamada de Transformada de Fourier que converte os dados obtidos no interferômetro em um espectro que relaciona a intensidade *versus* frequência (número de onda) (Figura 2) (BOUIS, 1997; STUART, 2004; HELFER *et al.*, 2006).

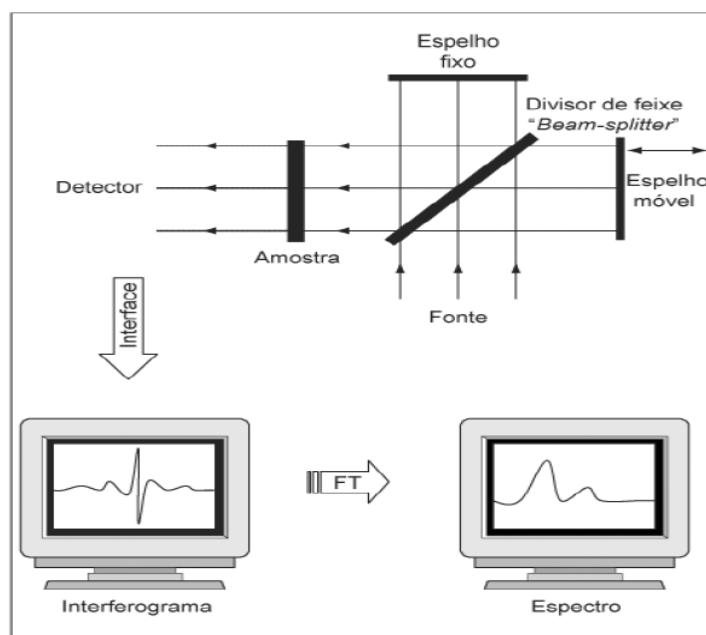


Figura 2. Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier.

Fonte: HELFER *et al.* (2006)

Silveira *et al.* (2004) compararam os métodos de referência com analisador de infravermelho para determinação de componentes do leite (gordura, proteína, lactose e sólidos totais). Os autores verificaram que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os valores das duas análises e que a análise por infravermelho pode ser utilizada com segurança na avaliação da composição do leite bovino.

Quanto à análise do ponto de congelamento do leite, Araújo *et al.* (2011) compararam metodologias de referência (Crioscópio Eletrônico) com a alternativa (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier) sob diferentes condições de conservação do leite bovino cru. Os autores utilizaram análise de regressão linear para avaliarem as metodologias quanto aos resultados do ponto de congelamento em função das idades das amostras (0, 3, 6 e 9 dias). Essa pesquisa constatou forte correlação entre os resultados do ponto de congelamento para as duas metodologias e coeficientes de regressão significativos ($p < 0,001$).

Sánchez *et al.* (2007) compararam a metodologia por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com a metodologia de referência para análise do PC em leite de cabras sob diferentes condições de conservantes químicos e adição de água nas amostras. Os autores concluíram que a nova metodologia é interessante devido à alta repetibilidade e precisão do equipamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório Piloto de Laticínios, no Laboratório de Análises Físico-Químicas do Leite e no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de

Veterinária da UFMG (LabUFMG). O LabUFMG faz parte da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), credenciado junto ao MAPA e acreditado de acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

4.2 Primeira fase

4.2.1 Coleta das amostras

As amostras de leite utilizadas para o experimento consistiram de leite cru de conjunto, coletadas em tanque refrigerador, proveniente das vacas da Fazenda Experimental da EV-UFMG, localizada no município de Igarapé, Minas Gerais.

O experimento foi realizado em cinco repetições, em que em cada uma foram utilizados 15 litros de leite cru integral. O leite foi homogeneizado, transferido para recipientes previamente sanitizados com cloro a 200 ppm, transportado e armazenado em câmara fria sob refrigeração (4°C) no LabUFMG.

4.2.2 Preparo e análise das amostras

Antes de iniciar, foi realizada a análise da acidez titulável em cada repetição, de acordo com a Instrução Normativa 68 (IN 68) (BRASIL, 2006). Em seguida, foi realizado o preparo das amostras do experimento 1, conforme descrito na Figura 3.

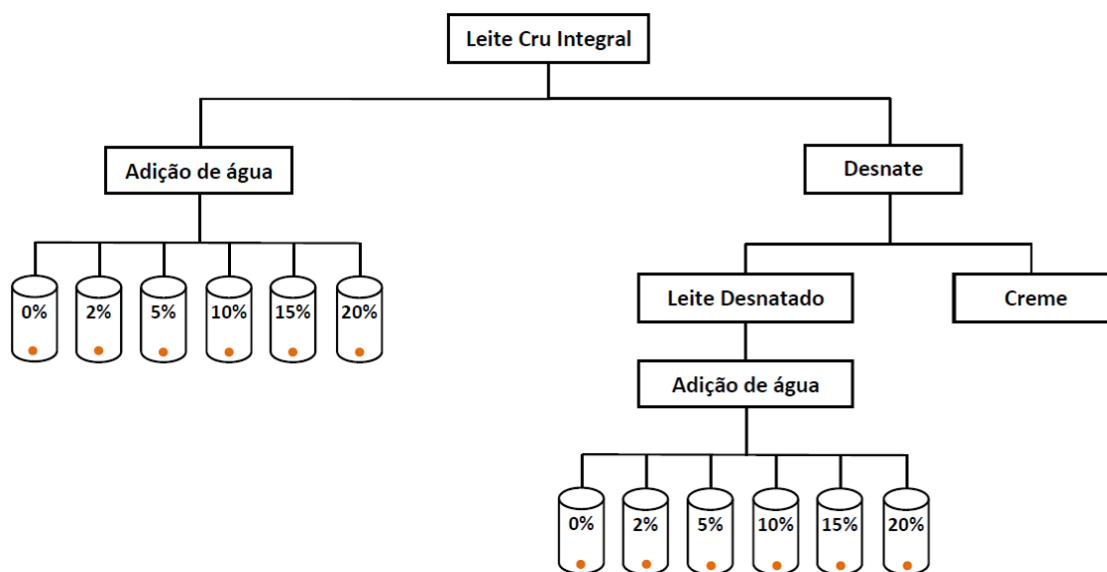


Figura 3. Esquema de preparo das amostras do experimento 1: adição de diferentes porcentagens de água no leite cru integral e leite desnatado, em frascos de 40 ml com conservante Bronolat.

Aproximadamente 95% do volume total do leite cru integral foram aquecidos até 40°C e submetidos por centrifugação mecânica (desnatadeira) para separação da fase gordurosa, obtendo-se leite desnatado e creme. Uma porção do leite desnatado e uma parcela dos 5% restantes do leite cru integral foram adicionadas de diferentes porcentagens de água (0, 2, 5, 10, 15 e 20%) em 12 frascos no total, com capacidade de 40 ml e com conservante Bronolat

(comprimidos contendo 8 mg de bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol), 0,4 mg de natamicina, 0,5 mg de corante amarelo crepúsculo e excipiente) (experimento 1).

O experimento 2 foi realizado com a outra parte do leite desnatado, que foi subdividido e transferido para 24 frascos de 40 ml com conservante Bronolat, adicionados de diferentes porcentagens de creme (5, 10, 15 e 20% de creme que continha em média 2,5, 5, 7,4 e 9,9% de gordura respectivamente) e de água (0, 2, 5, 10, 15 e 20%) (Figura 4).

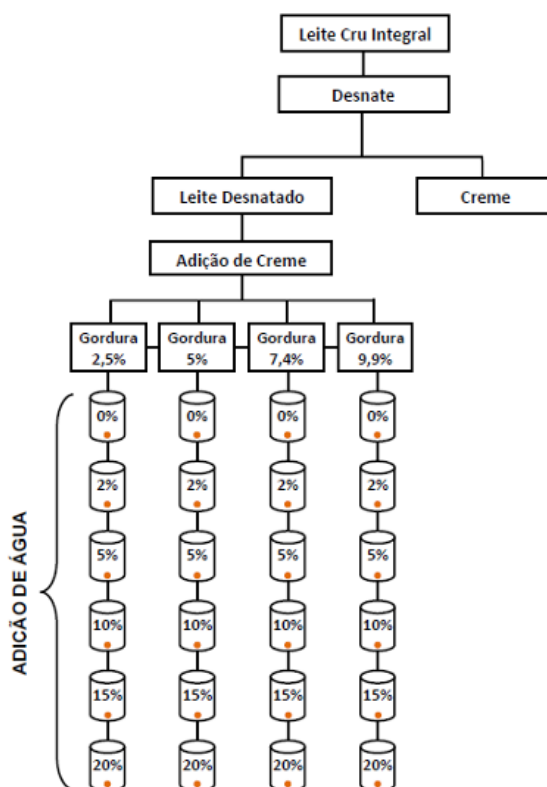


Figura 4. Esquema de preparo das amostras do experimento 2: adição de diferentes porcentagens de gordura e de água no leite desnatado, em frascos de 40 ml com conservante Bronolat.

As amostras foram homogeneizadas por inversão e armazenadas de um dia para o outro em câmara fria com temperatura de 4°C para que o conservante utilizado (Bronolat) dissolvesse adequadamente. No dia seguinte, as amostras foram retiradas da câmara fria, seguido de homogeneização por inversão. Posteriormente foram analisadas quanto ao PC pela metodologia de referência utilizando-se Crioscópio Eletrônico LK – 7000 (Laktron, Londrina, PR), previamente calibrado com soluções padrão de cloreto de sódio (-0,422°H; -0,530°H e -0,621°H), conforme Brasil (2003).

Em seguida, as réplicas das mesmas amostras foram pré-aquecidas por exatamente 20 minutos no banho-maria, a uma temperatura de 40±2°C, homogeneizadas por inversão e analisadas quanto ao PC e composição (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais), utilizando um espectrômetro LactoScope™ FTIR (DELTA INSTRUMENTS, 2007).

