

**Eduardo Gonçalves Esteves**

**COMPONENTES NITROGENADOS: METODOLOGIAS ANALÍTICAS E  
ASSOCIAÇÕES COM OUTROS INDICADORES DE QUALIDADE DO LEITE CRU  
REFRIGERADO**

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

Curso: Mestrado em Medicina Veterinária.

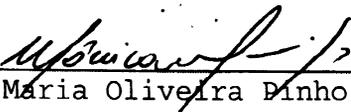
Área: Tecnologia e Inspeção de Produtos de  
Origem Animal.

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Mônica Maria de Oliveira Pinho  
Cerqueira.

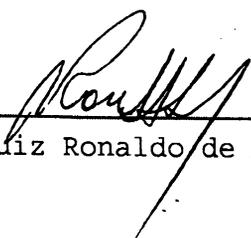
**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2006**



Dissertação defendida e aprovada em 15 de maio de 2006 pela Comissão Examinadora  
constituída por:

  
\_\_\_\_\_  
Mônica Maria Oliveira Dinho Cerqueira  
(Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Leorges Moraes da Fonseca

  
\_\_\_\_\_  
Luiz Ronaldo de Abreu



## AGRADECIMENTOS

A Deus, que canta, através de mim e de todos os seres o hino da sua criação, e concedeu ao Homem o dom da inteligência para com ela e por meio da Ciência, descobrir progressiva e profundamente as suas Leis Universais.

À Professora Dra. Mônica Maria de Oliveira Pinho Cerqueira, pela orientação, apoio e amizade desde os primórdios do processo de *granelização* do leite em Minas Gerais;

Aos Professores Dr. Leorges Moraes da Fonseca e Dr. Ronon Rodrigues, pela amizade, apoio e companheirismo, e pela colaboração na fase experimental deste trabalho no LabUFMG;

A todos os Professores e Funcionários do DTIPOA, pela contribuição magna que fazem à Graduação e à Pós-graduação na Escola de Veterinária da UFMG;

Ao Médico Veterinário Dr. Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, Diretor do Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em Pedro Leopoldo – MG (LANAGRO-MG), pelo apoio e incentivo ao desenvolvimento profissional;

À Farmacêutica Dra. Maria Petrina Murta Barbosa Leite, Chefe da Seção de Físico Química de Produtos de Origem Animal do LANAGRO – MG, pela amizade, incentivo e apoio;

Aos Médicos Veterinários Dr. Ronaldo Linares Sanches, Dra. Denise Kátia dos Santos Aquino e Dr. Juarez Fabiano Alkmin Filho, do Setor de Alimentação Animal do LANAGRO-MG, pelo apoio e colaboração irrestritos nas análises de nitrogênio;

À Matemática Dra. Karla Aparecida Esteves Pereira e Otília Ângela Passos, do Setor de Alimentação Animal do LANAGRO – MG, pela ajuda e boa vontade a todo instante na fase experimental deste trabalho;

À Engenheira de Alimentos Dra. Fabiana dos Anjos e aos Médicos Veterinários Dr. Alexnaldo Alves Dias e Dr. Francisco Ferreira Sobrinho, da Cooperativa Central dos Produtores Rurais de Minas Gerais, pela colaboração fundamental na fase experimental deste trabalho;

À Laís e Geraldino de Paula Jordão e Guilherme de Paula Gonçalves, pelo acolhimento num momento de fadiga;

Aos colegas do Setor FIQ-POA do LANAGRO-MG, pela compreensão, apoio e auxílio;

À todos integrantes da equipe do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG – pelo coleguismo e fornecimento de material de coleta e pelas análises realizadas;

Aos Produtores Rurais que, irmanados na coragem, na determinação e nos desafios, se dedicam à prática de produção leiteira no Brasil, em prol da alimentação de nossa população;

A todos os colegas de mestrado, companheiros na luta pelo desenvolvimento profissional.

É através da arte de escutar que seu espírito se enche de fé e devoção e que você se torna capaz de cultivar a alegria interior e o equilíbrio da mente. A arte de escutar lhe permite alcançar sabedoria, superando toda ignorância. Então, é vantajoso dedicar-se a ela, mesmo que isto lhe custe a vida. A arte de escutar é como uma luz que dissipa a escuridão da ignorância. Se você é capaz de manter sua mente constantemente rica através da arte de escutar, não tem o que temer. Este tipo de riqueza jamais lhe será tomado. Essa é a maior das riquezas.

Dalai Lama

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO</b> .....	17
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1	O LEITE, SEUS COMPONENTES E FATORES DE VARIAÇÃO .....	19
2.1.1	Leite .....	19
2.1.2	Composição do leite .....	20
2.1.2.1	Lactose .....	20
2.1.2.2	Lípides .....	22
2.1.2.3	Fração nitrogenada do leite .....	25
2.1.2.4	Proteína verdadeira e proteína bruta .....	31
2.2	INDICADORES DE QUALIDADE HIGIÊNICA E SANITÁRIA DO LEITE .....	35
2.2.1	Contagem bacteriana do leite .....	35
2.2.2	Contagem de células somáticas do leite .....	39
2.3	DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE NITROGÊNIO E PROTEÍNA .....	41
2.3.1	Análise de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (referência) .....	44
2.3.1.1	Fator de conversão do nitrogênio em proteína e cálculos empregados na quantificação .....	49
2.3.2	Análise de proteína no leite pelo método espectrométrico de absorção no infravermelho médio .....	50
2.3.2.1	Fatores que interferem na acurácia da determinação dos componentes do leite por EIVM .....	58
2.3.2.2	Avaliação da acurácia entre o método de referência e o método indireto por EIVM (segundo IDF) .....	62
2.3.2.3	Indicadores de desempenho dos equipamentos de EIVM .....	65
2.4	PAGAMENTO DO LEITE POR QUALIDADE .....	66
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	70
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	70
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	70
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	71
4.1	COLETA, TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS .....	71
4.2	TESTE DE HOMOGENEIDADE DE AMOSTRA SECUNDÁRIA .....	72

4.3	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES (EIVM) E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CITOMETRIA) .....	74
4.4	CONTAGEM INDIRETA DE MICRORGANISMOS A 30°C/72 HORAS PELO MÉTODO DE CITOMETRIA DE FLUXO. ....	74
4.5	ANÁLISE DE PROTEÍNA BRUTA PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA (KJELDAHL). ....	75
4.5.1	Ensaio de “brancos” na determinação de proteína bruta por Kjeldahl .....	76
4.6	ANÁLISE DE NNP E PROTEÍNA VERDADEIRA PELO MÉTODO DE KJELDAHL .....	76
4.6.1	Ensaio de branco na determinação de NNP .....	77
4.6.2	Avaliação da estabilidade ao congelamento do teor em NNP no soro .....	77
4.6.3	Determinação do teor em proteína verdadeira .....	78
4.7	ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DO NITROGÊNIO .....	78
4.8	EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE URÉIA AO LEITE .....	78
4.9	DELINEAMENTO ESTATÍSTICO .....	79
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
5.1	AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	79
5.2	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS COMPONENTES DO LEITE, CÉLULAS SOMÁTICAS E MICRORGANISMOS .....	80
5.3	PREDIÇÃO DA PROTEÍNA VERDADEIRA NO LEITE .....	82
5.4	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA ACURÁCIA E REPETITIVIDADE NO DOSEAMENTO DA PB .....	83
5.5	AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DO SORO TRICLOROACÉTICO SOBRE A DETERMINAÇÃO DO NNP .....	90
5.6	TESTES DE RECUPERAÇÃO REFERENTES AO MÉTODO DE REFERÊNCIA .....	90
5.7	VARIAÇÕES ENTRE PARÂMETROS .....	91
5.7.1	Variações associadas à CCS .....	91
5.7.2	Variações associadas à produção média diária .....	94
5.8	AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DA URÉIA AO LEITE NA RESPOSTA DE PROTEÍNA BRUTA ANALISADA POR EIVM .....	97
5.8.1	Interferência da adição de uréia na resposta do teor em proteína bruta por EIVM .....	97
5.8.2	Interferência da adição de uréia na resposta do teor em gordura por EIVM .....	99

5.8.3	Interferência da adição de uréia na resposta do teor em lactose por EIVM	100
5.8.4	Interferência da adição de uréia na resposta do teor em sólidos totais por EIVM	101
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	102
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	104
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	116

---

### LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA 1 -	Estrutura química da lactose nas formas alfa (natural) e beta.	21
FIGURA 2 -	Variação dos principais componentes do leite de vaca em função do estágio de lactação.	24
FIGURA 3 -	Variação do NNP do leite em função dos dias de lactação, expresso na forma de teor em mg/100 mL e na forma de percentual do NT.	32
FIGURA 4 -	Interferência de duas concentrações de uréia na determinação da proteína por EIVM, tanto no comprimento de onda de absorção quanto no comprimento de onda de referência, no qual a absorção da proteína é mínima.	33
FIGURA 5 -	Correlação encontrada entre teor em uréia no leite e participação percentual do NNP no NT.	33
FIGURA 6 -	Variação sazonal do teor médio em NNP do leite; Diferenças ao longo dos meses do ano entre o método do Negro de Amido e o método Kjeldahl quando o método do Negro de Amido é calibrado em PB e PV.	33
FIGURA 7 -	Diagrama de dispersão das diferenças entre o método espectroscópico no infravermelho médio e o método de Kjeldahl no doseamento do NT <i>versus</i> teor em NNP do leite de 28 amostras de leite de tanque de refrigeração.	33
FIGURA 8 -	Esquema representativo de citometria de fluxo aplicado na contagem bacteriana em leite cru.	38
FIGURA 9 -	Esquema demonstrativo da formação do fluxo celular na citometria de fluxo.	39
FIGURA 10 -	Representação da conversão da matéria orgânica nitrogenada em sulfato de amônio, da reação que ocorre de liberação de amônio em meio alcalino e do recebimento do amônio destilado em ácido bórico no método de Kjeldahl.	45
FIGURA 11 -	Atenuação do feixe de radiação por uma solução absorvente.	51
FIGURA 12 -	Relações entre absorvâncias e concentrações de gordura (o), proteína (●) e lactose (Δ) em comprimentos de onda de análise.	54
FIGURA 13a -	Principais sistemas de espectrometria no infravermelho: monocromador em filtro.	57

FIGURA 13b -	Principais sistemas de espectrometria no infravermelho: monocromador por rede de difração. ....	57
FIGURA 13c -	Sistemas de espectrometria no infravermelho com separação de radiação com vários comprimentos de onda seguindo o princípio da interferometria com transformada de Fourier. ....	57
FIGURA 14 -	Sítios de absorção do infravermelho médio, em comprimentos de onda de 9,6 $\mu\text{m}$ nas moléculas de lactose (grupamento hidroxila), de 6,5 $\mu\text{m}$ nas moléculas de proteína (grupamento amídico CONH) .....	58
FIGURA 15 -	Sítios de absorção do infravermelho médio, em comprimentos de onda de 5,7 $\mu\text{m}$ (grupamento carbonila C=O dos triacilgliceróis) e 3,5 $\mu\text{m}$ (ligações C-H das cadeias de ácidos graxos). ....	58
FIGURA 16 -	Decomposição da acurácia total de um método indireto em repetitividade e acurácia da média (esta decomposta em exatidão da calibração e acurácia), referente à determinação do componente S na amostra. ....	64
FIGURA 17 -	Fluxograma de obtenção das amostras primária e secundária rastreável ao tanque de refrigeração do leite da propriedade rural, para realização das análises previstas no experimento.....	64
FIGURA 18 -	Aminoácidos empregados nos ensaios de recuperação do método de Kjeldahl de análise de nitrogênio. ....	78
FIGURA 19 -	Gráfico de dispersão entre os dados de % m/m de PB analisada pelo método Kjeldahl e a % m/m de PV, indicando a equação de regressão obtida e o valor do coeficiente de determinação. ....	82
FIGURA 20 -	Distribuição das diferenças de resultados de teor em PB do leite cru obtidos pelos métodos Kjeldahl e de EIVM. ....	84
FIGURA 21 -	Gráfico de dispersão entre os resultados de PB obtidos pelo método indireto EIVM e pelo método de referência de Kjeldahl (NT x 6,38), e respectiva curva de regressão (linha contínua). ....	85
FIGURA 22 -	Disposição vetorial nos eixos CP1, CP2 e CP3 das respostas de associação dos teores em lactose, gordura e ST de leite cru por EIVM com as diferenças entre os dois métodos de quantificação de PB, obtida por análise multivariada das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	87
FIGURA 23 -	Disposição vetorial nos eixos CP1, CP2 e CP3 das respostas de associação dos teores em PB por EIVM e PB por MRK com as diferenças entre os dois métodos de quantificação de PB, obtida por análise multivariada das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	88
FIGURA 24 -	Distribuição espacial dos vetores CP1, CP2 e CP3 extraídos da análise multivariada dos componentes principais, sendo estes os SNG, gordura (G), NNP e diferença entre métodos MRK e EIVM de quantificação da PB (DIF), a partir de dados de análise em 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	90

FIGURA 25 -	Disposição vetorial de CCS, PB analisada por MRK (PB KJ), SNG, gordura e lactose analisados por EIVM, a partir de dados obtidos da análise multivariada de componentes principais dos resultados de análise das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais. ....	94
FIGURA 26 -	Disposição vetorial de CCS, contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas, PB analisada por MRK, gordura (G), lactose (LAC) e ST analisados por EIVM, a partir de dados obtidos da análise multivariada dos resultados de análise das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais. ..	95
FIGURA 27 -	Disposição vetorial de produção média diária de leite (PROD), NNP, gordura (G) e PB por MRK (PB KJ), a partir de dados obtidos da análise multivariada dos resultados de análise das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais. ....	97
FIGURA 28 -	Gráfico de dispersão entre os dados de % m/m de uréia adicionada ao leite e a variação realmente observada na % m/m de PB analisada por EIVM, indicando a equação de regressão obtida e o valor do coeficiente de determinação. ....	99

---

#### LISTA DE TABELAS

---

TABELA 1 -	Composição média do leite de diversas raças européias. ....	20
TABELA 2 -	Fatores que interferem no teor em gordura do leite de vaca. Fonte: Riel (1991) adaptado. ....	23
TABELA 3 -	Distribuição percentual em peso dos constituintes da gordura láctea em leite de vaca. ....	25
TABELA 4 -	Distribuição percentual absoluta de frações nitrogenadas no leite (% m/m ou g/100 g de leite) da província canadense do Québec. ....	27
TABELA 5 -	Distribuição percentual absoluta de frações nitrogenadas no leite (% m/m ou g/100 mL de leite) da província canadense do Québec. ....	27
TABELA 6 -	Participação percentual dos principais compostos do NNP do leite. ..	28
TABELA 7 -	Prazo de adequação à Instrução Normativa nº 51/2002 conforme a região, para contagem padrão em placa do leite cru refrigerado de propriedades rurais. ....	36
TABELA 8 -	Prazo de adequação à Instrução Normativa Nº 51/2002, conforme a região, para CCS do leite cru refrigerado de propriedades rurais. ....	40
TABELA 9 -	Comparação entre os parâmetros empregados pelos métodos de ensaio definidas pelas Instruções Normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para análise de proteína em leite.....	47
TABELA 10 -	Absortividades relativas dos componentes interferentes a comprimentos de onda para determinação de gordura, proteína e lactose. ....	54