A calibração do equipamento LactoScope™ FTIR foi realizada por meio de 14 amostras padrão de leite cru com diferentes faixas de composição para gordura, proteína, lactose e extrato seco total. A calibração foi feita utilizando-se o programa de calibração do próprio equipamento. As amostras padrão foram fornecidas pelo laboratório Valacta (Dairy Production Centre of Expertise, Quebec, Canadá). A calibração para leitura da crioscopia foi feita com amostras-padrão fornecidas pelo laboratório DQCI SERVICES (Dairy Quality Control Incorporated, Estados Unidos), credenciado pela Secretaria de Agricultura do Estado de Mineápolis dos Estados Unidos. As amostras padrão foram fornecidas juntamente com os laudos contendo os resultados das análises realizadas no laboratório de origem.

Foi determinado o teor de gordura do creme, utilizando o método de referência (butirométrico) para creme de leite de acordo com a IN 68 (BRASIL, 2006). A partir do teor de gordura do creme, foi estimada a quantidade de gordura para cada porcentagem de creme (5, 10, 15 e 20%) adicionado nas amostras do experimento 2.

4.2.3 Análise estatística

Foi realizada análise de regressão linear múltipla, com significância de 95%, para os dois experimentos, aplicada através do pacote estístico Stata 12.0 (STATA CORP., 2011). A variável dependente foi o PC e as variáveis independentes foram tipo de leite, porcentagem de água e metodologia (para o experimento 1), e porcentagem de gordura, porcentagem de água e metodologia (para o experimento 2). As equações de regressão linear múltipla para os experimentos foram:

Experimento 1:

$$PC = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 L + \beta_3 M + \beta_4 LM + \varepsilon$$

PC= Ponto de congelamento

β_0 = Constante

β_1 = Coeficiente de regressão dos teores de água (A) que vão de 0% a 20%

β_2 = Coeficiente de regressão do tipo de leite (L), onde 0 (zero) é leite desnatado e 1 (um) é leite cru integral

β_3 = Coeficiente de regressão da metodologia (M), onde 0 (zero) é a metodologia de referência (Crioscópio Eletrônico) e 1 (um) é através da metodologia de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

β_4 = Coeficiente de regressão da interação entre tipo de leite e metodologia

ε = Erro

Experimento 2:

$$PC = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 G + \beta_3 M + \beta_4 GM + \varepsilon$$

PC= Ponto de Congelamento

β_0 = Constante

β_1 = Coeficiente de regressão dos teores de água (A) que vão de 0% a 20%

β_2 = Coeficiente de regressão dos teores de gordura (G) que vão de 2,5% a 11,03%

β_3 = Coeficiente de regressão da metodologia (M), onde 0 (zero) é a metodologia de referência (Crioscópio Eletrônico) e 1 (um) é através da metodologia de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

β_4 = Coeficiente de regressão da interação entre teores de gordura e metodologia

ε = Erro

Foram calculados fatores de correção para eliminação do efeito da adição do conservante Bronolat nos resultados do PC pela metodologia de referência e alternativa. Foi utilizada comparação de pares (teste t) e calculados os intervalos de confiança com significância de 95%, utilizando o programa estatístico Stata 12.0 (STATA CORP., 2011).

A análise de variância foi utilizada para comparar os teores de gordura obtidos pelo método de referência e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier em cada porcentagem de creme adicionado (5, 10, 15 e 20%), utilizando o pacote estatístico Minitab 18.0.

4.3 Segunda fase

Foram avaliados os resultados de quatro mil (4000) amostras de leite cru analisadas no LabUFMG, nos meses de setembro e outubro de 2017.

O equipamento utilizado foi um espectrômetro LactoScope™ FTIR para análise do PC e composição (lactose, proteína, gordura e sólidos totais) e um citômetro de fluxo SomaScope™ FTIR para CCS.

As amostras suspeitas, isto é, com crioscopia, composição e contagem de células somáticas anormais, foram analisadas para verificar possíveis fraudes.

As análises de fraude por adição de sacarose (com resorcina) e formol (com floroglucina) foram realizadas segundo as metodologias adotadas pelo Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA) (BRASIL, 1981).

As análises de sal, amido, peróxido de hidrogênio (método A: óxido de vanádio) e neutralizantes de acidez (método A: com ácido rosólico) foram realizadas de acordo com a IN 68 (BRASIL, 2006).

O volume de amostras que são encaminhadas dos laticínios para o LabUFMG possuem volume aproximado de 40ml. Ao serem analisadas através do método de triagem de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, o volume restante da amostra é baixo, o que dificulta a análise de todas as fraudes propostas. Por isso as metodologias utilizadas para análise de fraude foram adaptadas, diminuindo-se proporcionalmente o volume das amostras e dos reagentes.

Como os testes de fraude realizados são colorimétricos, a adição do conservante Bronolat altera a cor resultante na análise. Por isso, foi realizado teste positivo e negativo para leitura dos resultados. Foi coletado leite cru integral em tanque refrigerador, das vacas da Fazenda Experimental da EV-UFMG e adicionados de conservante Bronolat. Uma parte foi reservada para teste negativo e a outra parcela das amostras foi fraudada com a porcentagem mínima de detecção das análises (SILVA *et al.*, 2011; SILVA, 2013; SILVA L. *et al.*, 2015) sendo estas porcentagens de 0,5% de açúcar, 0,01% de amido, 0,1% de sal, 0,05% de neutralizante de acidez, 0,17% de peróxido de hidrogênio e 0,005% de formol (Figura 5).

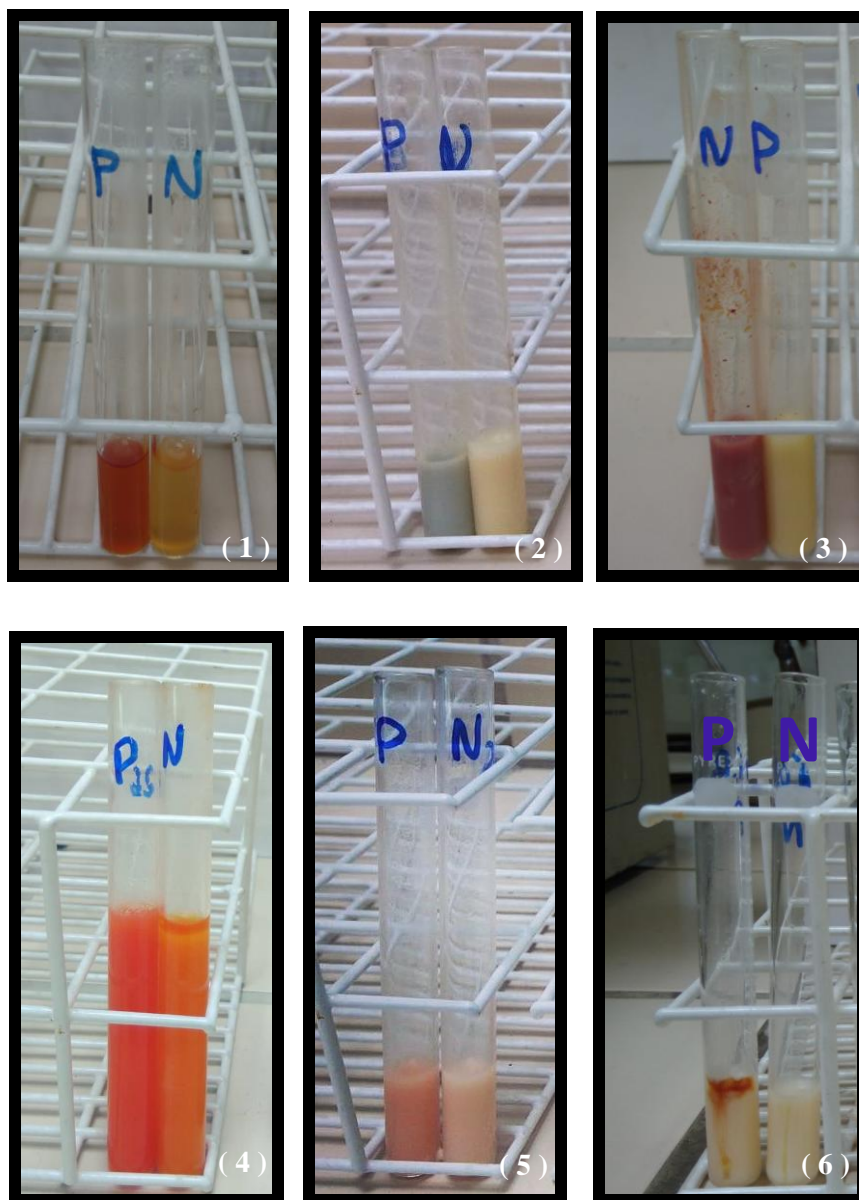


Figura 5. Testes positivos (P) e negativos (N) de amostras de leite com conservante Bronolat para pesquisa de fraude de: (1) Açúcar, (2) Amido, (3) Cloretos, (4) Neutralizantes, (5) Formol e (6) Peróxido de Hidrogênio.

4.3.1 Análise estatística

A relação entre crioscopia, teor de componentes e CCS do leite cru foi avaliada por meio da estatística descritiva, sendo que os resultados de CCS foram transformados em logaritmo para obtenção de distribuição mais próxima à normal.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Primeira fase

O resultado médio da acidez titulável do leite foi de $15,2^{\circ}\text{D} \pm 0,59$ (graus Dornic), o que demonstra que o leite estava em bom estado de conservação. O resultado encontrado está de acordo com a legislação brasileira vigente, que estabelece que a acidez titulável esteja entre 14 a 18°D (BRASIL, 2011).

Na Tabela 1, estão apresentados os intervalos de confiança e os fatores de correção para corrigir os efeitos da adição do conservante Bronolat sobre o PC do leite nas duas metodologias. O fator de correção para o crioscópio eletrônico foi de $0,006^{\circ}\text{C}$ enquanto que, para o FTIR, o fator de correção foi de $0,005^{\circ}\text{C}$.

Tabela 1. Fator de correção e intervalo de confiança do PC obtido por Crioscópio Eletrônico e o FTIR

Metodologia analítica	N	Média ¹ PC ($^{\circ}\text{C}$)	IC ² (95%)
Crioscópio Eletrônico ³	15	0,006	0,005 0,007
FTIR ⁴	15	0,005	0,004 0,006

¹Média da diferença calculada a partir dos valores de PC com e sem adição de conservante Bronolat.

²Intervalo de Confiança em nível de 95%. ³Crioscópio Eletrônico (LK – 7000, Laktron). ⁴Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (LactoScopeTM FTIR).

A composição média do leite desnatado e leite integral diminuíram com o aumento da porcentagem de água adicionada (Tabela 2). Quando há incorporação de água no leite, há diluição da concentração dos seus componentes, o que causa perda de qualidade nutricional. Os teores de gordura, proteína e sólidos totais do leite desnatado e integral se mantiveram dentro dos padrões legais exigidos pela legislação brasileira até a adição de 10% de água. Esse fato reforça a importância de análises complementares, como a crioscopia, para detectar possíveis fraudes, visto que o leite pode ser fraudado com água e ainda apresentar resultados de composição dentro dos limites mínimos estabelecidos.

Tabela 2. Média e desvio padrão da composição do leite desnatado e integral adicionados de diferentes porcentagens de água

Água (%)	Leite	Gordura (g/100g)	Lactose (g/100g)	Proteína (g/100g)	Sólidos Totais (g/100g)
0	Desnatado	$0,23 \pm 0,01$	$4,91 \pm 0,036$	$3,35 \pm 0,057$	$9,38 \pm 0,08$
	Integral	$4,09 \pm 0,73$	$4,69 \pm 0,036$	$3,27 \pm 0,061$	$12,79 \pm 0,79$
2	Desnatado	$0,22 \pm 0,01$	$4,79 \pm 0,033$	$3,29 \pm 0,059$	$9,20 \pm 0,09$
	Integral	$3,88 \pm 0,68$	$4,59 \pm 0,022$	$3,20 \pm 0,054$	$12,65 \pm 0,68$
5	Desnatado	$0,22 \pm 0,01$	$4,64 \pm 0,022$	$3,19 \pm 0,062$	$8,94 \pm 0,08$
	Integral	$3,74 \pm 0,67$	$4,44 \pm 0,028$	$3,11 \pm 0,054$	$12,27 \pm 0,66$
10	Desnatado	$0,21 \pm 0,01$	$4,38 \pm 0,022$	$3,03 \pm 0,056$	$8,52 \pm 0,08$
	Integral	$3,61 \pm 0,61$	$4,19 \pm 0,022$	$2,95 \pm 0,052$	$11,75 \pm 0,62$
15	Desnatado	$0,21 \pm 0,01$	$4,12 \pm 0,015$	$2,87 \pm 0,056$	$8,10 \pm 0,08$
	Integral	$3,41 \pm 0,58$	$3,94 \pm 0,026$	$2,80 \pm 0,050$	$11,15 \pm 0,59$
20	Desnatado	$0,20 \pm 0,01$	$3,85 \pm 0,024$	$2,71 \pm 0,048$	$7,69 \pm 0,08$
	Integral	$3,22 \pm 0,54$	$3,69 \pm 0,027$	$2,64 \pm 0,049$	$10,55 \pm 0,54$

O PC está diretamente relacionado com os sólidos totais do leite, principalmente em relação aos teores de lactose e cloretos. Por isso, quando há adição de água, mesmo em pequenas quantidades, o PC se aproxima de zero graus Celsius (ZAGORSKA E CIPROVICA, 2013), como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos resultados obtidos das análises do PC do leite desnatado e integral avaliados Crioscópio Eletrônico e FTIR

% Água	Leite	PC (°C)	
		Criosc. Elet. ¹	FTIR ²
0	Desnatado	-0,516 ± 0,004	-0,495 ± 0,003
	Integral	-0,515 ± 0,003	-0,526 ± 0,009
2	Desnatado	-0,504 ± 0,003	-0,484 ± 0,003
	Integral	-0,504 ± 0,003	-0,517 ± 0,009
5	Desnatado	-0,487 ± 0,002	-0,468 ± 0,003
	Integral	-0,487 ± 0,003	-0,500 ± 0,008
10	Desnatado	-0,460 ± 0,003	-0,442 ± 0,002
	Integral	-0,460 ± 0,003	-0,474 ± 0,007
15	Desnatado	-0,434 ± 0,003	-0,416 ± 0,002
	Integral	-0,432 ± 0,003	-0,446 ± 0,007
20	Desnatado	-0,407 ± 0,003	-0,390 ± 0,002
	Integral	-0,403 ± 0,004	-0,418 ± 0,006

¹Crioscópio Eletrônico (LK – 7000, Laktron). ²Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (LactoScope™ FTIR).

Na Figura 6 é possível observar que há linearidade em ambos os resultados, e apesar das curvas não se sobreporem, a diferença entre os métodos parece ser menor para o leite integral.

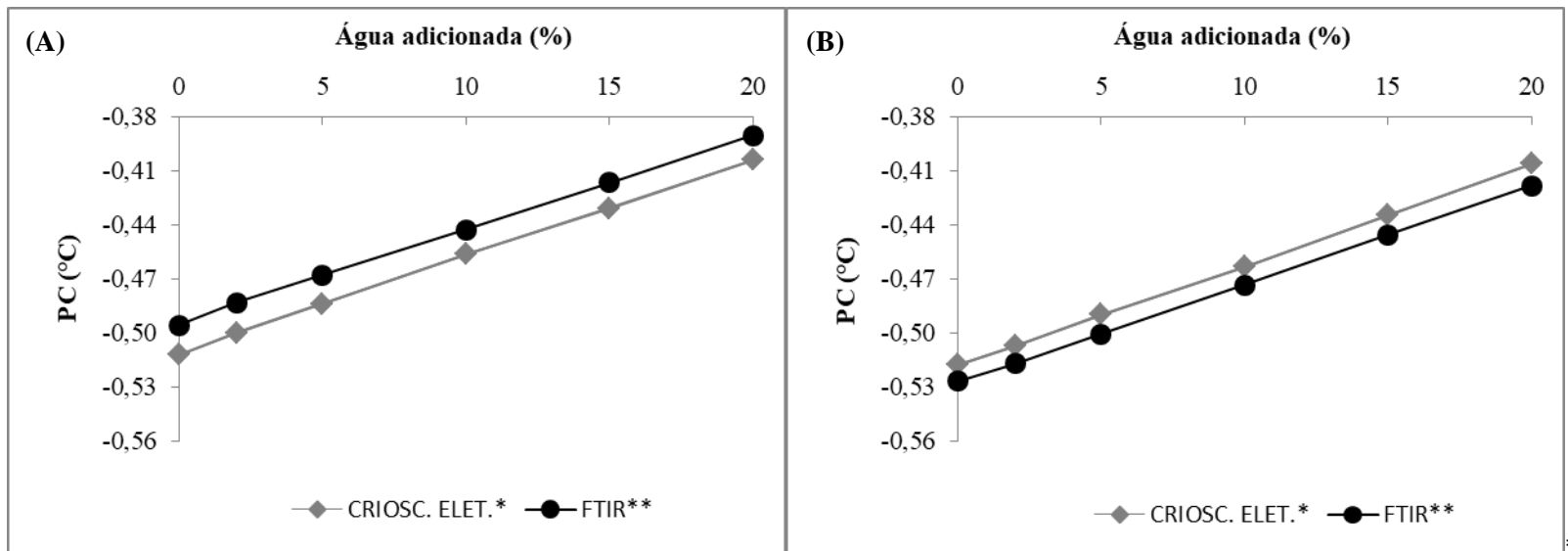


Figura 6. Linearidade do PC do de leite desnatado (A) e leite integral (B) adicionados de água e avaliados por Crioscópio Eletrônico e Espectroscopia de FTIR.

Crioscópio Eletrônico (LK – 7000, Laktron). **Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (LactoScope™ FTIR).

Quando o leite apresenta composição normal (leite integral), a crioscopia obtida por Espectroscopia de FTIR é levemente diminuída em relação ao Crioscópio Eletrônico, o que pode ser corrigido por um fator. Entretanto, para o leite desnatado ocorreu o efeito inverso.

O coeficiente de determinação múltipla é representado pelo R^2 e indica o quão bem a equação de regressão múltipla se ajusta aos dados amostrais. Um ajuste perfeito resultaria em $R^2 = 1$ e um ajuste ruim resultaria em R^2 próximo de zero. No entanto, à medida que variáveis vão sendo acrescentadas, R^2 aumenta, o que induz a erros. Por esse motivo, é mais apropriado utilizar o R^2 ajustado, visto que este é um coeficiente de determinação múltipla modificado que leva em consideração o número de variáveis e o tamanho amostral (TRIOLA, 2008).

O coeficiente de determinação obtido para o experimento 1 foi elevado (98,66%), indicando ótimo ajuste entre o PC e as variáveis estudadas (Tabela 4). Os PC do leite desnatado e integral com diferentes porcentagens de água determinados por Espectroscopia de FTIR aumentaram 0,019°C em relação à metodologia de referência ($p < 0,001$). O efeito isolado da Espectroscopia de FTIR sobre o PC é mais fácil de ser visualizado através da diferença dos valores médios do PC do leite desnatado obtido pelas duas metodologias, levando em consideração cada porcentagem de água adicionada (Tabela 3).