TABELA 11 -	Parâmetros de avaliação da performance dos equipamentos de análise de PB por EIVM em leite, quanto a repetitividade e acurácia, segundo a AOAC. ....	65
TABELA 12 -	Parâmetros de composição empregados pelos diversos países membros da FIL, no ano calendário de 2000, em fórmulas de pagamento pela qualidade do leite cru. ....	68
TABELA 13 -	Classes de qualidade dos parâmetros higiênico-sanitários de contagem de germes/mL e células/mL no leite cru de alguns países membros da FIL. conforme International Dairy Federation (2002). ..	69
TABELA 14 -	Indicadores estatísticos de avaliação do Teste de Homogeneidade aplicado às amostras de leite na avaliação do sistema de homogeneização das amostras primárias para obtenção de amostras secundárias. ....	79
TABELA 15 -	Estatística descritiva dos valores obtidos nas análises do leite cru de 200 tanques de refrigeração de 200 propriedades rurais de Minas Gerais, coletadas no período de agosto a novembro de 2005. ....	80
TABELA 16 -	Estatística descritiva da CCS e contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas em leite cru de 200 tanques de refrigeração de 200 propriedades rurais de Minas Gerais, coletadas no período de agosto a novembro de 2005. ....	80
TABELA 17 -	Categorização das 200 amostras de leite cru de tanque de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais coletadas de agosto a novembro de 2002 face aos preceitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51/2002 (BRASIL, 2002a). ....	81
TABELA 18 -	Comparação de médias dos teores em PB pelos métodos MRK e EIVM em uma mesma calibração do EIM. ....	85
TABELA 19 -	Parâmetros de avaliação das equações de regressão obtidas por associação entre os teores em PB obtidos por Kjeldahl e EIVM, por calibração realizada do EIM e indicação de respectivas médias das diferenças entre os dois métodos (referente a um total de 200 amostras de leite de tanque de refrigeração). ....	89
TABELA 20 -	Valores de recuperação do nitrogênio obtidos para o método de Kjeldahl, empregado em sistema de digestão por bloco e destilação automatizada, proporcionados pelo equipamento Kjeltex® 2200 (Foss A/S, Dinamarca). ....	91
TABELA 21 -	Comparação entre médias dos parâmetros obtidos por análise de 200 amostras representativas de leite cru de tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais, dos grupos 1 (CCS ≤ 400.000 células/mL) e grupo 2 (CCS > 400.000 células/mL). ....	92
TABELA 22 -	Comparação de médias de percentuais de participação da PB e PV nos ST e SNG em distribuição pelas classes de CCS (≤ 400.000 células/mL e > 400.000 células/mL). ....	93

TABELA 23 -	Comparação de médias dos parâmetros de qualidade do leite considerando 4 classes de produção média diária de leite em propriedades com criação de girolando (154 tanques de refrigeração amostrados). .....	94
TABELA 24 -	Parâmetros de cálculo estatístico de PB dos quatro grupos experimentais resultantes de diferentes concentrações de uréia adicionada ao leite. ....	97
TABELA 25 -	Quadro de médias das respostas de PB analisada por EIVM dos quatro grupos experimentais relativos ao teor em uréia adicionada ao leite. ....	98
TABELA 26 -	Relação entre os valores teóricos esperados do aumento do teor em PB (por análise por Kjeldahl) de leites adicionados de quantidades conhecidas de uréia e o aumento real encontrado por análise por EIVM. ....	98
TABELA 27 -	Análise de variância da regressão entre os dados de % m/m de uréia adicionada ao leite e a variação realmente observada na % m/m de PB analisada por EIVM. ....	99
TABELA 28 -	Parâmetros de cálculo estatístico de gordura dos quatro grupos experimentais resultantes de quatro diferentes concentrações de uréia adicionada ao leite cru. ....	100
TABELA 29 -	Quadro de médias das respostas de teores em gordura (% m/m) analisada por EIVM dos quatro grupos experimentais relativos ao teor em uréia adicionada ao leite cru. ....	100
TABELA 30 -	Parâmetros de cálculo estatístico de lactose dos quatro grupos experimentais resultantes de diferentes concentrações de uréia adicionada ao leite. ....	100
TABELA 31 -	Quadro de médias das respostas de teor em lactose (% m/m) analisada por EIVM dos quatro grupos experimentais relativos ao teor em uréia adicionada ao leite. ....	101
TABELA 32 -	Parâmetros de cálculo estatístico de sólidos totais dos quatro grupos experimentais resultantes de diferentes concentrações de uréia adicionada ao leite. ....	101
TABELA 33 -	Quadro de médias das respostas de teor em sólidos totais (% m/m) analisada por EIVM dos quatro grupos experimentais relativos ao teor em uréia adicionada ao leite. ....	102

---

**ANEXOS**

---

TABELA 1	Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro gordura (% m/m) analisada por EIVM. ....	116
TABELA 2	Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro proteína (% m/m) analisada por EIVM. ....	116
TABELA 3	Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro lactose (% m/m) analisada por EIVM. ....	116

TABELA 4	Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro sólidos totais (% m/m) analisada por EIVM. ....	116
TABELA 5	Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro contagem de células somáticas (células/mL) normalizado por logaritmo decimal, analisada por citometria de fluxo. ....	117
TABELA 6	Estudo de dispersão de frequência em tabela de contingência ( $\chi^2$ ) para os parâmetros de qualidade SNG, PB, CCS e CBT, quanto ao atendimento dos preceitos da Instrução Normativa nº 51/2002. ....	117
TABELA 7	Análise de variância da regressão entre os dados de % m/m de PB analisada pelo método Kjeldahl e a % m/m de PV obtida a partir do NNP analisado por Kjeldahl. ....	117
TABELA 8	Análise de variância da regressão da associação entre o teor em PB (%m/m) quantificado por MRK e EIVM das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	117
TABELA 9	Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 1. ....	118
TABELA 10	Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 2. ....	118
TABELA 11	Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 3. ....	118
TABELA 12	Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 4. ....	118
TABELA 13	Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 5. ....	119
TABELA 14	Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 6. ....	119
TABELA 15	Avaliação da associação entre as diferenças dos métodos de quantificação da PB por MRK e EIVM categorizados em 3 classes e os componentes principais do leite, também categorizados em teor em três classes, por meio da distribuição qui-quadrado. ....	120
TABELAS 16 A 20	Análise de componentes principais da análise multivariada da associação de teores em gordura, ST e lactose por EIVM com as diferenças entre os métodos MRK e EIVM na quantificação da PB em leite cru de 200 amostras de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	121

TABELAS A 25	21	Análise de componentes principais da análise multivariada da associação de diferenças entre os métodos MRK e EIVM na quantificação de PB com os dois métodos, a partir de dados obtidos de 200 amostras de leites de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	121
TABELA 26		Avaliação da associação entre as diferenças dos métodos de quantificação da PB por MRK e EIVM categorizados em 3 classes e calibrações realizadas do EIM. ....	122
TABELAS A 31	27	Análise de componentes principais da análise multivariada da associação de teores em gordura e SNG por EIVM e NNP por MRK com as diferenças entre os métodos MRK e EIVM na quantificação da PB em leite cru de 200 amostras de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	123
TABELA 32		Análise de variância das amostras de soro tricloroacético submetidas e não submetidas a congelamento por 90 dias. ....	123
TABELAS A 37	33	Análise de componentes principais da análise multivariada da associação de teores em gordura, lactose e SNG por EIVM e PB por MRK com CCS de 200 amostras de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	124
TABELAS A 42	38	Análise de componentes principais da análise multivariada da associação produção média diária de leite, teores em gordura e ST por EIVM, CCS, PB por MRK e contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas de 200 amostras de leites de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	125
TABELAS A 47	43	Análise de componentes principais da análise multivariada da associação produção média diária de leite, teores em gordura por EIVM, PB por MRK e NNP de 200 amostras de leites de tanques de refrigeração de Minas Gerais. ....	126
TABELA 48		Análise de variância da resposta PB com as duas fontes de variação constituídas pelo grupo experimental de concentração de uréia adicionada e pelas amostras. ....	126
TABELA 49		Análise de variância da resposta teor em gordura no leite (% m/m) com os fatores grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras. ....	126
TABELA 50		Análise de variância da resposta teor em lactose (% m/m) com os fatores grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras. ....	127
TABELA 51		Análise de variância da resposta teor em sólidos totais (% m/m) com os fatores grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras. ....	127

---

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ALC	Ácido linoléico conjugado
AOAC	American Organization of Analytical Chemists;
CBI	Contagem bacteriana individual
CBT	Contagem bacteriana total;
CCS	Contagem(ns) de células somáticas;
CBI	Contagem bacteriana individual;
CEE	Comunidade Econômica Européia

CV	Coefficiente de variação;
DBC	Capacidade de ligação do corante (do inglês <i>dye binding capacity</i> );
DIF	Diferença
DP	Desvio-padrão amostral;
EIM	Espectrômetro(s) de infravermelho médio;
EIVM	Espectrometria de absorção no infravermelho médio;
f.e.	Frequência esperada.
f.o.	Frequência observada;
FIL	Federação Internacional de Laticínios;
FTIR	Espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier;
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
IDF	International Dairy Federation (Federação Internacional de Laticínios);
IV	Infravermelho
KJ	Kjeldahl
LAC	Lactose
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
MRK	Método de referência de Kjeldahl;
NNC	Nitrogênio não caseínico;
NNP	Nitrogênio não protéico;
NT	Nitrogênio total;
P.E.	Ponto de ebulição;
PB	Proteína bruta;
PPQ	Pagamento por qualidade;
PV	Proteína verdadeira;
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite;
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal;
SNG	Sólidos não gordurosos
ST	Sólidos totais
UFC	Unidade formadora de colônia

## RESUMO

Com a necessidade de adequação do leite cru a padrões físico-químicos e microbiológicos estabelecidos pela nova legislação brasileira em vigor e pelos estabelecimentos processadores, técnicas indiretas com elevada capacidade analítica, a exemplo de outros países, têm sido implantadas. Foram analisadas amostras de leite coletadas em 200 tanques de refrigeração de diferentes propriedades rurais de Minas Gerais. A proteína, componente geralmente de maior valorização em planos de pagamento por qualidade, foi analisada comparativamente pelo método Kjeldahl e por espectrometria de absorção no infravermelho médio, apresentando respectivamente  $S_r$  de 0,0124 e de 0,0106% m/m, médias de 3,113% m/m e 3,095% m/m e desvio-padrão de 0,168 e 0,171% m/m. A quantificação dos componentes do leite revelou médias dos teores em nitrogênio não protéico de 26,06 mg/100g, nitrogênio não protéico no nitrogênio total de 5,35%, proteína bruta por Kjeldahl de 3,113% m/m, e por espectrometria no infravermelho médio de 3,095% m/m, proteína verdadeira de 2,947% m/m, gordura de 3,458% m/m, lactose de 4,551% m/m e sólidos totais de 12,075% m/m. A contagem de células somáticas e a contagem de microrganismos apresentaram respectivamente médias geométricas de 346.500 células/mL e 153.500 UFC/mL. Estabeleceu-se um modelo linear de predição da proteína verdadeira em função da proteína bruta, de utilidade pelas indústrias processadoras de produtos lácteos. Avaliou-se a curva de regressão entre os teores em proteína bruta obtidos pelos métodos de referência (Kjeldahl) e indireto por espectrometria de absorção no infravermelho médio acusando desvio significativo do intercepto, da inclinação e do centro de gravidade dos resultados. A associação entre componentes do leite de níveis de produção das propriedades foi avaliada. Quanto à avaliação do efeito da adição de uréia ao leite nos teores em proteína bruta analisados por espectrometria de absorção no infravermelho médio (hipótese de fraude), verificou-se interferência significativa nas determinações analíticas.

**Palavras-chave:** composição do leite; infravermelho, proteína, espectrometria, Kjeldahl, uréia.

## ABSTRACT

Being necessary to adjust the raw milk quality to physical, chemical and microbiological standards from the new Brazilian legislation in force and from the processor establishments, indirect techniques with higher analytical capacity, following the examples taken from other countries, have been put into practice. In order to carry out this study, two hundred bulk milk samples from dairy farms situated in Minas Gerais were collected and analyzed. The milk protein, which is generally regarded as the milk component with highest value in payment for quality systems, was analyzed comparatively by the Kjeldahl and mid-infrared methods, from which the respective results for the  $S_r$  were 0.0124 and 0.0106% wt/wt, the averages were 3.113% wt/wt and 3.095% wt/wt, with a standard deviation of 0.168 and 0.171% wt/wt. The average results were found to be 26.06 mg/100g of non protein nitrogen, 5.35% of non protein nitrogen into total nitrogen, 3.113% wt/wt of crude protein analysed by Kjeldahl and 3.095% wt/wt by mid-infrared method, 2.95% wt/wt of true protein, 3.46% wt/wt of fat, 4.55 % wt/wt of lactose and 12.08 % wt/wt of total solids. The geometric average result for somatic cells count was 346,500 cells/mL and for enumeration of microorganisms was 153,500 CFU/mL. A prediction linear model for the true protein content in milk in function of the crude protein content was established, in order to be useful for dairy processing industries. The regression curve calculated from crude protein contents obtained by the reference (Kjeldahl) and indirect mid-infrared methods was evaluated, resulting in significant deviations of the intercept, the slope and the centre of gravity of the results. The association among milk components and production levels of the farms was evaluated. Concerning to the effect of the addition of urea to milk in the mid-infrared spectrometric crude protein results (fraud hypothesis), significant interferences were detected in the analytical results.

**Keywords:** milk composition, infra-red; infrared; protein; spectrometry; Kjeldahl, urea.

## 1 INTRODUÇÃO

Entre os produtos agropecuários, o leite sempre assumiu grande importância econômica e social no Brasil e no mundo, desempenhando papel importante no suprimento de alimentos à população e na geração de emprego e de renda.

Conforme cálculos elaborados a partir de dados do Ministério da Agricultura (MAPA, 2006), em 2002, o leite representou 16% do valor bruto da produção pecuária no país, com valor de 6,6 bilhões de reais. O mercado externo do agronegócio de leite e derivados tem tradicionalmente colocado o Brasil na condição de importador. Entretanto, em 2004 houve inversão da balança comercial brasileira do complexo leite, com superávit de 11,4 milhões de dólares, abrindo ao país, nova possibilidade de ganhos adicionais pelo comércio exterior. Soma-se a este cenário, o aumento progressivo da produção brasileira de leite, que segundo cálculos a partir de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2006), houve crescimento médio de 3,9% ao ano no período de 1999 a 2004.

Para que o Brasil se consolide como exportador de produtos lácteos, torna-se necessária a melhoria da qualidade do leite *in natura*, adequando-se aos padrões de qualidade exigidos pela Instrução Normativa N°51 e pelos mercados internacionais. Além disto, a execução de medidas e programas de conscientização, envolvimento, credenciamento e fiscalização de produtores e estabelecimentos industriais desencadeadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), além das iniciativas das demais instituições públicas e privadas da cadeia produtiva do leite e derivados são importantes para o agronegócio do leite.

Em 2004, o volume de leite produzido no país foi superior a 23 bilhões de litros, sendo que estabelecimentos sob inspeção federal, estadual e municipal captaram 14,5 bilhões de litros. Assim, ampliar a capacidade de rastreamento da produção nacional de leite, sobretudo aplicada aos demais 8,5 bilhões de litros não submetidos à inspeção oficial de qualquer natureza, é fundamental.

O Brasil apresenta também, um mercado interno potencial para o leite e derivados. O consumo per capita de leite no Brasil estabilizou-se após 1998 na ordem de 130 litros/habitante/ano, bem abaixo das taxas de consumo recomendadas pelo Ministério da Saúde, de 146, 256 e 219 litros/habitante/ano respectivamente nas faixas etárias de 0 a 10 anos, 11 a 19 anos e acima de 20 anos (Carvalho et al., 2005). Estes valores são bem inferiores, por exemplo, ao consumo médio de 291 litros/habitante/ano no Canadá, em 1998. A população brasileira deveria, portanto ter consumido em 2004 a quantidade de 38,5 bilhões de litros de leite, o que representa uma potencialidade de expansão do consumo pelo mercado interno de 14,7 bilhões de litros/ano. Certamente esta expansão do consumo depende de fatores sociais, econômicos e de mercado, enquanto que o aumento da produção depende do aumento da produtividade do rebanho leiteiro nacional, que passa obrigatoriamente pelas políticas de curto, médio e longo prazo a serem adotadas para o setor, contemplando os pequenos, médios e grandes produtores com o acesso a tecnologias disponíveis.