Tabela 4. Análise do modelo de regressão linear múltipla da variável PC do leite com diferentes porcentagens de água, tipo de leite e metodologia utilizada

Variáveis	Coefficientes	Valor-p	IC (95%)	R^2 ajustado (%)
Constante	-0,512	<0,001	-0,515 -0,510	
Água	0,0054	<0,001	0,0053 0,0055	
Leite	0,001	0,411	-0,001 0,003	98,66
Metodologia	0,019	<0,001	0,016 0,021	
Leite x Metodologia	-0,032	<0,001	-0,035 -0,029	

O tipo de leite (desnatado ou integral) não afetou o PC de forma significativa pela metodologia de referência. Porém, o PC do leite integral com diferentes porcentagens de água analisado por Espectroscopia de FTIR foi capaz de diminuir -0,032°C ($p < 0,001$).

Como esperado, a adição de água no leite foi o principal fator que afetou a crioscopia. A cada 1% de água adicionada há 0,0054°C de aumento do PC. Resultados semelhantes foram constatados por Sánchez *et al.* (2007) quando avaliaram a crioscopia do leite de cabra em diferentes condições analíticas, adicionadas de oito diferentes teores de água (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7%), e observaram que o PC aumentou 0,006°C para cada ponto percentual. Os resultados do presente estudo concordam também com a pesquisa realizada por Hanus *et al.* (2012), quando verificaram que a adição de diferentes porcentagens de água (0, 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5%) no leite bovino tem efeito significativo no IC, representando um aumento de 0,006°C.

O valor médio encontrado para o teor de gordura do creme de leite avaliado através do método butirométrico foi de 51,6 % \pm 2,73. A Tabela 5 mostra os resultados médios e desvio padrão dos

teores de gordura estimados para a metodologia de referência e os resultados encontrados pela metodologia alternativa, em diferentes porcentagens de creme adicionadas no experimento 2.

Tabela 5. Média e desvio padrão dos teores de gordura das amostras do experimento 2 de acordo com o método de análise e porcentagens de creme adicionados

Metodologia analítica	% de creme			
	5	10	15	20
Crioscópio Eletrônico ¹	2,58 ± 0,14	5,16 ± 0,27	7,74 ± 0,41	10,32 ± 0,54
FTIR ²	2,55 ± 0,16	5,00 ± 0,24	7,40 ± 0,35	9,90 ± 0,64

Não houve diferença significativa entre as metodologias ($p > 0,005$).

¹Método butirométrico. ²Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (LactoScope™ FTIR).

Não houve diferença significativa entre os métodos de análise para as diferentes porcentagens de creme adicionadas ($p > 0,05$). Silveira *et al.* (2004) também não encontraram diferença entre os resultados dos teores de gordura obtidos na análise por metodologia de referência e alternativa, concluindo que a metodologia por infravermelho pode ser utilizada com segurança na avaliação da composição do leite bovino.

No experimento 2, o teor de lactose e proteína diminuíram com adição de água e gordura, enquanto que o teor de sólidos totais aumentou com o aumento do teor de gordura adicionado no leite desnatado (Tabela 6).

Tabela 6. Média e desvio padrão da composição do leite desnatado adicionados de diferentes porcentagens de gordura e água

Água (%)	Gordura (%)	Lactose (g/100g)	Proteína (g/100g)	Sólidos Totais (g/100g)
0	2,53	4,76 ± 0,020	3,30 ± 0,058	11,55 ± 0,19
	5,10	4,66 ± 0,028	3,22 ± 0,060	13,96 ± 0,16
	7,36	4,54 ± 0,042	3,13 ± 0,056	15,97 ± 0,46
	10	4,40 ± 0,042	3,03 ± 0,052	18,25 ± 0,64
2	2,58	4,67 ± 0,029	3,24 ± 0,058	11,45 ± 0,20
	5,14	4,55 ± 0,031	3,16 ± 0,055	13,83 ± 0,25
	7,37	4,44 ± 0,027	3,07 ± 0,057	15,82 ± 0,27
	9,84	4,31 ± 0,040	2,97 ± 0,046	17,96 ± 0,48
5	2,59	4,51 ± 0,031	3,14 ± 0,060	11,21 ± 0,24
	5,12	4,40 ± 0,028	3,07 ± 0,053	13,57 ± 0,22
	7,56	4,28 ± 0,027	2,96 ± 0,050	15,74 ± 0,26
	9,98	4,14 ± 0,033	2,87 ± 0,042	17,82 ± 0,53
10	2,60	4,25 ± 0,022	2,98 ± 0,061	10,82 ± 0,20
	5,02	4,14 ± 0,031	2,91 ± 0,055	13,07 ± 0,35
	7,45	4,01 ± 0,021	2,81 ± 0,049	15,22 ± 0,35
	9,83	3,88 ± 0,039	2,71 ± 0,041	17,27 ± 0,60
15	2,49	3,99 ± 0,021	2,82 ± 0,053	10,29 ± 0,18
	5,07	3,88 ± 0,031	2,75 ± 0,053	12,70 ± 0,24
	7,41	3,75 ± 0,019	2,65 ± 0,050	14,77 ± 0,31
	9,93	3,55 ± 0,107	2,52 ± 0,066	16,85 ± 0,67
20	2,55	3,73 ± 0,016	2,65 ± 0,050	9,94 ± 0,21
	5,10	3,61 ± 0,017	2,58 ± 0,047	12,30 ± 0,22
	7,36	3,49 ± 0,023	2,49 ± 0,041	14,30 ± 0,33
	9,93	3,40 ± 0,124	2,43 ± 0,077	16,60 ± 0,66

A Tabela 7 apresenta os valores médios do PC obtidos pela metodologia de referência e Espectroscopia por FTIR em diferentes condições analíticas testadas. Os valores encontrados por este último método (-0,582°C a -0,413°C) foram menores do que os obtidos pelo método de referência (-0,516°C a -0,395°C) na maioria das condições analíticas estudadas.

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão dos resultados obtidos de análises de gordura (FTIR) e análise do PC (Crioscópio Eletrônico e FTIR)

Água (%)	Gordura (%)	PC (°C) Criosc. Elet. ¹	PC (°C) FTIR ²
0	2,53	-0,515 ± 0,004	-0,514 ± 0,004
	5,10	-0,516 ± 0,004	-0,541 ± 0,003
	7,36	-0,516 ± 0,003	-0,560 ± 0,006
	10	-0,516 ± 0,003	-0,582 ± 0,009
	2,58	-0,505 ± 0,003	-0,507 ± 0,004
2	5,14	-0,504 ± 0,004	-0,531 ± 0,004
	7,37	-0,506 ± 0,004	-0,551 ± 0,004
	9,84	-0,505 ± 0,003	-0,571 ± 0,006
	2,59	-0,487 ± 0,004	-0,490 ± 0,004
5	5,12	-0,487 ± 0,004	-0,516 ± 0,003
	7,56	-0,487 ± 0,005	-0,537 ± 0,003
	9,98	-0,486 ± 0,004	-0,556 ± 0,007
	2,60	-0,459 ± 0,004	-0,466 ± 0,004
10	5,02	-0,459 ± 0,004	-0,489 ± 0,004
	7,45	-0,458 ± 0,003	-0,509 ± 0,005
	9,83	-0,455 ± 0,002	-0,528 ± 0,008
	2,49	-0,431 ± 0,004	-0,438 ± 0,003
15	5,07	-0,431 ± 0,004	-0,463 ± 0,003
	7,41	-0,428 ± 0,004	-0,483 ± 0,004
	9,93	-0,425 ± 0,003	-0,497 ± 0,013
	2,55	-0,404 ± 0,004	-0,413 ± 0,003
20	5,10	-0,402 ± 0,003	-0,437 ± 0,003
	7,36	-0,399 ± 0,003	-0,456 ± 0,004
	9,93	-0,395 ± 0,003	-0,482 ± 0,012

¹Crioscópio Eletrônico (LK – 7000, Laktron). ²Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (LactoScope™ FTIR).

Os resultados da análise de regressão linear múltipla do experimento 2, mostram que os dados foram bem ajustados, pois o R² ajustado foi alto (98,95%) (Tabela 8). Houve diferença significativa entre a metodologia de referência e a Espectroscopia de FTIR (p<0,001), quando o leite apresenta alteração na sua composição normal, assim como no experimento 1. A diferença média entre os valores de PC obtida pelos dois métodos foi de 0,019°C. Sendo assim, quando o leite tem sua composição alterada e é avaliado nas condições desse estudo por Espectroscopia de FTIR, ocorre o aumento do PC de 0,019°C em relação ao Crioscópio Eletrônico.

Tabela 8. Análise do modelo de regressão linear múltipla da variável PC com diferentes porcentagens de água, porcentagens de gordura e metodologia utilizada

Variáveis	Coefficientes	Valor-p	IC (95%)	R ² ajustado (%)
Constante	-0,535	<0,001	-0,537 -0,532	
Água	0,0057	<0,001	0,0056 0,0058	
Gordura	0,0005	0,006	0,0001 0,0008	98,95
Metodologia	0,019	<0,001	0,016 0,022	
Gordura x Metodologia	-0,0096	<0,001	-0,0100 -0,0915	

Os resultados do presente estudo discordam de Conrado *et al.* (2012), que não encontraram diferença significativa ($p>0,05$) entre o PC avaliado por Crioscópio Eletrônico e Espectroscopia de FTIR. Entretanto, esses autores trabalharam com leite contendo composição normal.

Quando avaliada a influência isolada do teor de gordura no PC, observa-se que na faixa média entre 2,5% a 9,9%, há um leve aumento do PC ($0,0005^{\circ}\text{C}$) determinado pela metodologia de referência ($p<0,05$). O resultado do presente estudo discorda do reportado por Sala *et al.* (2010), que não encontraram qualquer correlação estabelecida entre amostras de leite com porcentagem de gordura que variaram entre 1,7% e 5,0% e crioscopia obtida por Crioscópio Eletrônico. Senevirathne *et al.* (2016) também não encontraram diferença significativa ($p>0,05$) no PC do leite em diferentes níveis de gordura (<3, 3 a 4, 4 a 5, >5%) e avaliados pela metodologia de referência.

Além da leve interferência provocada pelo teor de gordura no PC obtido por metodologia de referência ($p<0,05$), a diferença do PC entre os métodos aumenta com o aumento da porcentagem de gordura, como pode ser observado na Figura 7.

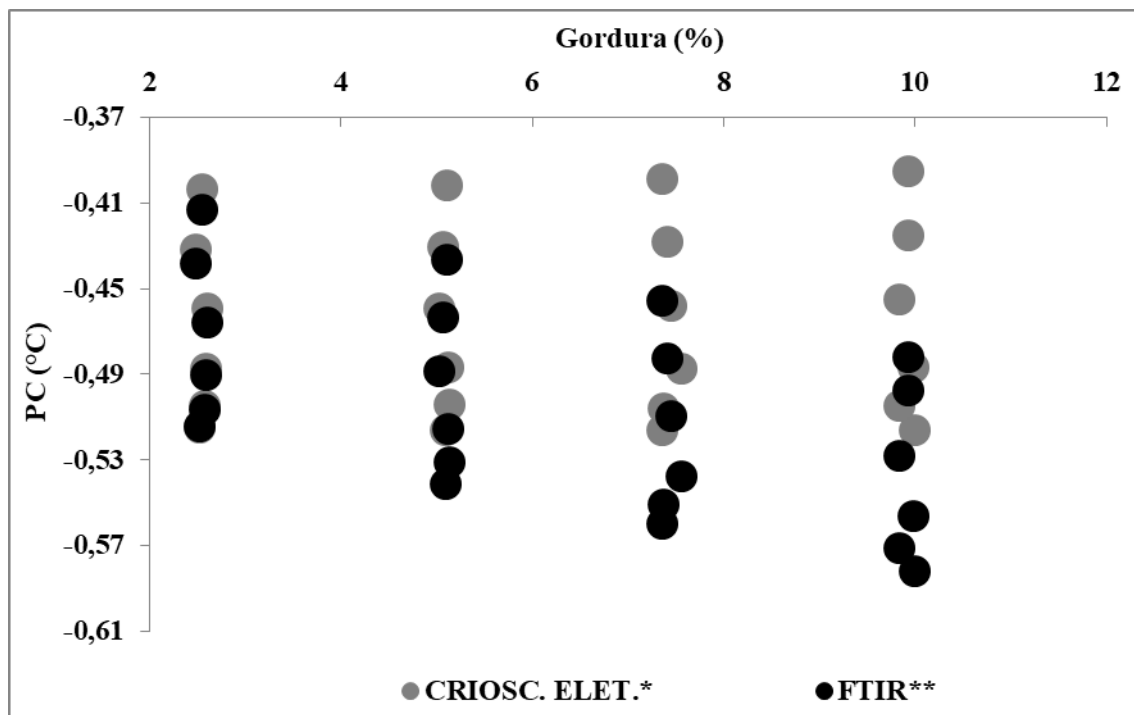


Figura 7. PC do leite desnatado adicionado de diferentes porcentagens de gordura e avaliado por meio de Crioscópio Eletrônico e Espectroscopia de FTIR.

* Crioscópio Eletrônico (LK – 7000, Laktron). ** Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (LactoScope™ FTIR).

A Espectroscopia de FTIR é muito utilizada em laboratórios de análise da qualidade do leite por ser uma metodologia rápida e precisa. Estudos realizados por Pintic-Pukec *et al.* (2009) demonstraram que a determinação do PC por Espectroscopia de Infravermelho pode ser utilizado como métodos de triagem de amostras de leite. O presente estudo demonstrou que o alto teor de gordura no leite cru resultou em um PC decrescente ao utilizar Espectroscopia de FTIR ($p < 0,001$), diminuindo $-0,0093^{\circ}\text{C}$ do PC por cada ponto percentual. Já a adição de água aumentou $0,0055^{\circ}\text{C}$ do PC ($p < 0,001$), o que indica que o teor de gordura parece compensar a adição de água do leite. A variação do teor de gordura em amostras de leite pode ocorrer devido a influência de fatores genético, fisiológico e ambiental no animal e adulterações como adição de água e desnate. Outro fator que mais provoca variabilidade dos resultados de composição de amostras leite, em especial da gordura, é a falta de homogeneização do leite do tanque. Além disso, os produtores são bonificados pelas indústrias para fornecerem leite com maior teor de gordura. Portanto, é muito importante levar em consideração o teor de gordura do leite nos resultados do PC determinado por Espectroscopia de FTIR para evitar interpretações erradas desse parâmetro.

A influência do teor de gordura e porcentagem de água sobre a metodologia de referência e alternativa está apresentada nas Figuras 8.

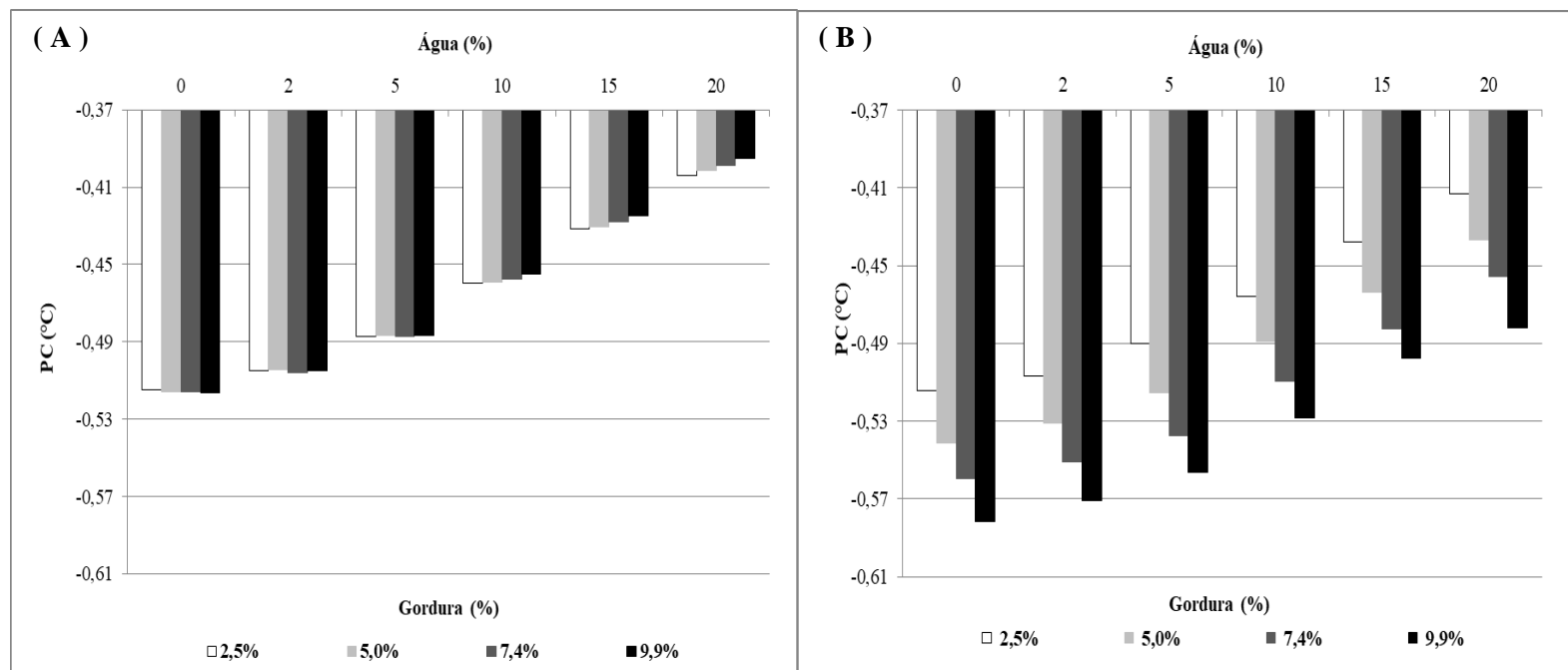


Figura 8. PC do leite desnatado adicionado de diferentes porcentagens de água e gordura avaliado por Crioscópio Eletrônico* (A) e Espectroscopia de FTIR** (B).

*Crioscópio Eletrônico (LK – 7000, Laktron). **Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (LactoScope™ FTIR).

5.2 Segunda fase

Do total de amostras analisadas no LabUFMG nos meses de setembro e outubro de 2017 (n=4.000), 4,9 % (196) foram consideradas como suspeitas na triagem dos resultados por apresentarem desvios na composição, PC e CCS. Os valores médios e coeficientes de variação (CV) dos parâmetros analisados nas amostras suspeitas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Estatística descritiva a partir dos dados de amostras analisadas no LabUFMG com suspeita de fraude, nos meses de setembro e outubro de 2017 (n= 196)

Parâmetros	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desv. Padrão	CV (%)
Gordura (g/100g)	3,35	3,35	0,17	6,87	0,77	22,99
Proteína (g/100g)	3,07	3,01	2,31	5,70	0,39	12,70
Lactose (g/100g)	4,33	4,31	3,13	6,81	0,46	10,62
Sól. Totais (g/100g)	11,75	11,63	8,75	15,53	1,08	9,27
CCS (x1000/ml)	748,94	598	4	7390	771,81	103,05
PC (°C)	-0,488	-0,489	-0,366	-0,730	0,046	9,43

A CCS apresentou CV elevado (103,05%), o que demonstra grande variabilidade das amostras. Santana *et al.* (2015) também encontraram resultado semelhante (CV=103,87%).

Dos componentes do leite, a gordura foi a que apresentou maior CV (23,09%), seguida das proteínas (12,75%), lactose (10,57%) e sólidos totais (9,18%). Segundo Linn (1988) o teor de gordura varia muito no leite, pois é fortemente influenciada pelos fatores genético, fisiológico e ambiental.