Além disto, o agronegócio do leite é de grande importância na geração de empregos e na fixação do homem no campo. Ampliar a participação da agropecuária no comércio é, portanto, primordial para o crescimento do setor agrícola e do próprio crescimento econômico geral da nação.

A Instrução Normativa n° 51 de 18 de setembro de 2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2002a), por meio de seus anexos I a VI, complementou a legislação sanitária federal, particularmente a Lei 1283 de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal (Brasil, 1950) e ao Decreto n° 30691 de 29 de março de 1952 (Brasil, 1952) que instituiu o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Esta complementação normativa veio suprir as mudanças que ocorreram nas condições de manejo dos rebanhos leiteiros, exploração e sobretudo, conservação sob refrigeração do leite cru nas propriedades rurais e seu transporte a granel aos

estabelecimentos beneficiadores, processo este comumente conhecido como “granelização”.

Além das restrições de qualidade impostas pela legislação vigente, o setor de leite no Brasil experimenta, por meio da Rede Brasileira da Qualidade do Leite, a possibilidade sem precedentes de colocar em prática, ferramentas de monitorização dos principais componentes do leite (gordura, proteína, lactose, sólidos), de bactérias e de células somáticas, atendendo as demandas de produtores (melhoramento genético e nutricional do rebanho) e estabelecimentos processadores (menor custo, melhor rendimento e qualidade dos produtos processados). A avaliação da qualidade do leite cru antes da implantação da refrigeração do leite na propriedade rural e seu transporte a granel aos estabelecimentos processadores foi sempre realizada em iniciativas isoladas, sem uma política pública ou privada consistente para que a qualidade desse um salto efetivo no Brasil. Isto se deveu em parte à complexidade dos procedimentos analíticos disponíveis, laboriosos, de alto custo e baixa capacidade analítica. A Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (Brasil, 2002b) atualmente conta com equipamentos de alta capacidade analítica, com expectativa de acurácia e precisão adequadas aos propósitos previstos.

No pagamento por qualidade, resultados analíticos na quantificação de proteína, gordura, lactose, sólidos, células somáticas e de microrganismos adquirem uma importância cada vez maior para indústrias de laticínios e produtores. Para que ocorra uma melhoria real da margem de lucro, redução dos custos gerenciais e operacionais, melhoraria da qualidade dos produtos que tradicionalmente já compõem as opções de processamento das empresas e ampliação do desenvolvimento de novos produtos, é imprescindível o controle de todo o processo, desde a coleta das amostras até os procedimentos analíticos.

Como ocorreu em outros países, dentre os principais componentes do leite, a gordura e a proteína tendem a ser mais valorizados. A seleção genética e a melhoria do manejo do rebanho podem melhorar o teor de sólidos do leite, com ganhos para os produtores e indústrias. A proteína, a exemplo do que tem

ocorrido em outros países do mundo, tem adquirido maior importância em planos de pagamento de qualidade no Brasil até então adotados.

Considerando a importância social e econômica do leite e da RBQL no contexto de diagnóstico da qualidade da produção nacional, este trabalho objetivou avaliar a relação entre proteína verdadeira, proteína bruta e nitrogênio não protéico e a associação destes parâmetros com demais indicadores da qualidade do leite cru refrigerado de propriedades rurais de Minas Gerais.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 LEITE, SEUS COMPONENTES E FATORES DE VARIAÇÃO

#### 2.1.1 Leite

O leite é um fluido secretado pela fêmea de todas as espécies de mamíferos, e tem a função primordial de atender demandas nutricionais e fisiológicas do recém-nascido, promovendo o fornecimento de imunoglobulinas, enzimas e seus inibidores, veicular compostos que atuam como transportadores de proteínas, fatores de crescimento e agentes antibacterianos (Fox & McSweeney, 1998). O leite é um dos alimentos de maior importância para a sociedade humana (Dürr, 2004) e sob o aspecto físico-químico, Biggs (1987) define o leite como um fluido que consiste de uma suspensão coloidal de micelas de caseína de diâmetro variando de 0,03  $\mu\text{m}$  a 0,3  $\mu\text{m}$  e uma emulsão de glóbulos de gordura que apresentam diâmetro variando de 1 a 20  $\mu\text{m}$ .

A definição legal de leite no Brasil é conferida pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA): “Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda” (Brasil, 1952).

### 2.1.2 Composição do leite

Sendo um fluido biológico, o leite apresenta composição muito variável, constituído principalmente por gordura, proteína, lactose, minerais e centenas de outros em menor quantidade, tais como vitaminas, íons metálicos e compostos flavorizantes (Fox & McSweeney, 1998). A composição do leite de vaca varia tanto no aspecto quantitativo quanto qualitativo, principalmente em função da individualidade,

da raça, do estado de saúde, da condição nutricional, do estágio de lactação e da idade do animal e também do intervalo entre ordenhas (Fox & McSweeney, 1998). Nickerson (1995) apresenta composições médias dos principais componentes do leite de diversas raças europeias (Tabela 1), demonstrando ser a gordura o componente que mais varia em função do fator raça, seguida da proteína e dos sólidos totais (ST) e por último, da lactose.

Tabela 1. Composição média do leite de diversas raças europeias.

Raças europeias	Gordura (%)	Caseína (%)	Proteínas do soro (%)	Lactose (%)	Cinzas (%)	Sólidos totais (%)
Ayrshire	3,97	2,68	0,60	4,63	0,72	12,69
Pardo suíço	3,80	2,63	0,55	4,80	0,72	12,69
Guernsey	4,58	2,88	0,61	4,78	0,75	13,69
Holstein	3,56	2,49	0,53	4,61	0,73	11,91
Jersey	4,97	3,02	0,63	4,70	0,77	14,15

Fonte: Nickerson (1995)

#### 2.1.2.1 Lactose

A lactose é o principal carboidrato presente no leite dos mamíferos, e este contém também em pequenas quantidades glicose, frutose, glicosamina, galactosamina, ácido neuramínico e oligossacáridos (Fox & McSweeney, 1998). Conforme Wattiaux (2006), a glicose e a galactose são encontradas no leite nos teores de 14 mg/100 g e 12 mg/100 g, respectivamente, e são os monossacáridos de formação da lactose. O teor em lactose varia no leite de vaca em função da raça, da individualidade do animal, processos infecciosos do úbere e sobretudo, do estágio de lactação (Fox & McSweeney, 1998), embora seu percentual no leite seja relativamente constante, entre 4,8% e 5,2% de lactose monoidratada (Goff & Hill, 1993).

A lactose apresenta-se sob duas formas, a  $\alpha$ -lactose e a  $\beta$ -lactose, diferentes entre si em função de qual isômero da glicose,  $\alpha$  ou  $\beta$ ,

participa da formação do dissacarídeo. A figura 1 demonstra as estruturas químicas dos dois anômeros da lactose.

O metabolismo dos carboidratos nos ruminantes se dá inicialmente pela degradação da celulose e hemicelulose (fibras) e pela fermentação de amido e carboidratos mais simples por microrganismos presentes no rúmen. Durante a fermentação ruminal, há produção principalmente de energia, metano, dióxido de carbono e ácidos graxos voláteis como o ácido acético (acetato), o ácido propiônico (propionato) e o ácido butírico (butirato). Ocorre também a formação de lactato. Estes ácidos são absorvidos pela parede do rúmen. No fígado, a glicose é sintetizada principalmente a partir do propionato, mas pode ser sintetizada também a partir de aminoácidos resultantes do metabolismo de proteínas e do lactato. Do fígado, a glicose é levada pela circulação sanguínea à glândula mamária onde é transformada em lactose (Wattiaux, 2006).

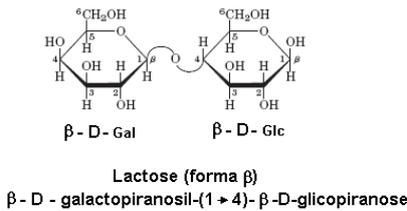
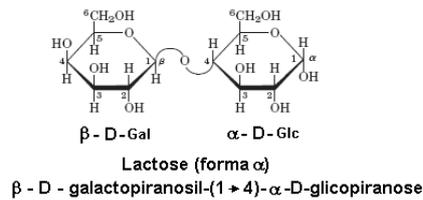


Figura 1: Estrutura química da lactose nas formas alfa (natural) e beta.

Fonte: Nelson & Cox (2005) (traduzido e modificado).

A concentração de lactose decresce progressiva e significativamente durante a lactação (Figura 2), contrastando com o que ocorre com a proteína e com a gordura, cuja concentração no leite diminui durante o começo da lactação e aumenta significativamente na segunda metade da lactação (Fox & McSweeney 1998).

O decréscimo do teor em lactose do leite em casos de rebanhos acometidos de mastite deve-se provavelmente em parte ao dano sofrido pelo epitélio glandular dos alvéolos, com redução da síntese e secreção celular. Como a lactose possui um papel importante no equilíbrio osmótico do leite, ocorrendo a redução em seu teor, há um influxo de eletrólitos do sangue para o leite com o objetivo de manter aquele equilíbrio (Auldíst & Hubble, 1998), havendo portando elevação dos teores em cloreto e sódio (Fox & McSweeney, 1998). Em caso de mastite, há evidências de que a lactose seja transferida do leite para o sangue por via paracelular (Auldíst et al., 1995), o que explica o aumento da concentração de lactose no sangue e na urina do animal (Auldíst & Hubble, 1998). Auldíst et al (1995) e Auldíst & Hubble (1998) relatam também como causa do decréscimo do teor em lactose do leite de animais acometidos de mastite o fato de muitos dos microrganismos causadores do processo inflamatório serem fermentadores daquele carboidrato.

Bueno et al. (2004) observaram o decréscimo do

teor em lactose em leites com maiores contagens de células somáticas, com uma variação de 5,22% entre leites com menos de 200.000 células/mL e leites com mais de 1.000.000 células/mL, sendo o componente do leite que mais apresentou decréscimo em seu teor. Neste mesmo estudo, foi observado o decréscimo significativo de 0,44% no teor em lactose entre uma classe de leites com contagem bacteriana total igual ou inferior a 10.000 UFC/mL e uma classe com contagem bacteriana total superior a 1.000.000 UFC/mL, o que foi atribuído à provável facilidade de degradação da lactose por microrganismos.

Os métodos normatizados pela American Organization of Analytical Chemists (AOAC) para quantificação da lactose em leite são o 896.01 (polarimétrico), o 930.28 (gravimétrico por pesagem de óxido cúprico reduzido), o 984.15 (enzimático) e o 972.16H (espectrometria de absorção no infravermelho médio) (Bradley Jr., 2000). A Federação Internacional de Laticínios (FIL) não possui método químico normatizado para quantificação de lactose em leite, tendo sido o método International IDF Standard 028A:1975 (polarimétrico) revogado (IDF, 2006), restando o método indireto por espectrometria de absorção no infravermelho médio (EIVM) (IDF, 2000). O Canadian National Committee (1994) preconiza o uso do método cromatográfico.

### 2.1.2.2 Lípidos

O leite dos mamíferos contém lipídios, e a função nutricional primordial deles é constituir uma fonte energética para o recém-nascido. De forma geral, as funções que os lipídeos do leite desempenham em prol do ser humano são: nutricional como fonte de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis; e tecnológica, como agente flavorizante em alimentos que empregam o leite em sua composição (Fox & McSweeney, 1998).

A gordura do leite apresenta-se na forma de glóbulos com diâmetros variando de menos que 1 µm a aproximadamente 10 µm, constituídos pela gordura ligada a substâncias bipolares, como fosfolípidos, colesterol, proteínas, enzimas, etc., com a maior parte deles apresentando diâmetro em torno de 1 µm (Jensen, 2002). Fox e McSweeney (1998) citam diâmetros do glóbulo de gordura de 0,1 a 20 µm, com média de 3,5 µm

O metabolismo de produção da gordura do leite pelas vacas segue duas vias principais. Os triacilgliceróis ingeridos pela vaca são hidrolisados por microrganismos ruminais com formação de glicerol e ácidos graxos livres. No rúmen ocorre a hidrogenação dos ácidos graxos insaturados, assim como a formação de fosfolípidos para compor a membrana celular microbiana. Neste estágio, os fosfolípidos representam de 10 a 15% e os ácidos graxos saturados de 85 a 90% dos lipídeos. No intestino ocorre a digestão dos fosfolípidos microbianos e a absorção dos ácidos graxos. Nas células intestinais os ácidos graxos ligam-se ao glicerol, havendo a formação dos triacilgliceróis. Estes últimos, junto com alguns ácidos graxos livres, colesterol e outros tipos de lipídeos em pequena proporção se ligam a proteínas formando os quilomícrons, que passam para o sangue por meio das vias linfáticas. Na passagem do sangue para o tecido adiposo, os quilomícrons são hidrolisados a ácidos graxos e o glicerol resultante permanece na circulação sanguínea. No tecido adiposo pode haver a formação novamente de triacilgliceróis a partir dos ácidos graxos e de glicerol produzido a partir da glicose, quando então são armazenados. Havendo a necessidade de sua degradação, os triacilgliceróis são novamente hidrolisados a ácidos graxos e glicerol, que são transferidos

para a corrente sanguínea e remetidos ao fígado. Neste órgão, pode haver formação de glicose a partir do glicerol e de triacilgliceróis, forma na qual os lipídeos são armazenados. Pode ocorrer também a formação de quilomícrons, que retornam à corrente sanguínea. Na passagem da corrente sanguínea para a glândula mamária, os quilomícrons originados ou no intestino ou no fígado, são hidrolisados a ácidos graxos e glicerol, sendo que este último permanece na circulação sanguínea. Na glândula, os ácidos graxos se ligam ao glicerol produzido por via glicolítica, formando os triacilgliceróis de cadeia longa presentes na gordura do leite. Os triacilgliceróis de cadeia curta presentes na gordura do leite seguem uma outra via metabólica para a sua formação: o acetato, o butirato e o propionato formado no rúmen por meio do metabolismo dos carboidratos são direcionados ao fígado pela corrente sanguínea, sendo que compostos cetônicos formam-se na parede ruminal a partir de parte do acetato e do butirato. No fígado o butirato é transformado em compostos cetônicos, o mesmo podendo ocorrer com ácidos graxos resultantes do metabolismo de lipídeos. Ainda no fígado, o propionato sofre sua conversão em glicose. Deste modo, glicose, compostos cetônicos e acetato são direcionados do fígado à corrente sanguínea, podendo ser convertidos à proteína no músculo ou triacilgliceróis no tecido adiposo. Na glândula mamária, o acetato e os compostos cetônicos extraídos da corrente sanguínea combinam-se com o glicerol obtido por via glicolítica, resultando na formação sobretudo de triacilgliceróis de cadeia curta (Wattiaux, 2006).

No leite de vaca, a gordura é o componente de maior variabilidade quantitativa, podendo variar de 2,2 a 4,0%, (Burchard & Block, 1998) ou de 3,0 a 5,0% (Jensen, 2002), o que é altamente influenciado por genética e fatores ambientais (Burchard & Block, 1998), estágio de lactação (Figura 2) e sazonalidade (Fox & McSweeney, 1998), raça (Cerbulis & Farrell, 1975), mastite (Kitchen, 1981; Fox & McSweeney, 1998; Bueno et al. 2000) e alimentação do gado (Fox & McSweeney, 1998; Burchard & Block, 1998; Lanna & Medeiros, 2000). Riel (1991) relaciona vários fatores que influenciam o teor em gordura no leite de vaca, conforme a Tabela 2.