De acordo com a IN 62 (BRASIL, 2011), os teores mínimos de sólidos totais devem ser 11,4%, gordura 3,0% e proteína 2,9%. A média geral dos resultados de gordura (3,35%), proteína (3,07%) e sólidos totais (11,75%) estão de acordo com a legislação vigente. Já os valores médios encontrados para o PC (-0,488°C) e CCS (748.940 CS/ml), estão em desacordo com os padrões regulamentados pelas legislações atuais, que determinam PC entre -0,512°C e -0,536°C (BRASIL, 2017) e CCS de no máximo 500.000 CS/ml nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2016). Praticamente quase metade (47,4%) das amostras avaliadas por Montanini *et al.* (2013), analisadas em laboratório credenciado ao MAPA, estavam em desconformidade com os padrões estabelecidos pela IN-62, o que evidencia a dificuldade dos produtores em se adequarem ao que a legislação exige.

Das 196 amostras suspeitas, 74,49% apresentaram PC acima de -0,512°C, indicando potencial fraude por aguagem (Figura 9). Apesar do combate à fraude por adição de água no leite ser antigo, muitos estudos atuais demonstram que essa prática ainda é frequente (JÚNIOR *et al.*, 2013; BARHAM *et al.* 2014; SILVA J. *et al.*, 2015; ALVES E BORGES, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017), o que reforça a importância do monitoramento constante do PC do leite.

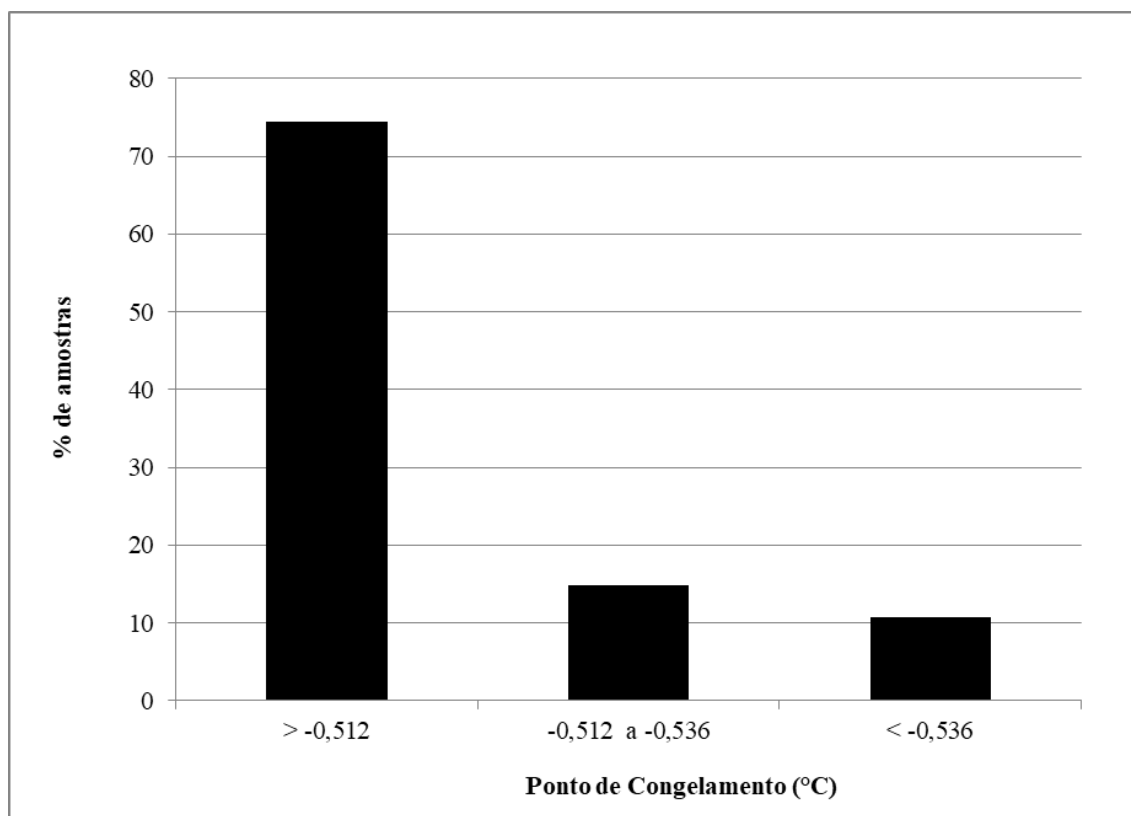


Figura 9. Distribuição do Ponto de Congelamento das amostras suspeitas analisadas no LabUFMG nos meses de setembro e outubro de 2017.

Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para análise de sacarose, amido, peróxido de hidrogênio, neutralizantes e formol. No entanto, segundo Silva L. *et al.* (2015), os testes oficiais podem ter algumas limitações para detectar fraudes por adição de conservantes e neutralizantes, podendo não ser capaz de assegurar a ausência dessas substâncias no leite. Os autores verificaram que apenas o teste de formol mostrou alta sensibilidade analítica e foi capaz de detectar as concentrações testadas. Apesar do peróxido de hidrogênio ter causado redução significativa ($p < 0,05$) da contagem de mesófilos aeróbios no estudo realizado por esses autores, essa substância não foi detectada após 24 horas de armazenamento sob refrigeração. Esse resultado indica rápida degradação do peróxido de hidrogênio, o que dificulta a detecção por indústrias ou agências reguladoras. Ainda nesse trabalho, os autores verificaram que adição de hidróxido de sódio foi capaz de diminuir a acidez titulável, porém também não foi identificada. Isso sugere que, quando a fraude é calculada para a neutralização precisa do ácido láctico, substâncias neutralizantes não são detectadas pelos testes oficiais (MILAGRES, 2008).

Foram observados resultados positivos em 12,24% das amostras para análise de cloretos (Figura 10).

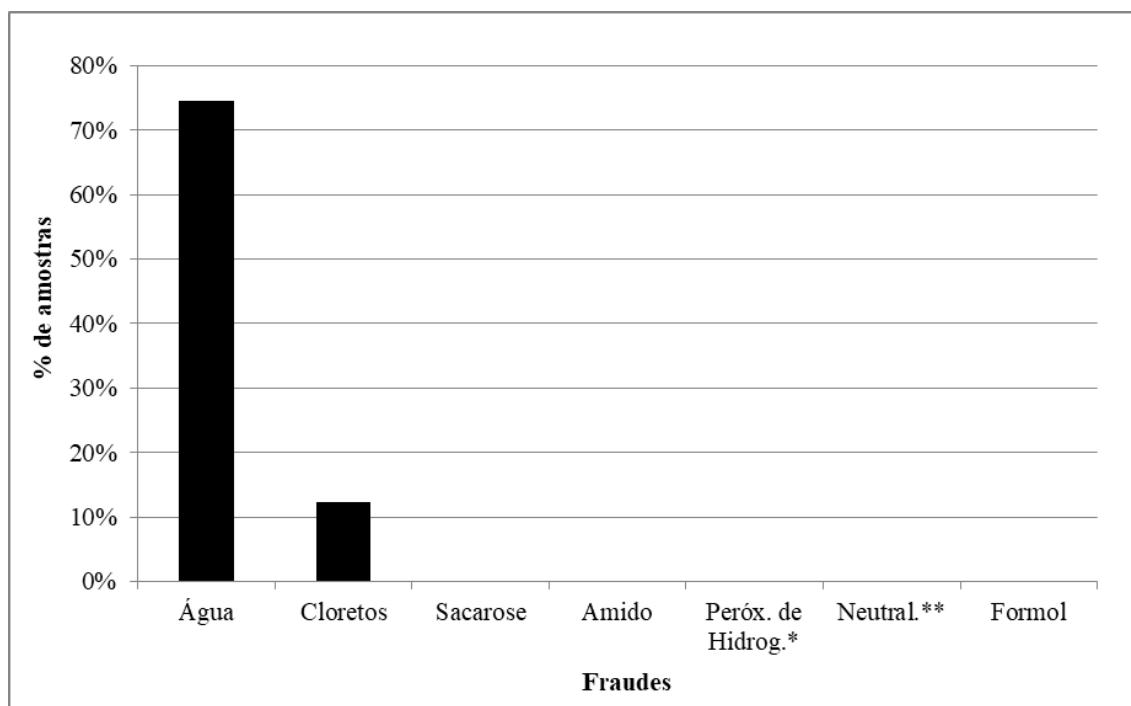


Figura 10. Fraudes encontradas nas amostras suspeitas analisadas no LabUFMG durante os meses de setembro e outubro de 2017.

*Peróxido de Hidrogênio. **Neutralizantes.

Dos 12,24 % das amostras que apresentaram resultado positivo para análise de cloretos, 6,63 % apresentaram alta CCS e alto PC (Figura 11). O sal de cozinha (cloreto de sódio) é um agente reconstituente que, quando adicionado ao leite, é utilizado para mascarar a fraude por adição de água, visto que esse tipo de fraude é facilmente detectado pelo controle de qualidade dos laticínios. Sendo assim, essas práticas, quando utilizadas simultaneamente, permite correção da densidade e crioscopia do leite. Por isso, a pesquisa de cloretos se torna importante para confirmar suspeitas de adição de água e sal (TRONCO, 2008). A determinação qualitativa de cloretos no leite consiste na reação do nitrato de prata com os cloretos na presença do indicador cromato de potássio. Quando o teor de cloretos no leite é normal (0,08% a 0,1%), a quantidade de nitrato de prata é excessiva, reagindo com o indicador para a obtenção da cor marrom. Se o teor de cloretos é elevado, há menor quantidade de nitrato de prata disponível para reagir com o indicador, formando coloração amarela característica (BRASIL, 2006).

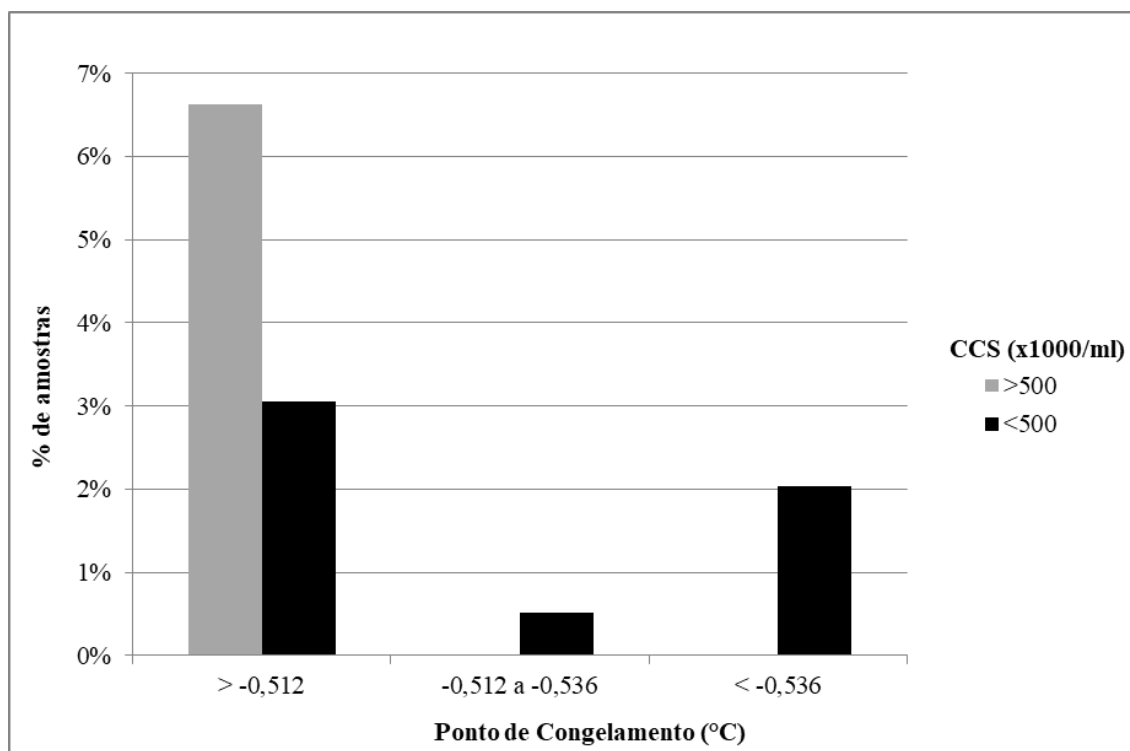


Figura 11. Porcentagem de amostras com resultado positivo para análise de cloretos levando em consideração a relação entre o Ponto de Congelamento e Contagem de Células Somáticas.

Diversos autores corroboram que à medida que se eleva a CCS, há aumento do teor de cloretos (ELIAS *et al.*, 2005; ZAFALON E FILHO, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Esse fato pode gerar resultado falso-positivo, admitindo-se que o leite foi fraudado com a adição de cloreto de sódio. O teor mais alto de cloretos em alta CCS pode ser explicado pela alteração da concentração iônica do leite, devido ao aumento da permeabilidade vascular na glândula mamária. O sódio e o cloro, que estão presentes na circulação sanguínea, direcionam-se para o lúmen do alvéolo, aumentando sua concentração no leite (NIELEN *et al.*, 1992). Firmino *et al.* (2010), observaram resultados positivos em 36% das amostras para análise de cloretos e associaram os resultados com elevada incidência de mastite no rebanho ou adição de sal no leite.

Assim como a elevada CCS pode ter contribuído para o aumento de cloretos, interferindo nos resultados do teste, esta pode ter influenciado também na redução da lactose, o que provoca alto PC das amostras. Devido ao processo patológico da mastite, a concentração de sal no leite aumenta, resultando em aumento da pressão osmótica. Para compensar esse aumento, há diminuição da lactose, havendo relação inversa entre a concentração de sal e lactose, sendo a última a que mais contribui para variações no PC do leite (FOX *et al.*, 1998). Esses dados discordam do relatado por Silva *et al.* (2012) e Santana *et al.* (2015), que apesar de terem encontrado correlação negativa entre a lactose e CCS, observaram que o PC diminui nessas condições.

As amostras que apresentaram PC entre $-0,512^{\circ}\text{C}$ e $-0,536^{\circ}\text{C}$ e obtiveram resultado positivo para adição de sal (Figura 11), demonstram a importância de provas específicas para a pesquisa de cloretos, já que quando adicionado em concentrações equilibradas com água, esse tipo de

fraude não é identificado nas pesquisas de densidade e crioscopia. Silva *et al.* (2011) verificaram que 0,02% de sal é capaz de aprofundar a crioscopia em média 0,015°C.

6. CONCLUSÃO

Como a adição de água causou o efeito inverso do alto teor de gordura no ponto de congelamento medido pelo FTIR, é importante considerar o teor de gordura do leite para evitar interpretações errôneas do ponto de congelamento ao usar o método FTIR.

A associação do PC com a composição do leite demonstrou ser uma importante ferramenta para prever fraudes por adição de água e reconstituíntes. Grande parte das amostras suspeitas apresentaram fraude por adição de água, o que reforça a importância do monitoramento constante do PC do leite. Apesar de ter sido encontrada fraude por adição de sal, é necessário levar em consideração a CCS na interpretação dos resultados, visto que esta pode aumentar o teor de cloretos no leite e por isso, não necessariamente indica fraude.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. C.; BORGES, A. F. Caracterização da qualidade do leite cru e pasteurizado comercializado informalmente na cidade de Colorado do Oeste, RO, Brasil. *Vigilância Sanitária Debate*. v.4, n. 2, p. 65-69, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Informe Técnico nº 53. Esclarecimentos sobre os riscos à saúde das substâncias ureia e formol e sua adição ao leite. Brasília, 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe%2BT%25C3%25A9cnico%2B53_risco%2Bde%2Bureia%2Be%2Bformol%2Bno%2Bleite.pdf/49915d61-509a-4782-a45c-2f1a5e7117f0> Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

ARAÚJO, V. M.; CASSOLI, L. D.; ZAMPAR, A.; SILVA, A. C. L. *et al.* 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, B., NYGAARD, L., HANSEN, P. W. Determination of extraneous water in milk samples, or the freezing point depression of milk samples. Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark. *United States Patent* N° 5.739.034. Apr, 1998.

BECHI, C. S. *Estudo do Índice Crioscópico do leite tipo B “in natura” produzido na bacia leiteira do Vale do Taquari, RS*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). UFRGS. Porto Alegre. 106p., 2003.

BOUIS, P. *Qualitative optical spectroscopic methods*. In: SETTLE, F. (Ed). Handbook of Instrumental techniques for analytical chemistry. p. 243-283. 1997.

BRASIL. Decreto nº9.013 de 29 de março de 2017. Dispõe sobre o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, n.105, p.109, 29 mar. 2017.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF., Seção 1. 20 set. 2002.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite cru refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF., Seção 1, n. 251, 30 dez. 2011.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle do leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF., Seção 1, p.8, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Portaria nº 01, de 07 de outubro de 1981. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes: métodos físicos e químicos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF., 13 de out. de 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF., Seção 1, p. 3-25, 2 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 07, de 07 de maio de 2016. Altera o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF., Seção 1, p. 11, 4 de maio de 2016.

BARHAM, G. S.; KHASKHELI, M.; SOOMRO, A. H.; NIZAMANI, Z. A. Extent of extraneous water and detection of various adulterants in market milk at Mirpurkhas, Pakistan. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*. v.7, n. 3, p.83–9, 2014.

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

BRATHEN, G. Measurement of extraneous water by the freezing point test. *Bulletin of the International Dairy Federation*. Doc. nº 154, p.5, 1983.

CONRRADO, R. S.; OLIVEIRA, M. C. P. P.; FONSECA, L. M. *et al.* Freezing point of raw milk by Fourier transform infrared methodology (FTIR). *Journal Animal Science*. v. 90, Suppl. 3/J. Dairy Science. v. 95, Suppl. 2, 2012.

- DELTA INSTRUMENTS, An Advanced Instruments Company. *Freezing Point Depression*. Netherlands: Delta Instruments, 6 p. 2005.
- DELTA INSTRUMENTS, An Advanced Instruments Company. *Freezing point – Replacement & adjustment*. Netherlands: Delta Instruments, 8 p. 2008.
- DELTA INSTRUMENTS, An Advanced Instruments Company. *LactoScope FTIR user's guide*. Milk and Liquid Dairy Product Analyzer. Netherlands: Delta Instruments, 138p. 2007.
- ELIAS, A. O.; VICTORIA, C.; SILVA, A. V.; LANGONI, H. Características físico-químicas e contagem de células somáticas de leite proveniente de vacas naturalmente infectadas por *Streptococcus* spp. *Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia*. UNIPAR, Umuarama, v.8, n. 2, p. 165-170, jul./dez., 2005.
- FAGNANI, R.; CARRARO, P. E.; BATTAGLINI, A. P. P.; ARAÚJO, J.P.A. Alterações na densidade e crioscopia do leite pela adição de diferentes concentrações de citrato e fortificante. *Revista Caatinga*. Mossoró/RN, v.27, n. 4, p.208-215, out. – dez., 2014.
- FIRMINO, F. C.; TALMA, S. V.; MARTINS, M. L. *et al.* Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de Rio Pomba, Minas Gerais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. v. 65, n. 376, p.5-11, 2010.
- FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Londres: Thomson Science, 396p. 1998.
- GARGOURI, A.; HAMED, H.; ELFEKI, A. Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis. *Journal of Food Science*. v.78, n. 9, p. 1406-1411, 2013.
- GAUCHERON, F. The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*. v. 45, n. 4, p. 473-483. 2005.
- GENCUROVA, V.; HANUS, O.; VYLETELOVA, M. *et al.* The relationships between goat and cow milk freezing point, milk composition and properties. *Scientia Agriculturae Bohemica*. v. 39, n. 4, p. 324–328, 2008.
- HANUS, O.; HANUSOVÁ, K.; VYLETELOVÁ, M. *et al.* Selected abiotic factors that influence raw cow milk freezing point depression. *Acta Vet. BRNO*. v. 81, p.49-55, 2012.
- HANUS, O.; TOMÁSKA, M; HOFERICOVÁ, M. *et al.* Relationship between freezing point and raw ewes' milk components as a possible tool for estimation of milk adulteration with added water. *Jornal of Food and Nutrition Research*. v. 54, n. 4, p. 281-288, 2015.
- HARDING, F. *Measurement of extraneous water by the freezing point test*. BULLETIN FIL/IDF. Doc. n° 154, p.3-4, 1983.
- HARDING, F. *Milk quality*. New York: Blackie Academic & Professional, 165 p. 1995.
- HELPER, G. A.; FERRÃO, M. F.; FERREIRA, C. V. *et al.* Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n. 4, p. 779-786, 2006.
- HENNO, M.; OTS, M.; JÕUDU, I. *et al.* Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. *International Dairy Journal*. v.18, n. 2, p. 210-215, February, 2008.