O teor em gordura do leite diminui no período de 4 a 6 semanas após o parto e em seguida

aumenta uniformemente no restante da fase de lactação, sobretudo na fase final. O balanço energético negativo comum no início da lactação leva à queda pronunciada do teor em gordura e proteína do leite, e nesta época, é adequado o incentivo à maximização do

consumo de nutrientes, com especial atenção à fibra detergente neutra, para reverter o processo e manter os níveis de gordura e fontes de carboidratos prontamente fermentáveis (Burchard & Block, 1998).

Tabela 2. Fatores que interferem no teor em gordura do leite de vaca.

Fatores	Variações
Individualidade do animal	1 a 2% no teor em gordura
Raça	Jersey > Guernsey > Ayrshire > Holstein
Lactação	Diminui no início da lactação e aumenta progressivamente até o fim desta.
Nutrição	Traços
Temperatura	Quanto maior a temperatura, menor é o teor em gordura do leite
Idade	O teor em gordura diminui com a idade
Quarto mamário	Até 1% entre quartos
Estado de saúde da vaca	Patologias podem diminuir o teor em gordura
Ordenha	O leite da segunda ordenha pode conter até 0,4% de gordura a mais que o da primeira ordenha
Exercício físico	Aumento de 0,2 a 0,3% (absolutos) no teor em gordura

Fonte: Riel (1991) adaptado.

Na mastite, os teores em gordura e nos outros componentes tendem a diminuir (Kitchen, 1981; Auldist & Hubble, 1998; Fox & McSweeney, 1998) em razão da menor capacidade de síntese do tecido mamário (Kitchen, 1981; Fox & McSweeney, 1998). Entretanto, Bruckmaier et al. (2004) citam um aumento do teor em gordura do leite proporcionado pela redução do volume de leite produzido acompanhado de uma leve redução da síntese de gordura, o que é acompanhado de uma menor produção total de gordura. Estudos de Bueno et al. (2004) em leite brasileiro não observaram alteração do teor em gordura em leites com Contagem de células somáticas (CCS) acima de 200.000 células/mL, sendo de maneira geral, o componente do leite

que menos apresentou alterações quantitativas naquele estudo em função da CCS.

Os quartos do úbere, por serem anatomicamente separados, secretam o leite com teores diferentes em gordura. Considerando ainda o intervalo entre a primeira e a segunda ordenha, a produção de leite e o teor em gordura do leite são maiores na segunda (Fox & McSweeney, 1998).

Os óleos ricos em ácidos graxos insaturados quando incorporados à alimentação da vaca apresentam efeito tóxico para os microrganismos que hidrolisam a celulose, diminuindo a digestão ruminal da fibra, com

conseqüente depressão da produção de acetato e propionato. Sendo estes ácidos precursores da gordura do leite, há uma depressão na quantidade dela produzida pelo animal (Burchard & Block, 1998). Lanna & Medeiros. (2000) citando estudos conduzidos por Baumgard et al. (2000), fazem referência ao ácido graxo poliinsaturado 18:2 trans 10, cis 12 como a substância responsável pela inibição da síntese da gordura na glândula mamária, explicando o fato descrito por Fox & McSweeney (1998), de a alimentação do gado com óleos de peixe provocar uma grande diminuição do teor em gordura do leite, devido à presença de ácidos graxos poliinsaturados.

A inclusão controlada de lipídios nos níveis de 6 a 8% da dieta aumenta o teor em gordura do leite e poderiam ser incorporados até mesmo nos níveis de 9 a 10% da dieta total em condições de proteção ruminal, como por exemplo a adição na forma de sementes oleaginosas inteiras ou amassadas, protegidas da fermentação ruminal ou ligadas ao cálcio (Burchard & Block, 1998).

Vacas com déficit alimentar tendem a diminuir a produção de leite, mas com pequeno efeito na sua quantidade relativa (teor) de gordura (Fox & McSweeney, 1998). Como conseqüência, tem-se a redução absoluta da quantidade de gordura produzida.

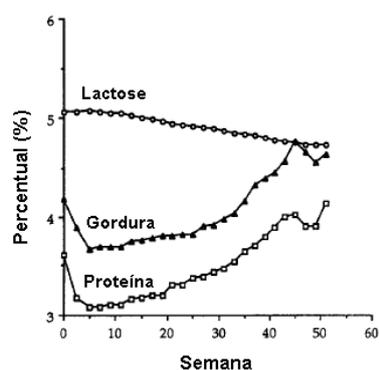


Figura 2: Variação dos principais componentes do leite de vaca em função do estágio de lactação. Fonte: Fox & McSweeney (1998).

Há relação entre a presença de forragens nas dietas de gado leiteiro e a concentração de gordura no leite, mas há dependência quanto ao tipo, a qualidade e a forma física dos diferentes alimentos que são fontes de fibra, sendo um consenso que a dieta do gado leiteiro não contenha menos de 75% em fibra detergente neutra (Burchard & Block, 1998). Segundo estes autores, a disponibilidade biológica do alimento também interfere no teor em gordura do leite, uma vez que forragens excessivamente picadas prejudicam a eficiência deste alimento em manter o bom estado do rúmen, o que leva a uma acidose subclínica, diminuindo a quantidade de ácido graxo volátil acetato, e sendo este precursor na síntese de ácidos graxos, ocorre redução no teor em gordura do

leite.

Em razão do valor econômico da gordura láctea, sempre houve uma pressão comercial em se aumentar o rendimento do leite em gordura por animal, por meio de técnicas nutricionais ou genéticas (Fox & McSweeney, 1998). Entretanto, a valorização da proteína frente à gordura e a mudança de hábitos alimentares da população têm levado à aplicação de um sistema de quota sobre o leite e a gordura do leite na Europa, o que tem conduzido fazendeiros a limitarem o teor em gordura no leite. O controle deste teor por meio de nutrição da vaca tem se mostrado mais fácil que por meio de genética (Jurjanz et al., 1998).

A composição da gordura do leite é altamente influenciada pelo estágio de lactação (Palmquist et al., 1993), sendo constituída de 95 a 98% de triacilgliceróis (Palmquist et al., 1993; Varnam & Sutherland, 1994; Fox & McSweeney, 1998), contendo também diacilgliceróis, monoacilgliceróis, colesterol na forma esterificada e livre, ácidos graxos livres e fosfolípidos (Fox & McSweeney, 1998). A Tabela 3 demonstra a participação de cada um destes componentes na gordura do leite de vaca.

A quantidade e a composição da dieta em gordura oferecida às vacas são os principais responsáveis pela alteração da composição da gordura do leite, em comparação com outros componentes fornecidos. Provavelmente, as variações regionais e sazonais na composição e quantidade de gordura devem-se mais a diferenças entre fontes de alimentos (Palmquist et al., 1993).

Mais recentemente, tem-se dado importância à manipulação dos componentes da gordura do leite, sobretudo em relação ao tamanho da cadeia alifática dos ácidos graxos e ao número de insaturações, face à demanda de se oferecer à população produtos mais saudáveis. O perfil de ácido graxo do leite é altamente influenciado pela dieta (Fox & McSweeney, 1998) e a seleção genética para proporcionar o aumento do teor em gordura do leite aumenta a participação de ácidos graxos de cadeia curta e reduz a participação de ácidos graxos de cadeia longa (Palmquist et al., 1993). Recentemente, estudos de Lanna & Medeiros (2000) demonstraram a aplicação do ácido linoléico conjugado na forma isomérica trans (*trans*-ALC) no aumento da produção leiteira, do teor em proteína em longo prazo em condições de pastoreio, além de permitir a obtenção de leite com um perfil de ácido graxo mais benéfico à saúde humana.

Tabela 3. Distribuição percentual em peso dos constituintes da gordura láctea em leite de vaca.

Classe de lipídio	Participação percentual (em peso)	
	Fox & McSweeney (1998)	Jensen (2002).
Triacilgliceróis	97,5%	97 a 98%
Diacilgliceróis	0,36%	0,28 a 0,59%
Monoacilgliceróis	0,027%	0,16 a 0,38%
Colesterol esterificado	Traços	-
Colesterol livre	0,31%	0,419%
Ácidos graxos livres	0,027%	0,10 a 0,44%
Fosfolípidos	0,6%	0,2 a 1,0%

Fonte: Fox & McSweeney (1998) e Jensen (2002).

Mudanças na composição da gordura do leite, especialmente aquelas resultantes da suplementação em gordura à alimentação, são acompanhadas por outras alterações, que incluem a diminuição da concentração protéica, aumento da concentração de uréia, de citrato e de cálcio solúvel, mudanças estas que alteram o rendimento do leite na fabricação de queijos e a estabilidade térmica do leite (Palmquist et al., 1993).

A maior variabilidade dos ácidos graxos presentes na gordura do leite é determinante do maior potencial flavorizante frente a outros tipos de gorduras (Fox & McSweeney, 1998).

A quantificação da gordura no leite encontra-se normatizada pela AOAC por meio do método de referência 905.02 (Roese-Gottlieb) e pela FIL por meio dos métodos International IDF Standard 1D:1996, de extração (IDF, 1996) e 141C:2000, por EIVM (IDF, 2000).

### 2.1.2.3 Fração nitrogenada do leite

Segundo Wattiaux (2006), as proteínas do leite têm sua origem metabólica no nitrogênio ingerido pela vaca, principalmente na forma de aminoácidos, nitrogênio não protéico (NNP) e proteínas. No rúmen, o NNP ingerido sofre ação

microbiana e é transformado em amônia, que, por sua vez é em sua maior parte transformada em proteína microbiana em um processo que envolve consumo de energia resultante do metabolismo dos carboidratos. As proteínas de origem alimentar, uma vez no rúmen, podem seguir duas vias metabólicas: serem convertidas em aminoácidos e amônia e posteriormente em proteína microbiana; ou não sofrerem nenhuma alteração. Atingindo o abomaso e o intestino, as proteínas de origem microbiana e proteínas que atravessaram o rúmen inalteradas são submetidas à ação enzimática, convertendo-se em aminoácidos. Nesta forma mais simples são passíveis de transferência à corrente sanguínea através da parede intestinal. Entretanto, uma parte das proteínas (20%) é eliminada junto às fezes. Uma vez na corrente sanguínea, os aminoácidos sofrem passagem pelo fígado, a partir de onde são conduzidos à corrente sanguínea para posteriormente serem convertidos em tecido muscular, proteínas do leite ou se necessário, energia. A parte da amônia que no rúmen não participou da síntese de proteínas microbianas é conduzida pela corrente sanguínea ao fígado, onde, junto com a amônia oriunda do metabolismo hepático de aminoácidos, sofre conversão a uréia. Este composto pode ser conduzido pela corrente sanguínea à glândula salivar, ao rúmen, à glândula mamária e ao rim. Na glândula mamária a uréia é excretada e veiculada pelo leite e no rim, pela urina. A uréia que é direcionada à glândula salivar e ao rúmen é reconduzida à síntese de proteína microbiana, sendo previamente transformada em amônia. O fornecimento de dietas ricas em proteína bruta às vacas leva a uma diminuição da reciclagem da uréia, com conseqüente aumento de sua excreção pelo rim veiculada pela urina. No entanto, quando as dietas fornecidas são pobres em proteína bruta, a uréia é mais intensamente reciclada, diminuindo sua excreção pelo rim. Como os ruminantes, por meio do intenso metabolismo microbiano ruminal, são hábeis em converter NNP em proteína, estes compostos podem ser empregados na dieta, sobretudo aquelas pobres em proteína bruta, e o mais comumente empregado é a uréia. No entanto, seu emprego deve ser realizado de forma controlada, uma vez que o uso em larga escala

conduz à formação excessiva e tóxica de amônia. Para minimizar este efeito, incrementa-se o nível energético das rações, para ocorrer, ainda no rúmen, uma conversão efetiva da amônia em proteína microbiana.

Em relação ao nitrogênio excretado pela glândula mamária, o leite de vaca normal contém de 3,0 a 3,5% m/v de proteína e 80% destas proteínas estão presentes em micelas de caseína, que são estruturas complexas contendo 92% de proteínas e 8% de sais inorgânicos (Swaigood, 1992). Em um estudo realizado por Sommerfeldt & Baer (1986) em 1705 rebanhos leiteiros de três estados americanos, demonstrou-se que o teor em proteína de leites em classificação americana de Grau A apresentou uma média de 3,28% e coeficiente de variação de 5,8%.

A fração nitrogenada do leite possui nitrogênio protéico proveniente da caseína, das proteínas do soro e NNP (Cerbulis & Farrell, 1975), participando respectiva e aproximadamente em 77,9%, 17,2% e 4,9% do nitrogênio total (NT) do leite de vaca (Paquin & Lacroix, 1993). Swaigood (1992) aponta para uma composição do leite em relação às proteínas e situa a caseína em um intervalo de 2,4 a 2,8% m/v no leite, distribuídos em quatro formas:  $\alpha_{s1}$ -caseína (1,2 a 1,5% m/v),  $\alpha_{s2}$ -caseína (0,3 a 0,4% m/v),  $\beta$ -caseína (0,9 a 1,1% m/v) e  $\kappa$ -caseína (0,3 a 0,4% m/v). As proteínas do soro respondem por 0,5 a 0,7% m/v do leite e encontram-se nas formas de  $\alpha$ -lactalbumina (0,1 a 0,15% m/v),  $\beta$ -lactoglobulina (0,2 a 0,4% m/v), albumina sérica (0,01 a 0,04% m/v), imunoglobulinas (0,06 a 0,1% m/v) e proteose-peptonas (0,06 a 0,18% m/v). Adicionalmente às anteriormente citadas, têm-se as enzimas. A proteína do leite é comumente expressa como proteína total ou proteína bruta (PB) e sob o ponto de vista analítico, corresponde ao teor percentual de NT multiplicado pelo fator de conversão 6,38 (Paquin & Lacroix, 1993) conseqüente do teor médio de 15,67% de nitrogênio nas proteínas do leite. A Tabela 4 demonstra a distribuição percentual absoluta do nitrogênio no leite da província canadense do Québec em 1994, de acordo com a fração nitrogenada.

Tabela 4. Distribuição percentual absoluta de frações nitrogenadas no leite (% m/m ou g/100 g de leite) da província canadense do Québec.

Classe de nitrogênio	Participação absoluta em peso de leite (%)	Desvio-padrão (DP)
Nitrogênio total	0,495%	0,011%
Nitrogênio não protéico	0,025%	0,002%
Nitrogênio protéico	0,470%	
Nitrogênio não caseínico	0,104%	0,004%
Nitrogênio caseínico	0,391%	
Nitrogênio das proteínas do soro	0,079%	

Fonte: Paquin & Lacroix (1993) modificado para valores em % m/m de nitrogênio no leite, considerando-se o fator de 6,38 de conversão de nitrogênio em proteína e participação de 78,96% m/m de caseína (em número de caseína) na proteína total e 83,16% m/m de caseína (em número de caseína) na proteína verdadeira (PV), fornecidos pela mesma fonte.

Em estudos de Cerbulis & Farrell (1975) em 151 vacas de 6 raças européias (Holstein, Jersey, Guernsey, Ayrshire, Pardo Suíço e Shorthorn leiteiro) do sudoeste do estado americano da Pensilvânia, relataram-se os valores de constituintes nitrogenados do leite dispostos na Tabela 5.

Harding (1992) relembra a iniciativa de Rowland (1938) em distribuir os compostos nitrogenados do leite em três amplas e arbitrárias categorias baseando-se em técnicas

de precipitação ácida: caseína, proteínas do soro e nitrogênio não “caseínico” (NNC). As frações nitrogenadas mais comumente quantificadas em estudos de composição do leite são o NT, o NNP e o NNC, sendo que o nitrogênio protéico é calculado pelo teor em NT menos o teor em NNP e o nitrogênio caseínico é calculado pelo teor em NT menos o teor em NNC. Multiplicando-se pelo fator de 6,38, converte-se o NT em PB e o nitrogênio protéico em proteína verdadeira (PV) (Barbano & Lynch, 1992).