- HSU, C P.S. *Infrared spectroscopy*. In: SETTLE, F. (Ed). Handbook of Instrumental techniques for analytical chemistry. Cap. 15, p. 243-283. 1997.
- IAL. *Instituto Adolfo Lutz*. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo. 1000 p. 2008.
- IDF. *International IDF Standard*. Milk: determination of freezing point. Thermistor cryoscope method (reference method). Bruxelas, 24 p., 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da Pecuária Municipal, v. 44, p.1-51, 2016. Disponível em: < https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf > Acesso em: 10 de jan. de 2018.
- JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. Chapman & Hall. 5^oed. p.285, 1996.
- JÚNIOR, J. C. R.; BELOTI, V.; SILVA, L. C. C.; TAMANINI, R. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. Juiz de Fora/MG, v.68, n. 392, p.5-11, mai./jun., 2013.
- LINN, J. G. *Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows*. National Research Council. Washington, 1988.
- MATYSEK, M. K.; LITWINCZUK, Z.; FLOREK, M.; BARLOWSKA, J. The effects of breed and other factors on the composition and freezing point of cow's Milk in Poland. . *International Journal of Dairy Technology*. V. 64, n. 3. August, 2011.
- MENDES, C. G.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A. *et al.* Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.11, n. 2, p.349-356, abr./jun. 2010.
- MILAGRES, M. P. *Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação da concentração real de ácido láctico em leite por cromatografia líquida de alto eficiência – exclusão de íons*. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa/MG. 79f. 2008.
- MONTANHINI, M. T. M.; MORAES, D. H. M.; NETO, R. M. Influência da contagem de células somáticas sobre os componentes do leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. v.68, n. 392, p. 18-22, mai./jun., 2013.
- NIELEN, M.; DELUYKER, H.; SCHUKKEN, Y. H.; BRAND, A. Electrical conductivity of milk: measurement, modifiers, and meta analysis of mastites detection performance. *Journal Dairy Science*. v.75, p. 606-614. 1992.
- OLIVEIRA, D. R.; OLIVEIRA, E. N. A.; FEITOSA, B. F. *et al.* Avaliação da qualidade físico-química de amostras de leite cru proveniente de fazenda produtora da cidade de Ipanguaçu-RN. *Revista Brasileira de Agrotecnologia*. v.7, n^o 2, p. 32-37. 2017.
- OLIVEIRA, M. C. P. P. *Espectrofotometria no infravermelho - por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): Validação da análise do teor de uréia e de outros parâmetros de qualidade do leite*. Dissertação (mestrado em Ciência Animal). UFMG. Belo Horizonte/MG. 70p., 2011.

- OLIVEIRA, T. C. F.; MONTANHINI, M. T. M. Avaliação da eficiência da prova qualitativa de cloretos para investigação de adulteração do leite. *Brazilian Journal of Food Research*. v.6, n. 2, p. 75-79. 2015.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Vencendo a luta contra a mastite*. Westfalia Landtechnik do Brasil Ltda. 192 p., 2002.
- PINTIC-PUKEC, N.; BARAC, Z.; DAKIC, A. *et al.* Determination of the freezing point in cow milk samples preserved with azidiol. *Mljekarstvo*. v. 61, n. 4, p.336-340, 2011.
- RIBAS, N. P. Valor e uso da contagem de células somáticas no manejo de rebanhos leiteiros. In: *Congresso Holstein de las Americas*. São Paulo. Anais... Embrapa Gado de Leite, p.47-61. 2001.
- 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.
- RODRIGUEZ-SAONA, L. E. ; KOCA, N.; HARPER, W. J. *et al.* Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, v.89, n. 5, p.1407-1412, 2006.
- ROSA-CAMPOS, A. A.; ROCHA, J. E. S.; BORGIO, L. A.; MENDONÇA, M. A. Avaliação físico-química e pesquisa de fraudes em leite pasteurizado integral tipo “C” produzido na região de Brasília, Distrito Federal. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. v.66, n. 379, p.30-34, 2011.
- SALA, C.; MORAR, A.; MORVAY, A. *et al.* Research regarding factors that influenced the variation of freezing milk. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară*. v. 43, n. 2, p. 204-211, 2010.
- SALIBA, E. O.S.; GONTIJO NETO, M. M.; RODRIGUES, N. M. *et al.* Predição da composição química do sorgo pela técnica de espectroscopia de refletância no infravermelho próximo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 3, 2003.
- SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C. *et al.* Evaluation of the Milkoscan FT 6000 milk analyzer for determining the freezing point of goat's milk under different analytical conditions. *Journal Dairy Science*, v. 90, n. 7, p.3153-3161, 2007.
- SANTANA, F. E. O.; CARMO, M. E. P.; SANTOS, E. G. *et al.* Contagem de células somáticas e a sua influência na composição físico-química do leite. *Anais do X Congresso Nordestino de Produção Animal*. Teresina/Piauí. 2015.
- SENEVIRATHNE, P. G. N. D.; MANGALIKA, U. L. P.; ADIKARI, A. M. J. B.; NAYANANJALIE, W. A. D. Evaluation of cow factors and milk composition on freezing point depression of cow milk. *International Journal of Livestock Research*. v.6, n. 5, p. 61-67, may. 2016.
- SHIPE, W. F. The freezing point of milk. A review. *Journal of Dairy Science*. v. 42, n. 11, p.1745-1762, 1959.
- SILVA, J. K. B.; ANDRADE, R. A.; FILHO, R. S. F.; GUSMÃO, R. P. Diagnóstico da qualidade do leite pasteurizado distribuído pelo Programa do Leite na microrregião do Seridó

- Oriental – RN. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. v. 10, n. 2, p.218-223, abr-jun, 2015.
- SILVA, L. C. C. *Capacidade de detecção de adulterações e suficiência das provas oficiais para assegurar a qualidade do leite pasteurizado*. Tese (Doutorado em Ciência Animal). UEL. Londrina, 85p., 2013.
- SILVA, L. C. C.; RIOS, E. A.; JUNIOR, J. C. R. *et al.* Sensibilidade da prova para a pesquisa de cloretos em leite pasteurizado. *In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 38., Florianópolis. Anais... Florianópolis, 2011.
- SILVA, L. C. C.; TAMANINI, R.; PEREIRA, J. R. *et al.* Substâncias conservantes e neutralizantes no leite: sensibilidade analítica das provas oficiais específicas, provas inespecíficas, inibição microbiana e persistência de resíduos no leite. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.45, n. 9, p.1613-1618, set., 2015.
- SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A. C. S. *et al.* Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.28, n. 1, p. 226-230, jan.-mar. 2008.
- SILVA, N. M. A.; BASTOS, L.P. F.; OLIVEIRA, D. L. S. *et al.* Influência da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total do leite cru no rendimento da produção de queijos, utilizando metodologia em escala reduzida. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 64, n° 5, p. 1367-1367, 2012.
- SILVA, P. H. F. Aspectos bioquímicos e tecnológicos da água como constituinte dos produtos lácteos. XIX Congresso Nacional de Laticínios. *Revista do Instituto Cândido Tostes*. Juiz de Fora, MG. v. 57, n° 327, p.98-101, Julho/Agosto, 2002.
- SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; CANÇADO, S. V.; FERRAZ, V. Comparação entre 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.
- SOUZA, S. S.; CRUZ, A. G.; WALTER, E. H. M. *et al.* Monitoring the authenticity of brazilian UHT milk: A chemometric approach. *Food Chemistry*. v.124, n. 2, p.692-695, jan., 2011.
- STATA CORP. *Stata Statistical Software: Release 12*. College Station, TX: StataCorp LP. 2011.
- STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons. West Sussex. England. 2004.
- TAFFAREL, L. E.; COSTA, P. B.; TSUTSUMI, C. Y. *et al.* Variação da composição e qualidade do leite em função do volume de produção, período do ano e sistemas de ordenha e resfriamento. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina/PR, v. 36, n° 3, suplemento 1, p. 2287-2300, 2015.
- TRIOLA, M.F. *Introdução à Estatística*. 10 ed. Rio de Janeiro: LTC, 696p. 2008.
- TRONCO, V. M. Controle Físico-Químico do Leite. In: *Manual para Inspeção da Qualidade do Leite*. Santa Maria, RS: UFSM, Cap. V, p. 103-105. 1997.
- TRONCO, V. M. *Manual para inspeção da qualidade do leite*. 3 ed. Santa Maria, RS: UFSM. 206 p. 2008.

ULE, A.; PREPADNIK, H.; KLOPCIC, M. The freezing point of bulk tank milk in Slovenia. *Acta Argiculturae Slovenica, Supplement*. v. 5, p. 84-88, 2016.

ZAFALON, L. F.; FILHO, A. N. Características físico-químicas do leite bovino, após tratamento da mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* durante a lactação. *Embrapa Pecuária Sudeste/ Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, n. 13, 2007.

ZAGORSKA, J.; CIPROVICA, I. Evaluation of factors affecting freezing point of milk. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. Jelgava/Letônia. v. 7, n. 2, 2013.