Tabela 5. Distribuição percentual absoluta de frações nitrogenadas no leite (% m/m ou g/100 g de leite) da província canadense do Québec.

Classe de nitrogênio	Participação percentual absoluta média (em peso)	Amplitude das médias das seis raças
Nitrogênio total	0,5829%	0,3034 – 0,8013%
Nitrogênio não protéico	0,0281%	0,0164 – 0,0465%
Nitrogênio protéico	0,5548%	0,2861 – 0,7759%
Nitrogênio caseínico	0,4551%	0,2400 – 0,6500%
Nitrogênio do soro	0,1279%	0,0633 – 0,2030%
Nitrogênio das proteínas do soro	0,0997%	0,0460 – 0,1577%

Fonte: Cerbulis & Farrell (1975).

Tradicionalmente, o teor em proteína do leite é determinado analiticamente pelo método de Kjeldahl, por meio do teor percentual em nitrogênio da amostra multiplicado pelo fator 6,38, chamado de teor em PB (DePeters et al.

1993; IDF, 2001). Para se converter o percentual de nitrogênio em proteína, assume-se incorretamente que todas as proteínas do leite contém 15,67% de nitrogênio. Entretanto, o número de gramas de nitrogênio por número de

gramas de proteína não é constante entre as frações protéicas do leite (caseína, proteínas do soro), bem como a proporção de cada uma delas não é constante no leite, de modo que um único fator de correção nunca será correto para converter a porcentagem de nitrogênio obtida pelo método Kjeldahl em proteína (DePeters et al., 1993). A proteína verdadeira (PV) é uma outra forma de expressar a proteína do leite, e corresponde a todos os compostos nitrogenados do leite exceto a fração não protéica (DePeters & Cant, 1992). No leite de bovinos, a PV corresponde a 95,1% do NT e a caseína corresponde a 82% da PV e a 77% do NT (Burchard & Block, 1998). Ela pode ser determinada diretamente por precipitação das proteínas do leite pelo ácido tricloroacético ou determinando-se o teor em NT e excluindo-se deste o teor em NNP, empregando-se o fator de 6,38 para conversão do teor em nitrogênio em teor em proteína em ambos os casos (DePeters et al., 1993). Silva (1997) refere-se ao uso do fator de conversão de 6,35. Tem sido usado o ácido tricloroacético a uma concentração de 12% m/v para separar o NNP das proteínas do leite, estas sendo precipitadas junto com as proteose-peptonas (Fox & McSweeney, 1998).

O NNP representa 5 a 6% do NT do leite (DePeters et al., 1993). Os compostos nitrogenados presentes no NNP são basicamente produtos finais do metabolismo do nitrogênio que alcançam o leite a partir do sangue (Harding, 1992) e são definidos na Tabela 6. Experimentos conduzidos por Juarez et al. (1979) em amostras representativas de diferentes rebanhos e regiões da Espanha demonstraram que o NNP respondia por 0,039% do leite integral, com um desvio-padrão de 0,0057%, com um mínimo de 0,026% e um máximo de 0,054%. Além disso, concluiu-se que o NNP variava de região para região. Neste mesmo experimento, a PV do leite apresentou média de 3,13%, com desvio-padrão de 0,14% e intervalo de variação de 2,77% a 3,65%. Renner (1982) cita o teor em NNP do leite em 24 a 35 mg/100 mL de leite, com valores extremos de 16 e 50 mg/100 mL, e Robertson & Elfriede (1990) fazem referência à variação de 16 a 54 mg/100 mL em leites amostrados de vacas individuais e 24 a 39 mg/100 mL em leites amostrados de tanques de refrigeração, sendo que a variação do NNP/NT variou de 4,82% a 5,57% em tanques de refrigeração e de 3,6 a 6,5% entre vacas individuais.

Tabela 6. Participação percentual dos principais compostos do NNP do leite.

Composto nitrogenado	Porcentagem relativa em relação ao NNP do leite segundo Harding (1992) (%)	Concentração no leite (%) segundo Wolfschoon-Pombo & Klostermeyer (1981) adaptado por DePeters et al. (1993)
Uréia	48	14,21
Creatina	8,6	2,55
Creatinina	4,1	1,21
Ácido úrico	2,7	0,78
Ácido orótico	5,2	1,46
Ácido hipúrico	1,4	0,44
Peptídeos	11,0	3,20
Amônia	3,1	0,88
Aminoácidos	15,1	4,43
Desconhecidos		0,48

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

Por cem anos, o gado leiteiro tem sido selecionado por produtividade e teor em gordura do leite (Cerbulis & Farrell, 1975) e a gordura

desde os anos 50 tem sido empregada como parâmetro de valorização do leite. Mais recentemente, a proteína vem sendo

amplamente utilizada naquele propósito em conjunto com a gordura, inclusive atribuindo-se a ela, em muitos países, um valor maior que o da gordura (Ibarra, 2004). Programas de pagamento por qualidade (PPQ) a produtores no mundo são comumente baseados em PB, entretanto, o pagamento baseado em PV (caseína, proteínas do soro e proteose-peptonas), uma iniciativa da França (Harding, 1992) e de algumas regiões dos Estados Unidos (Barbano & Lynch, 1992). Nestes países não se paga portanto a fração correspondente ao NNP, que tem conquistado atenção em função do impacto que ela apresenta nos sistemas de PPQ, por possuir pouco valor (Harding, 1992) e por interferir nos procedimentos de análise da proteína (Bruhn, J. C. & Franke, A. A., 1979; Barbano & Lynch, 1992; DePeters et al., 1993). Relativamente à concentração de NT, o NNP é um dos componentes mais variáveis (Barbano & Lynch, 1992), influenciado por alimentação, região, estação do ano, rebanho e individualidade do animal, sendo a alimentação o que mais contribui na sua variação (Barbano & Lynch, 1992; Lundén et al., 1994). Barbano & Lynch (1992) referem-se à variabilidade do NNP também quando este é expresso em percentagem do NT, e estudos por eles realizados nos Estados Unidos abrangendo uma ampla região e conduzido durante seis meses, descreveram valores para a participação percentual do NNP no NT de 5,88% em média, com uma amplitude entre propriedades rurais de 3,73% a 7,95%.

A avaliação da concentração de uréia, NNP e PB em leite de vacas individualmente amostradas pode ser útil para avaliar programas de alimentação em fazendas, porque o nitrogênio uréico e o NNP do leite correlacionam-se muito com o nitrogênio uréico do sangue, perdendo-se sensibilidade para aquele propósito quando coletadas em tanques de refrigeração de propriedades leiteiras (DePeters et al., 1993; Meyer, 2003). Entretanto, Refsdal et al. (1985) referem-se à utilização da quantificação da uréia em leites de tanques de refrigeração como um indicador do suprimento protéico ao rebanho, o que é corroborado por Baker et al. (1995) e Hansen (1998), com especial atenção à elevada correlação entre nitrogênio uréico do leite, NNP do leite e nitrogênio uréico do sangue.

Muitos fatores afetam a distribuição do nitrogênio entre as várias frações nitrogenadas do leite, tais como clima, nutrição e estado de saúde, estágio de lactação, parição, raça e proteólise bacteriana (DePeters & Cant, 1992). Uma avaliação da variabilidade dos teores nas diversas frações nitrogenadas do leite foi realizada por Bruhn & Franke (1979) na mesma época do ano em rebanhos de duas regiões da Califórnia diferentes entre si em clima, alimento disponível e pureza de sangue dos rebanhos (Vale de São Joaquim e Norte da Baía de São Francisco). Foram encontradas diferenças regionais significativas em proteína, NNP e NT entre as regiões, mas não quando o NNP foi expresso em percentagem do NT. O teor médio em NNP encontrado na região do norte da Baía de São Francisco foi de 29 mg/100 g e no Vale de São Joaquim foi de 33 mg/100g. Entretanto, ambas regiões apresentaram a relação NNP/NT de 5,5%. Paquin & Lacroix (1993) demonstraram que a estação do ano e o regionalismo proporcionam variação das proteínas do leite, sendo que as frações NT, NNC e NNP não necessariamente apresentam a mesma variação.

Verdi et al. (1987) observaram, tanto em um grupo de propriedades com altas CCS quanto em outro com baixas CCS, a influência de sazonalidade na PV do leite em propriedades do estado de Nova Iorque, sendo o teor desta, nos dois grupos, menor nos meses de julho e agosto (verão no hemisfério norte) e maior nos meses de outubro e novembro (outono). Em experimentos parelos, foi observado o aumento do percentual de NNP relativo ao NT (NNP/NT) do leite nos meses de verão e diminuição nos meses de inverno nos dois grupos (com contagens alta e baixa de células somáticas). A caseína não apresentou diferença significativa ao longo do ano, ainda que fosse mensalmente maior no grupo com baixa CCS (por causa da grande variabilidade entre propriedades), apresentando em ambos os grupos um máximo nos meses de outubro e novembro e um mínimo nos meses de julho e agosto. Quando a caseína foi expressa em percentagem do NT, foram observados valores máximos nos meses de inverno e mínimos nos meses de verão, havendo diferença significativa deste analito entre os dois grupos de CCS em 7 dos 12 meses estudados, apresentando maiores percentuais de caseína no NT o grupo com

baixas CCS. Sjizarto et al. (1973) já haviam observado ao longo de um ano, em leites de propriedades rurais da província de Ontário (Canadá), menor participação percentual da caseína na proteína total nos meses de julho a outubro, além de perceberem o aumento conjunto da participação percentual das proteínas do soro e do NNP na PB com o decréscimo da participação percentual da caseína na PB. Em um estudo de Sommerfeldt & Baer (1986) em 1705 rebanhos de três estados americanos ao longo de um ano, demonstrou-se que nos meses de junho, julho e agosto (verão no Hemisfério Norte) o teor em proteína do leite reduzia-se, da mesma forma que o teor em gordura e em ST. Cerbulis & Farrell (1975) já haviam demonstrado haver diferenças dos teores nas diversas frações nitrogenadas do leite entre raças européias de gado leiteiro, sendo que o NNP apresentou menor variação entre raças que entre animais de uma mesma raça. Em geral, em temperaturas ambientes mais elevadas, o teor em PB do leite é reduzido.

A mastite resulta em redução do teor em caseína e aumento do teor em proteína do soro, o que pode ser devido à hidrólise da caseína, cujos produtos reacionais tenderiam a ser quantificados junto às proteínas do soro (DePeters & Cant, 1992). Este processo inflamatório da glândula mamária está associado com o aumento da concentração de diferentes enzimas no leite e neste caso, a principal enzima que apresenta ação caseinolítica é a plasmina. Esta enzima origina-se a partir do plasminogênio oriundo do sangue devido à agressão e ruptura do epitélio glandular. Ocorre portanto uma rápida proteólise da  $\beta$ -caseína com formação de  $\gamma$ -caseína e proteose-peptonas, sendo que estas últimas são transferidas para o soro (Auldism & Hubble, 1998). A albumina do soro, imunoglobulinas, transferrina, e outras proteínas do soro têm o seu teor aumentado no leite em razão da mudança da permeabilidade vascular que ocorre no processo inflamatório da glândula mamária (Jones & Bailey, 1998).

Experimentos conduzidos em propriedades rurais do estado de Nova Iorque em 1987 mostraram não haver diferença significativa da PV do leite entre propriedades com altas e baixas CCS, mas foi observado que o leite de

propriedades com altas CCS apresentou menor teor em caseína quando esta foi expressa em percentagem da PV. Isto foi atribuído à atividade proteolítica detectada mais intensamente em leites de propriedades com altas contagens que em leites de propriedades com baixas CCS (Verdi et al., 1987). Bueno et al. (2004) observaram no Brasil, o decréscimo do teor em proteína em leites com maiores CCS, com uma variação de 5,07% entre leites com menos de 200.000 células/mL e leites com mais de 1.000.000 células/mL, sendo o segundo componente do leite que mais apresentou decréscimo em seu teor. Neste mesmo estudo, observou-se o acréscimo significativo de 1,23% no teor em proteína entre uma classe de leites com contagem padrão igual ou inferior a 10.000 UFC/mL e uma classe com contagem padrão superior a 1.000.000 UFC/mL, provavelmente em função da concentração relativa em virtude da degradação da lactose e gordura.

Em relação à lactação, observa-se que o teor em NT, nitrogênio caseínico e NNP decrescem rapidamente após o parto até um mínimo em torno de 5 a 10 semanas de lactação, seguindo-se um aumento gradual até o fim da lactação (DePeters & Cant, 1992; Fox & McSweeney, 1998). O teor em caseína no leite declina com o número de parições, sendo que o decréscimo em PB não é tão grande em razão do aumento do NNP (DePeters & Cant, 1992). Com três anos de idade, a vaca está em seu auge em termos de produção de leite mais rico em proteína, declinando gradualmente com a idade, sendo que o teor em caseína diminui e o teor em proteínas do soro aumenta (Ng-Kwai-Hang et al., 1984).

A influência da dieta no aporte de proteína no leite existe mas é menor que os fatores ambientais e genéticos, e muito mais restritos quando comparados com alterações no teor em gordura do leite. As alterações podem ocorrer reportando-se à quantidade de proteína produzida por vaca em lactação ou ao teor em proteína do leite. Estudos iniciais sobre a adição de gordura à alimentação de vacas em lactação mostraram ação daquelas dietas na redução dos teores em NT, nitrogênio caseínico e nitrogênio das proteínas do soro (DePeters et al., 1985). Posteriormente, como consequência de estudos mais aprofundados, outras formas de adicionar gordura à dieta das vacas foram estudadas. As

formas de induzir alterações nas proteínas do leite podem ser divididas em dieta protéica, alteração da ingestão de energia, proporção entre forragem e concentrado na alimentação e acréscimo de gordura e óleos à alimentação, e são amplamente explanados por DePeters & Cant (1992), cada um deles apresentando efeitos positivos e negativos. O aumento dos níveis de proteína na dieta acima dos requerimentos animais aumenta o teor em proteína no leite, primariamente pela elevação do teor em NNP do leite. Entretanto, o fornecimento de níveis sub-ótimos de proteínas na alimentação diminui a produção de leite mais que o teor em proteína no leite (Burchard & Block, 1998). Mudanças na composição da gordura do leite, especialmente aquelas resultantes da suplementação de gordura, é acompanhada por outras alterações, que incluem a diminuição da concentração protéica, aumento da concentração de uréia, aumento da concentração de citrato e cálcio solúvel, mudanças estas que alteram o rendimento do leite na fabricação de queijos e a estabilidade térmica do leite (Palmquist et al., 1993).

A engenharia genética pode ser usada para aproveitar a enorme capacidade da glândula mamária na síntese protéica e os resultados possíveis do uso da tecnologia transgênica incluem o aumento do teor protéico do leite, adição de novas proteínas ao leite e modificação de proteínas endógenas do leite para aumentar atributos de seu processamento (Karatzas & Turner, 1997), o que deve ser realizado com a segurança necessária à saúde humana e animal que o procedimento exige.

#### 2.1.2.4 Proteína verdadeira e proteína bruta

Nos Estados Unidos e Europa, a proteína é atualmente o principal componente do leite considerando-se o valor econômico a ela atribuído (Barbano & Lynch, 1992; Grappin, 1992). Em sistemas de PPQ, há discussões amplas entre especialistas de diversos países quanto à valorização da PB (percentagem de NT *versus* 6,38) ou da PV.

A acurácia das medições do teor em proteína do leite adquire mais importância na proporção em que a proteína tem sido mais valorizada em sistemas de pagamento do leite (Barbano &

Lynch, 1992). A Tabela 12 (IDF, 2002), corrobora a tendência mundial de se considerar a PB para propósitos de pagamento por componentes (Harding, 1992), sendo a França a pioneira na iniciativa de se valorizar a proteína do leite em termos de PV (Grappin, 1992). Quando se paga por PB, inclui-se no valor a ela atribuído o NNP; também, não se leva em consideração que proteína é um grupo complexo que inclui quimicamente um grande número de compostos diferentes entre si (diferentes proteínas e além delas, as proteose-peptonas) e o emprego de um único fator de conversão do NT, de 6,38, não é igual para cada um deles (Grappin & Lefier, 1994; Lundén et al., 1994), pois o teor em nitrogênio não é fixo em 15,67% e varia em cada um daqueles compostos.

No fim dos anos 70, Bruhn & Franke (1979) já recomendavam a calibração dos espectrômetros de infravermelho em base de PV, excluindo-se portanto o NNP, sob os argumentos de eliminar a fonte de erro proporcionada pela variação do NNP, eliminar o pagamento a mais que o NNP proporcionava aos produtores e não superestimar o teor em proteína nas informações nutricionais de rótulos de produtos lácteos. Robertson & Elfriede (1990) fazem uma ampla revisão dos fatores relacionados com a variabilidade do NNP no leite, citando o estágio da lactação, número de lactações, raça, mastite, região e alimentação das vacas, e considerando este último como o responsável por 99% daquela variação. Na França, a definição de usar a PV como base de PPQ do leite no lugar da PB baseou-se em três critérios: em primeiro, a grande variabilidade do teor em NNP no leite, decorrente de estação, região, individualidade do animal, individualidade dos rebanhos e das espécies; em segundo, o baixo valor real do NNP sendo considerado como de alto valor quando mensurado junto com a PV ao compor a PB; e em terceiro, o incremento na acurácia da medição da proteína pelo método espectrométrico quando em bases de PV. Vários estudos demonstraram o incremento na acurácia das determinações de proteína por EIVM empregando-se a calibração em PV, com correlação elevada ( $r = -0,80$ ) entre as diferenças entre os resultados do método de referência e do método espectrométrico e a percentagem de NNP, conforme demonstrado pela Figura 7 (Grappin, 1992). Barbano & Lynch (1992) fazem referência ao erro

sistemático de o NNP ser quantificado junto ao NT no método químico de Kjeldahl e não apresentar absorção significativa no comprimento de onda da radiação de quantificação da proteína por EIVM. Por sua vez, Grappin (1992) descreve a interferência da uréia, grande parte do NNP, nas determinações por EIVM, apresentando absorção de radiação no comprimento de onda da radiação que é absorvida pela proteína, e evidenciado por meio da Figura 4. Grandes variações no teor em NNP em diferentes meses do ano e vários estágios de lactação foram responsáveis pelas alterações ocorridas no teor em PB de um experimento conduzido por Ng-Kwai-Hang et al. (1985) em 28.390 amostras de leite coletadas individualmente de 3.600 vacas Holstein em 62 rebanhos da província do Québec (Canadá), enquanto que as mudanças ocorridas no teor em

PB em diferentes idades de vacas, diferentes teores em gordura e de CCS foram atribuídas às mudanças no teor em PV. Neste mesmo experimento, concluiu-se que espectrômetros de infravermelho médio (EIM) podem ser satisfatoriamente empregados para quantificar a PB em leites se as variações testadas fossem devidas à idade das vacas, gordura e células somáticas porque as alterações estariam atingindo a fração PV, mas a acurácia das medições é significativamente afetada em função da estação do ano e do estágio de lactação, porque as alterações recaem sobre o NNP do leite. A Figura 3 demonstra a variação do NNP expresso respectivamente em concentração percentual absoluta no leite e percentual relativo do NT em função dos dias de lactação (Renner, 1982).

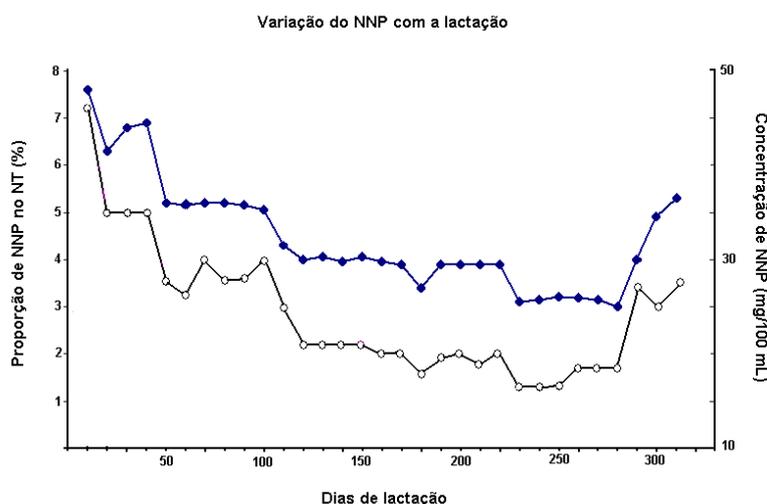


Figura 3. Variação do NNP do leite em função dos dias de lactação, expresso na forma de teor em mg/100 mL (-○-) e na forma de percentual do NT (-●-). Fonte: Renner (1982).

De acordo com Kuzyk et al. (1994), na Austrália introduziu-se a calibração em bases de PV em 1989 no estado de Vitória e em 1992 no estado de Nova Gales do Sul. O método padrão baseou-se em duas determinações pelo método de Kjeldahl, uma diretamente no leite para quantificação do NT e outra no filtrado de precipitação com ácido tricloroacético a 12% m/v para determinação do teor em NNP, sendo a PV calculada pela diferença entre o NT e o NNP multiplicada pelo fator 6,38. Grappin (1992) faz referência à grande variabilidade da concentração da uréia (esta respondendo à

variabilidade das práticas de alimentação) como responsável pela grande variabilidade no teor em NNP. A Figura 5, por meio de uma análise de regressão, demonstra esta correlação. A Figura 6(a) mostra a variação do teor em NNP no leite ao longo de 12 meses do ano na França e a Figura 6(b) mostra como a época do ano (meses) interfere na diferença entre resultados de proteína obtidos pelo método do Negro de Amido (determinação de proteína) e pelo método de Kjeldahl (determinação de nitrogênio) quando o método do Negro de Amido é calibrado em PB e PV.

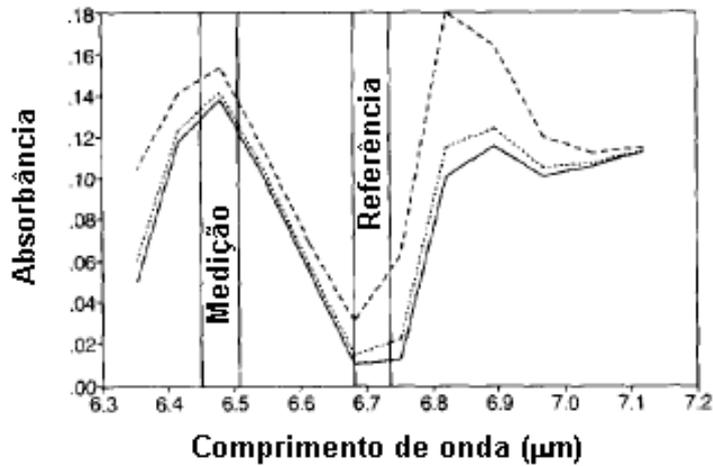


Figura 4. Interferência de duas concentrações de uréia na determinação da proteína por EIVM, tanto no comprimento de onda de absorção quanto no comprimento de onda de referência, no qual a absorção da proteína é mínima, sendo a linha cheia representativa da amostra sem uréia, a linha pontilhada representativa da amostra com menor concentração de uréia e a linha tracejada representativa da amostra com maior concentração de uréia. Fonte: Grappin (1992).

Barbano & Linch (1992) destacaram como fonte de erro sistemático em medições de PB por EIVM, a variação do teor em NNP entre conjuntos de amostras de calibração e dentre as amostras de um único conjunto de amostras de calibração, indicando o emprego de calibração em base de PV como uma forma de eliminar o erro sistemático proporcionado pela variabilidade existente no NNP do leite.

Também levantaram a hipótese de a variação da percentagem média do NNP presente no NT entre conjuntos de amostra de calibração contribuir com um erro sistemático de acurácia de 0,03 a 0,06% absoluto na determinação da PB, alcançando um erro sistemático da acurácia tão grande quanto 0,1% absoluto em razão da variabilidade daquele parâmetro entre amostras de um mesmo conjunto de amostras.

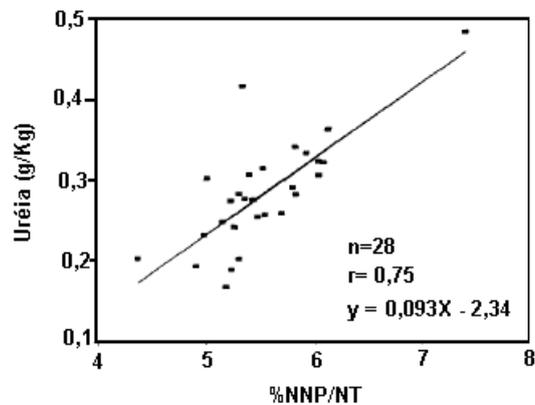


Figura 5: Correlação encontrada entre teor em uréia no leite e participação percentual do NNP no NT, segundo Grappin (1992).

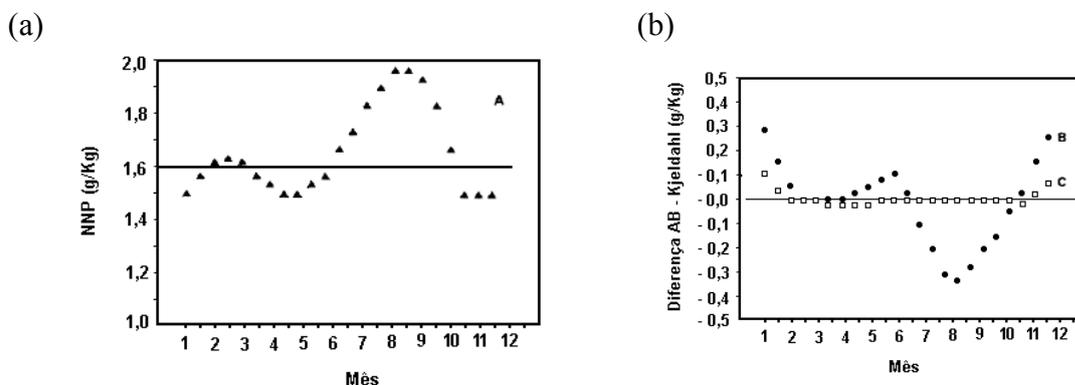


Figura 6: (a) Variação sazonal do teor médio em NNP do leite; (b) Diferenças ao longo dos meses do ano entre o método do Negro de Amido e o método Kjeldahl quando o método do Negro de Amido é calibrado em PB (B) e PV (C). Deve-se notar que a relação entre os gráficos é de resposta inversa. Fonte: Grappin (1992).

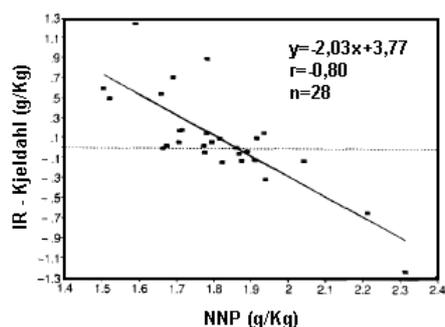


Figura 7: Diagrama de dispersão das diferenças entre o método espectroscópico no infravermelho médio e o método de Kjeldahl na quantificação do NT *versus* teor em NNP do leite de 28 amostras de leite de tanque de refrigeração. Fonte: Grappin (1992).

Em experimentos conduzidos por Grappin & Lefier (1994) com o objetivo de se avaliar o desempenho dos analisadores de proteína por EIVM em bases de calibração em PB *versus* PV, empregaram-se resultados obtidos de amostras dispostas em oito grupos analisados ao longo de um ano, cada um deles contendo duas amostras de cada um dos 15 países participantes, perfazendo então 240 amostras. Realizando-se uma calibração do espectrômetro para a análise de cada um dos oito grupos de amostras em base de PB e estabelecendo-se uma análise de regressão entre o *bias* médio observado em cada um dos oito grupos e a diferença entre o NNP das amostras de calibração e o NNP das amostras analisadas, concluiu-se que 78% do *bias* médio observado em

cada grupo eram explicados por aquela diferença de NNP existente entre calibração e análise. Para melhor entendimento, o *bias* médio refere-se à diferença média entre resultados em PB por espectrometria e por método de referência (Kjeldahl) dos oito grupos de amostras. Calibrando-se o espectrômetro em base de PV, diminuiu-se em duas vezes a influência da estação do ano (oito grupos de amostras), com o intervalo de *bias* de calibração reduzindo-se de 0,111 para 0,056 g/100g. Estabelecendo-se uma nova análise de regressão entre o *bias* médio observado em termos de PB em cada um deles e o teor médio em NNP de cada um dos 15 países, observou-se que 58% das diferenças sistemáticas entre países eram explicados pela variação do NNP. Ainda

segundo Grappin & Lefier (1994), excetuando-se problemas de saúde do animal, a quantidade e a concentração de proteína no leite estão essencialmente relacionados em longo prazo com práticas de alimentação animal e seleção genética, o que tem proporcionado o aumento daqueles parâmetros ao longo dos últimos 20 anos anteriores a 1994, sendo importante para a indústria que se valorize diferentemente cada fração protéica do leite.

Sob o ponto de vista de análise laboratorial, Grappin & Lefier (1994) ressaltam a possibilidade adicional da execução de análise por EIVM em calibração baseada em caseína (desvio-padrão da acurácia de 0,054 g/100 g) ou PV (desvio-padrão da acurácia de 0,052 g/100 g) e afirmam que, em razão da influência significativa da estação do ano e região no teor em NNP, torna-se necessário um controle regular e ajuste da calibração dos espectrômetros com amostras de leite representativas do local quando a PB é usada como parâmetro de referência. Por outro lado, quando o parâmetro de referência é a PV, materiais de referência podem ser empregados na calibração independentemente de época do ano e dos instrumentos de análise (região). Isto é a conclusão de experimentos realizados empregando-se três sistemas de calibração: emprego de amostras de calibração em PB preparadas no próprio laboratório da Estação de Pesquisas em Tecnologia e Análises de Leite (Station de Recherches em Technologie et Analyses Laitières - INRA) de Poligny, França; emprego de materiais de referência para calibração em PB; e emprego de materiais de referência para calibração em PV. Dezesesseis amostras de cada um de um total de nove laboratórios diferentes coletadas ao longo de um ano foram analisadas empregando-se os três sistemas de calibração e observou-se um desvio-padrão da acurácia de 0,027g/100 g quando a calibração era feita com material de referência em PV, contra um desvio padrão da acurácia de 0,048g/100 g com uma calibração com material de referência em PB; e 0,055 g/100 g com uma calibração em PB com material preparado no próprio local.

## 2.2 INDICADORES DE QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DO LEITE

### 2.2.1 Contagem de microrganismos do leite

Os microrganismos presentes em leite cru de tanques de refrigeração de propriedades rurais podem se originar do próprio úbere (parte interna e externa), de utensílios diversos empregados na ordenha, inclusive equipamentos de ordenha (Gehringer, 1991), do ordenhador na ordenha manual e do próprio tanque de refrigeração. O tempo entre a ordenha e a coleta para transporte à unidade processadora e a temperatura na qual o leite é estocado são fatores determinantes para a contaminação bacteriana se manter estável (condição ideal) ou aumentar progressivamente, como consequência da multiplicação daqueles microrganismos. A população inicial, temperatura e o potencial de oxi-redução do leite presente no tanque de refrigeração são fatores que interferem nas características qualitativas daquela população bacteriana, com predominância de um ou outro tipo ou grupo de microrganismos. A coleta de amostra no tanque de refrigeração da propriedade rural para fins de determinação da contagem bacteriana tem portanto o objetivo de refletir as condições higiênicas e sanitárias do rebanho, dos procedimentos e das instalações da propriedade rural. A qualidade microbiológica do leite recebido por uma indústria depende de fatores que se somam sequencialmente, a partir da qualidade pré-existente no leite do tanque de resfriamento da propriedade rural, passando pelas condições de higienização e sanificação dos tanques isotérmicos e tubulações do caminhão-tanque que transporta o leite à indústria, da capacidade de impedir o ganho de calor externo e o tempo de percurso da linha de captação de leite. A Instrução Normativa nº 51/2002 (Brasil, 2002a), com o objetivo de normatizar a qualidade do leite cru refrigerado no Brasil, estabelece em seu anexo "Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado" os limites máximos de microrganismos mesofílicos, adotando como método de referência a norma International IDF Standard 100B:1991 (IDF, 1991a), conforme a Tabela 7. O princípio deste método de ensaio consiste na diluição da amostra de leite cru refrigerado em condições de ensaio microbiológico e consequente obtenção de diluições decimais sucessivas, inoculação da amostra e suas diluições em meio de cultura ágar padrão para contagem em placa, incubação

a 30°C por 72 horas e contagem das colônias visíveis (IDF, 1991a).

A avaliação da qualidade bacteriológica do leite cru refrigerado visa subsidiar a melhoria das condições higiênicas e sanitárias de produção e

estocagem do leite na propriedade rural, e a obtenção de um produto final de qualidade com baixa contagem de microrganismos termodúricos (Gehring, 1991) capazes de sobreviver à pasteurização e à ultra-pasteurização.

Tabela 7. Prazo de adequação à Instrução Normativa nº 51/2002 conforme a região, para contagem padrão em placa do leite cru refrigerado de propriedades rurais (Brasil, 2002a).

	Limites Regionais <sup>(1)</sup>	Limites Regionais <sup>(2)</sup>	Limites Regionais <sup>(3)</sup>	Limites Regionais <sup>(4)</sup>
Contagem padrão em placa	Máximo 1 x 10 <sup>6</sup>	Máximo 1 x 10 <sup>6</sup>	Máximo 7,5 x 10 <sup>5</sup>	Máximo 1,0 x 10 <sup>5</sup> <sup>(5)</sup> 3,0 x 10 <sup>5</sup> <sup>(6)</sup>

Limites regionais: (1) até 01/07/2005 nas regiões S/SE/CO e até 01/07/2007 nas regiões N/NE do Brasil para estabelecimentos que se antecipem à instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002; (2) de 01/07/2005 a 01/07/2008 nas regiões S/SE/CO e de 01/07/2007 até 01/07/2010 nas regiões N/NE do Brasil; (3) de 01/07/2008 a 01/07/2011 nas regiões S/SE/CO e de 01/07/2010 até 01/07/2012 nas regiões N/NE do Brasil; (4) a partir de 01/07/2011 nas regiões S/SE/CO e a partir de 01/07/2012 nas regiões N/NE do Brasil; (5) ) Limite para leite individual (propriedade rural); (6) Limite para leite de conjunto.

A Instrução Normativa nº 51/2002 (Brasil, 2002a), em seu anexo IV, referindo-se aos métodos de ensaio aplicáveis ao leite cru refrigerado descreve *in verbis*: “todos os métodos estabelecidos acima são métodos de referência, podendo ser utilizados outros métodos de controle operacional, desde que conhecidos os seus desvios e correlações em relação aos respectivos métodos de referência” (Brasil, 2002a), o que corresponde à possibilidade de utilização de outros métodos de ensaio desde que validadas frente ao método considerado de referência.

Entre os principais métodos de contagem de bactérias em leite cru, têm-se os métodos que se baseiam na estimativa das unidades formadoras de colônias: contagem padrão em placas (Brazis, 1991), plaqueamento com alça - *Plate Loop method* (Hill, 1991a) - e o método de tubo rolado - *Roll Tube method* (Slaghuis, 1991), outros que se baseiam na contagem eletrônica de micro-colônias (Suhren & Heeschen, 1991a) e aqueles que se fundamentam em métodos microscópicos de contagem, tendo como representantes a contagem microscópica direta (Hill, 1991b), a técnica direta de filtro e epifluorescência – DEFT – (Hill, 1991c), a técnica fluoro-opto-eletrônica de contagem automatizada (Suhren et al., 1991) e a técnica de citometria de fluxo (Ninane, 2000; Suhren &

Walte, 2000; Veal et al., 2000). Os métodos que estabelecem estimativas quantitativas de populações bacterianas a partir de suas atividades metabólicas são representados entre muitos, por aqueles que se baseiam na redução de corantes e de nitrato, na determinação de piruvato e seus metabólitos e nos princípios da impedanciometria.

Entre os diversos métodos utilizados na contagem de bactérias no leite cru, o que atualmente tem se mostrado mais adequado a grandes números de amostras, tais como aquelas oriundas de controle de rebanhos leiteiros, de tanques de refrigeração de propriedades rurais ou compartimentos de caminhões-tanque, é aquele que se baseia no princípio de citometria de fluxo. Segundo Rodriguez-Otero & Hermida (1993), “Em razão do grande número de métodos disponíveis para avaliar a qualidade bacteriológica do leite cru, a escolha do método depende do propósito da avaliação. Em se analisando um pequeno número de amostras de leite, o custo do processo e a quantidade de trabalho necessária constituem uma importância secundária; quando se envolve um grande número de amostras, como no caso do pagamento por qualidade realizado a proprietários de fazendas, é importante um elevado grau de automação a um custo reduzido”.

A citometria de fluxo tem sido relatada como uma técnica de contagem de microrganismos, com as vantagens de automação, objetividade e rapidez, permitindo a contagem de milhares de células por segundo, agregando-se a isto algumas desvantagens do método convencional de plaqueamento, com especial atenção à obtenção demorada da resposta, com etapas trabalhosas e não aplicável a microrganismos que não crescem em condições ordinárias de incubação (Veal et al., 2000).

A citometria de fluxo consiste em quantificar as células bacterianas por medições ópticas quando elas se encontram em uma fila única em frente a um feixe de luz focado. De modo a colocar as bactérias uma atrás da outra, em um fluxo de células, elas são introduzidas no interior de uma corrente de fluido de rápido escoamento, chamada de revestimento de fluxo. O fundamento da formação do fluxo é um jato de fluido isotônico de revestimento (em relação às células) de aproximadamente 100 µm de diâmetro, que flui a uma velocidade de 20 quilômetros por hora, dentro do qual as amostras são injetadas a uma velocidade controlada, comumente entre 10 e 60 µL por minuto. A amostra, de movimento mais lento, é hidrodinamicamente levada ao centro da corrente de fluxo rápido, criando um fluxo laminar de células que se movem em fila única dentro do citômetro (Veal et al. 2000).

De forma geral, na citometria de fluxo, quando a radiação originada de uma lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão ou laser é interceptada por uma partícula, três parâmetros são medidos: dispersão para frente, dispersão para o lado e fluorescência, sendo que a quantidade de luz dispersa para frente e para os lados tende a aumentar com o tamanho da célula. Adicionalmente, a refratibilidade celular relaciona-se com as propriedades superficiais e estruturas internas e isto também afeta a dispersão lateral e a dispersão para frente. A fluorescência natural é emitida por componentes celulares tais como nucleotídeos flavínicos, piridina e pigmentos foto-sintéticos. Citômetros de fluxo típicos medem fluorescências em três comprimentos de onda. A luz de comprimentos de onda definidos é canalizada a detectores particulares, como por exemplo, detectores de fluorescência verde, de fluorescência laranja e

fluorescência vermelha. São as características da fluorescência emitida e da luz dispersa que permitem na citometria de fluxo a diferenciação taxonômica de alguns microrganismos. Por exemplo, leveduras podem ser distintas de bactérias baseando-se nas características da luz dispersa devido ao seu grande tamanho e formato. Anticorpos ligados a corantes fluorescentes são úteis quando se faz necessário o emprego da citometria de fluxo com objetivos de identificação microbiana (Suhren & Walte, 2000).

Uma das desvantagens da citometria de fluxo é a baixa capacidade de diferenciação de células mortas de células viáveis. Entretanto, o uso de procedimentos de imunofluorescência associados ao uso de corantes que se ligam ao microrganismo quando estes estão viáveis tem permitido esta diferenciação (Suhren & Walte, 2000).

Os corantes mais comumente usados são os corantes de DNA, tais como o diamidinofenilindol (DAPI), e os corantes de ácido nucléico tais como o alaranjado de acridina, o brometo de etídio e o iodeto de propídio. (Veal et al. 2000).

Em citometria de fluxo aplicada na contagem de bactérias totais em amostras de leite cru, faz-se necessária o tingimento das células bacterianas com corantes que se ligam a constituintes celulares específicos, permitindo a distinção entre células de outras partículas. O processo de tingimento da célula bacteriana é mais complexo que o tingimento de células de mamíferos, em razão da complexidade estrutural da parede celular. Desta forma, bactérias Gram-negativas são menos permeáveis que as bactérias Gram-positivas frente a corantes. Tanto o Tris quanto o EDTA tornam as bactérias Gram-negativas permeáveis a várias moléculas ao reduzir a interação entre as moléculas de lipopolisacárides (Suhren & Walte, 2000).

Os corantes de DNA citados se ligam usualmente por sua intercalação dentro da estrutura helicoidal de cadeia dupla daquelas moléculas, o que resulta em aumento considerável de fluorescência em comparação com o corante puro (Suhren & Walte, 2000).

Os contadores de bactérias em leite cru atualmente disponíveis no Brasil e empregados pela RBQL (Brasil, 2002b) consistem de um instrumento completamente automatizado no qual a bactéria é corada com o brometo de etídio, de propriedade fluorescente, e os componentes interferentes presentes no leite, tais como as células somáticas, são eliminados ou dispersos por tratamento químico (Suhren & Walte, 2000). Como citado anteriormente, o brometo de etídio é um corante que exibe uma fluorescência mais intensa quando ligado ao DNA e RNA que a sua forma não ligada (Suhren & Walte, 2000). Uma vez as bactérias

fluorescentes dispostas em fila única em uma corrente de fluido, são individualmente excitadas por radiação laser e a luz emitida é recebida por um detector de fluorescência, que detecta um pulso de luz a cada passagem de uma bactéria. Os pulsos de luz são convertidos em pulsos eletrônicos, que são registrados quando são maiores que um valor fixado. A distribuição da altura dos pulsos (PHA) é exibida em uma tela do software do equipamento que gerencia os dados via computador, conforme demonstrado pela Figura 8 (Suhren & Walte, 2000).

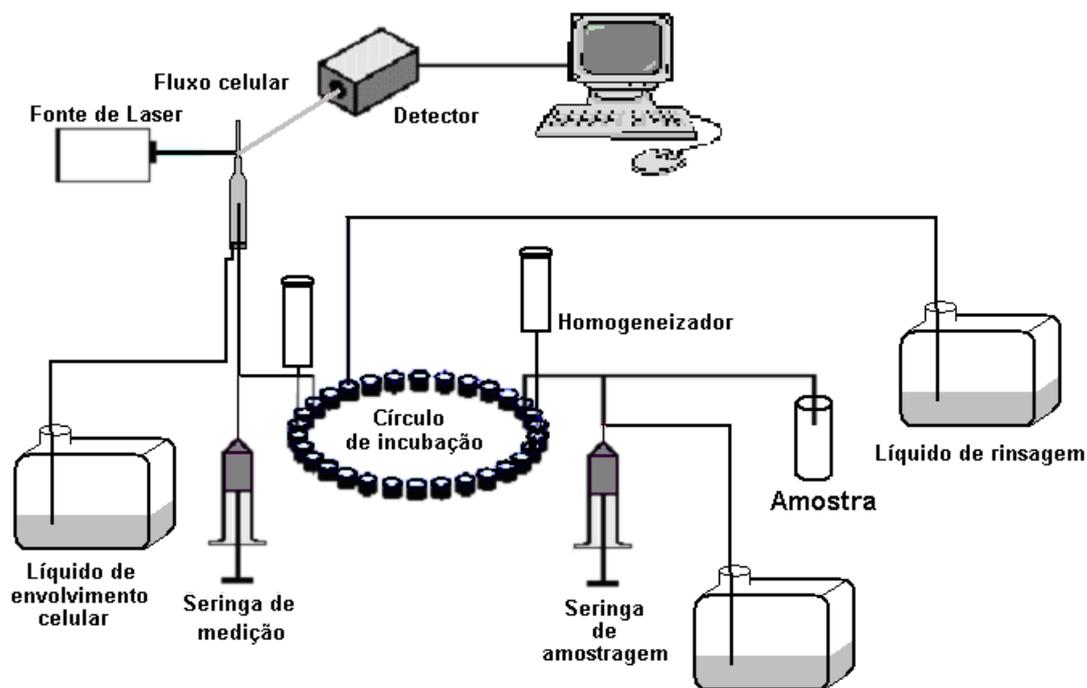


Figura 8. Esquema representativo de citometria de fluxo aplicado na contagem bacteriana em leite cru. Fonte: Suhren & Walte (2000) modificado.

A amostra de leite, ainda fria em razão da refrigeração previamente imposta, é agitada e uma alíquota de leite é transferida por uma pipeta para o interior do instrumento. Parte do leite é empregada para limpar e preencher o sistema. Após a filtração por um filtro de poro de 100  $\mu\text{m}$ , uma alíquota volumetricamente mensurada do filtrado é dispensado em um pequeno bquer da unidade de incubação, onde

recebe o reagente de incubação (tampão, corante e enzima) adicionados. Durante a incubação a 50°C, que dura alguns minutos, a mistura de leite e reagente de incubação são tratados duas vezes por um homogeneizador. Desta mistura homogeneizada, uma outra alíquota passa por um filtro de poro de 100  $\mu\text{m}$ . A primeira parte é descartada e a parte remanescente é transferida a uma seringa de medição pela qual esta mistura é

injetada no fluxo celular onde o líquido de envolvimento (detergente e tampão) carrega a corrente de amostra através do fluxo celular

(Suhren & Walte, 2000), conforme demonstrado pela Figura 9.

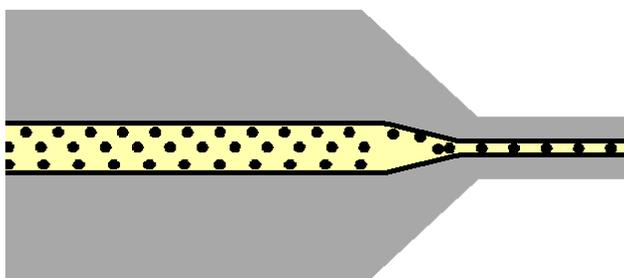


Figura 9. Esquema demonstrativo da formação do fluxo celular na citometria de fluxo.

Todo o sistema é limpo entre a quantificação de bactérias de uma amostra e a quantificação da amostra seguinte (Suhren & Walte, 2000).

Segundo Suhren & Walte (2000) e Bolzoni (2000) a CCS superior a 1.000.000 células/mL interfere aumentando a contagem bacteriana no citômetro de fluxo.

Através de uma regressão linear entre a contagem bacteriana total (CBT), também conhecida como contagem bacteriana individual (CBI), obtidas com a citometria de fluxo e a contagem de macro-colônias pelo método de plaqueamento em ágar padrão de mesmas amostras (em grande número), ambas expressas em logaritmo decimal, obtém-se uma equação de calibração do tipo  $y = a + bx$ , sendo  $x$  o logaritmo decimal das contagens de bactérias individuais obtidas pela citometria de fluxo e  $y$  o logaritmo decimal das contagens bacterianas em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), a qual é empregada na transformação de bactérias presentes na amostra (CBT) em UFC/mL.

### 2.2.2 Contagem de células somáticas do leite

A mastite é a reação inflamatória do tecido do úbere (Verdi et al., 1987) às injúrias bacteriana, química, térmica ou mecânica (McGill University, 2006) e as células somáticas são parte desta reação inflamatória (Godkin, 2000). Decorrente da destruição do tecido produtor de leite (Godkin, 2000) e do aumento da permeabilidade das membranas (Kitchen, 1981;

Verdi et al., 1987) ocorre incremento de células de defesa, enzimas e outros fatores imunológicos (Verdi & Barbano, 1991; Godkin, 2000). As células somáticas de defesa são em sua maioria neutrófilos (Kehrli & Shuster, 1994) e as enzimas encontradas no processo são proteases endógenas (Verdi et al., 1987), sendo a plasmina a protease mais significativa em leites com CCS superiores a 1.000.000 células/mL, e causam a degradação da caseína (Saeman et al., 1988). No leite tem-se a diminuição de sua produção e alteração de sua composição (Kitchen, 1981; Fernandes et al., 2004).

A contagem de células somáticas no leite amostrado individualmente de vacas e no tanque de refrigeração da propriedade rural pode ser utilizado para se obter uma estimativa quantitativa do processo inflamatório (Godkin, 2000) e a despeito de a saúde do úbere ser extensamente avaliada em função da CCS no leite, Sloth et al (2003) sugerem que há um potencial real na melhoria daquela avaliação empregando-se métodos de análise multivariada, com a avaliação de pelo menos oito parâmetros de qualidade do leite, inclusive a CCS.

As alterações decorrentes do processo inflamatório da glândula mamária proporcionadas aos principais componentes do leite já foram abordados anteriormente, em se fazendo referência à composição do leite.

Além do aumento da CCS, ocorre em vacas com mastite, a redução da produção de leite e alteração da qualidade para processamento dos

principais componentes, tais como gordura e proteína (Moxley et al., 1978; Munro et al., 1984; Bartlett et al., 1990; Klei et al., 1998), lactose e minerais (Klei et al., 1998; Fernandes et al., 2004) com conseqüente redução do rendimento de queijos (Auldish & Hubble, 1998; Klei et al., 1998) e alteração de sua composição por meio dos teores em gordura, proteína, umidade e ST em relação ao teor em sólidos não gordurosos (SNG) (Politis & Ng-Kwai-Hang, 1988a), alteração da proporção entre diversas proteínas do leite, com aumento da albumina sérica do leite e imunoglobulinas e redução da lactoglobulina,  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\beta$ -caseína, e  $\alpha$ -lactalbumina (Haenlein et al., 1973), do aumento do tempo de corte da massa coagulada (Politis & Ng-Kwai-Hang, 1988b), rancidez, alterações de aroma e textura (Schäellibaum, 2000), alteração de sabor e redução do prazo de validade em leites pasteurizados para consumo final (Ma et al., 2000), hidrólise da proteína em queijos cottage (Klei et al., 1998), entre muitos outros amplamente abordados por Munro et al. (1984). Conseqüentemente, a mastite não deve ser avaliada somente sob o ponto de vista higiênico-sanitário, mas também sob o ponto de vista econômico. Munro et al. (1984) citam o impacto da mastite no aumento do custo da produção de leite na Austrália, sendo observada redução do teor em PV em CCS superiores a 100.000 células/mL (Barbano et al., 1991).

A legislação norte-americana permite um máximo de 750.000 células/mL em leite representativo de produtor individual (FDA, 2003), já tendo sido recomendada a redução

deste limite segundo orientação do National Mastitis Council (Ott et al., 1999) e outras instituições americanas (Norman et al., 2000) para valores de 600.000 células/mL, 500.000 células/mL e 400.000 células/mL em um período de quatro anos (Ott et al., 1999). Estudos envolvendo 539.537 amostras de rebanho daquele país no período de 1996 e 1997 revelaram uma média de 310.000 células/mL (Norman et al., 2000). Na Comunidade Econômica Européia (CEE), a Diretiva 92/46/CEE (CEE, 1992) estabelece um máximo de 400.000 células/mL no leite de propriedades rurais dos países integrantes da Comunidade Econômica Européia. A Áustria apresenta a mais baixa CCS da Europa, algo superior a 100.000 células/mL, e Alemanha, Holanda, Suécia e Reino Unido apresentam uma contagem inferior a 200.000 células/mL. Entretanto, a Dinamarca apresentou em 1997 uma média de 247.000 células/mL, aumentando provavelmente para 320.000 células/mL posteriormente, com o aumento da participação do leite orgânico para 60 por cento do volume total (Hillerton, J. E., 2000). Na Austrália e Nova Zelândia os limites para células somáticas são também de 400.000 células/mL e no Canadá, 500.000 células/mL (Ingalls, 2001). No Brasil, a Instrução Normativa n° 51/2002 (Brasil, 2002a) estabelece os limites de CCS no leite refrigerado a granel de tanques de refrigeração de propriedades rurais em um sistema de implantação e adequação progressiva conforme a região do país, demonstrado pela Tabela 8.

Tabela 8. Prazo de adequação à Instrução Normativa N° 51/2002, conforme a região, para CCS do leite cru refrigerado de propriedades rurais (Brasil, 2002a).

	Limites Regionais <sup>(1)</sup>	Limites Regionais <sup>(2)</sup>	Limites Regionais <sup>(3)</sup>	Limites Regionais <sup>(4)</sup>
CCS (células/mL)	Máximo	Máximo	Máximo	Máximo
	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

Limites regionais: (1) até 01/07/2005 nas regiões S/SE/CO e até 01/07/2007 nas regiões N/NE do Brasil para estabelecimentos que se antecipem à instrução Normativa n° 51, de 18 de setembro de 2002; (2) de 01/07/2005 a 01/07/2008 nas regiões S/SE/CO e de 01/07/2007 até 01/07/2010 nas regiões N/NE do Brasil; (3) de 01/07/2008 a 01/07/2011 nas regiões S/SE/CO e de 01/07/2010 até 01/07/2012 nas regiões N/NE do Brasil; (4) a partir de 01/07/2011 nas regiões S/SE/CO e a partir de 01/07/2012 nas regiões N/NE do Brasil.

Os métodos de CCS atualmente em uso no Brasil e normatizados pela FIL por meio da norma International IDF Standard 148A:1995 são o método microscópico e o método fluoro-opto-eletrônico (IDF, 1995a). O método baseado em citometria de fluxo, ainda que não normatizado por aquela instituição, constitui uma inovação. O método microscópico é considerado pela FIL como o método de referência, e consiste em se distribuir adequadamente uma alíquota de leite sobre uma área demarcada sobre uma lâmina de vidro e sobreposição de solução corante de azul de metileno ou brometo de etídio. Com o emprego do fator microscópico, e contando-se as células somáticas em determinada área da lâmina, obtém-se o número de células somáticas por mililitro de leite (células/mL). Em se empregando o azul de metileno, as células somáticas coram-se de azul e associando-se à morfologia que lhe são próprias, podem ser diferenciadas dos glóbulos de gordura, micelas de caseína, bactérias e leveduras. O brometo de etídio é empregado quando se dispõe de microscopia com técnica de fluorescência, uma vez que esta substância tem afinidade pelo DNA da célula e adquire fluorescência verde quando submetido à excitação com luz ultravioleta (IDF, 1995a; Canadian National Comitee, 1994). O método fluoro-opto-eletrônico consiste em um método indireto automatizado, em que uma alíquota de leite é submetida a um tratamento químico-enzimático para eliminação de interferentes (bactérias, leveduras, glóbulos de gordura e micelas de caseína). As células somáticas são então coradas pelo brometo de etídio que se une ao DNA da célula. O líquido contendo as células coradas é distribuído na forma de um filme fino em um disco de rotação, que é inspecionado automaticamente por um microscópio. Cada célula observada pelo microscópio gera um pulso que é amplificado e traduzido em número de células somáticas por mililitro de leite (IDF, 1995a). O método baseado em citometria de fluxo funciona nos mesmos termos daquele empregado para contagem de bactérias em leite, exceto pelo fato de o sistema permitir eliminação das estruturas possivelmente interferentes (bactérias, leveduras), permitindo somente a CCS.

### 2.3 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE NITROGÊNIO E PROTEÍNA

Existem vários métodos de determinação de proteínas em produtos alimentícios, aplicando-se portanto também ao leite de vaca. Com a finalidade de se quantificarem as proteínas totais do leite e derivados lácteos, os métodos mais utilizados são o método de Kjeldahl, os métodos por fixação de corante (principalmente o Negro de Amido), a EIVM e a espectrometria com radiação no intervalo de comprimento de onda do ultravioleta. Com a finalidade de separação, identificação e quantificação das frações nitrogenadas do leite empregam-se métodos fundamentados em cromatografia, eletroforese, fluorescência e imunologia (Veloso et al., 2001).

A análise de NT ainda é o princípio mais usado para quantificar proteínas na presença de outros componentes não protéicos, tais como carboidratos e lipídios, uma vez que a medida do nitrogênio geralmente é uma boa estimativa do conteúdo de proteína de materiais biológicos, ainda que este elemento químico não esteja presente só nas proteínas, mas também de outros componentes tais como ácidos nucleicos, aminas e carboidratos e lipídios com radicais nitrogenados (Gomes, 1996). Estes métodos baseiam-se na conversão do nitrogênio de suas várias formas de ocorrência existentes na matéria orgânica, para nitrogênio elementar ( $N_2$ ) ou para íons amônio ( $NH_4^+$ ), os quais são então quantificados. Neste grupo encontram-se o método de Dumas, o método de Warrentrapp e Will e o método de Kjeldahl (Gomes, 1996).

O método de Kjeldahl, que se baseia na degradação química da proteína e conversão do NT a íon amônio, em razão de sua importância na quantificação de proteínas do leite como método de referência, ele será posteriormente descrito de forma mais detalhada que os demais métodos presentes.

O método de Dumas, desenvolvido em 1831, fundamentou-se na combustão completa a 700-750°C do material orgânico catalisada por óxido cúprico, com formação de nitrogênio molecular ( $N_2$ ), o qual por ser gás, é medido volumetricamente (Gomes, 1996). O leite, por

possuir diversos constituintes (proteínas, gordura, etc.), não se presta bem à análise por esta técnica, de modo que foi substituída pelo método de Kjeldahl como método de referência (Guillou et al. 1986).

O método de Warrentrap e Will, desenvolvido em 1841, consiste no aquecimento da amostra na presença de carbonato de sódio. Forma-se amônia, que é liberada na forma gasosa e fixada por reação com ácido cloroplátinico, formando-se cloroplatinato de amônio, que é precipitado, seco e pesado. Posteriormente, a técnica evoluiu por recepção do amônio liberado em ácido clorídrico padronizado, doseando-se a amônia por contra-titulação (Gomes, 1996).

Guillou et al. (1986) fazem referência ao método de Kofranyi como uma possibilidade adicional de execução da quantificação da proteína em produtos alimentícios. Não se trata de um método de dosagem do NT, entretanto se fundamenta na propriedade de as proteínas liberarem amônia em um meio reacional fortemente alcalino proporcionado por hidróxido de sódio. Uma destilação subsequente permite a liberação do amônio produzido, o qual é recebido e fixado em uma solução de ácido bórico e quantificado por titulação contra ácido clorídrico. A validação do método é limitada, pois as proteínas não apresentam o mesmo número de aminoácidos suscetíveis de liberarem o amônio. Em leite foi empregado como método de rotina, e não é mais utilizado.

Nem todos os métodos baseados na degradação das proteínas por via química têm aplicação eficaz aos produtos alimentares e muitos deixaram de ser utilizados devido à duração do tempo de análise e do custo (Velooso et al., 2001).

O método de quantificação titulométrica da proteína total após reação com o formol é um método citado por Guillou et al. (1986). Foi muito aplicado na quantificação de proteínas do leite e correlaciona-se bem com o método de Kjeldahl dentro de certos limites (Gomes, 1996). Ainda segundo Gomes (1996), a amostra é adicionada de solução de hidróxido de sódio até pH 8,3, quando então adiciona-se formaldeído. Neste pH, os grupos amino livres das proteínas, (mais precisamente o NH<sub>2</sub> terminal e NH<sub>2</sub> epsilon do aminoácido lisina e o

NH<sub>2</sub> não alfa do aminoácido arginina) reagem com o formaldeído adicionado, formando compostos imínicos com liberação de prótons, ocorrendo portanto a diminuição do pH. Em seguida a amostra é titulada contra a solução de hidróxido de sódio padronizada até retorno do meio reacional ao pH de 8,3. Esta variação do pH por adição do formaldeído relaciona-se estreitamente com o conteúdo de lisina e arginina na amostra, e indiretamente com o seu teor protéico. Deve ser elaborada uma curva e obtida uma equação de regressão analisando-se amostras pelo método de Kjeldahl e por este método, relacionando quantidade de hidróxido de sódio empregada para reverter a diminuição do pH e os teores protéicos das amostras. Como os teores em lisina e em arginina são diferentes para cada tipo de proteína, a curva obtida deve ser específica para cada matriz diferente. Desde a década de setenta a técnica não é mais empregada como método de rotina na quantificação de proteínas do leite (Guillou et al. 1986).

Os métodos baseados em fixação de corante (*dye binding*) fundamentam-se na fixação pelas proteínas da amostra de substâncias corantes adicionadas, com formação de complexos coloridos insolúveis. As substâncias corantes são disponibilizadas ao meio reacional em quantidade conhecida e em excesso. O excesso de corante não fixado presente no sobrenadante é separado do complexo precipitado formado e determinado por espectrofotometria de absorção no visível no comprimento de onda de absorção do corante (Guillou et al. 1986). A separação do complexo insolúvel pode ser realizada por filtração ou centrifugação (Dolby, 1961). A quantidade de proteína na amostra e a densidade óptica do sobrenadante são inversamente proporcionais (Guillou et al. 1986). Os corantes mais utilizados na determinação das proteínas do leite são o Negro de Amido 10B, o Laranja Ácido 12 e o Laranja Ácido 10 (ou Laranja G) (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989; Velooso et al., 2001). De acordo com Ribadeau-Dumas & Grappin (1989), a quantidade expressa em unidade de massa de corante ligada por unidade de massa de proteína denomina-se capacidade de ligação do corante (*dye-binding capacity*), abreviada por DBC. Sob o ponto de vista quantitativo, as diversas frações protéicas ou nitrogenadas do leite reagem diferentemente com o corante, de modo que apresentam

diferentes valores de DBC e o NNP do leite não se liga a corante, permanecendo no sobrenadante.

Especialmente o procedimento empregando o Negro de Amido foi posto em prática e mecanizado, o que permitiu a quantificação de proteína rotineiramente em larga escala, com acurácia e baixo custo (Van Reusel & Klijn, 1987). Nos anos 60, a França iniciou a análise de proteína em base de PB em rebanhos leiteiros pelo método no Negro de Amido (Grappin, 1992).

Experiências têm mostrado que, ainda que as várias frações protéicas do leite apresentem valores de DBC levemente diferentes, a principal fonte de discrepância entre o método *dye-binding* e o método de Kjeldahl é a variação do teor em NNP (Dolby, 1961; Waite & Smith, 1972).

O método de ligação a corante para doseamento de proteínas em leite encontra-se normatizado pelos métodos 967.12 e 975.17, respectivamente empregando laranja ácido 12 e negro de amido 10B (Bradley Jr., 2000). A FIL normatizou o método como de rotina por meio do International IDF Standard 98A:1985, baseando-se na capacidade ligante do Negro de Amido (IDF, 1985a). Van Reusel & Klijn (1987) referem-se à substituição ampla do procedimento do Negro de Amido pelos métodos baseados em EIVM, especialmente nos procedimentos de rotina realizados em larga escala.

Guillou et al. (1986) referem-se como técnicas colorimétricas já empregadas na quantificação de proteínas do leite os métodos de Folin Ciocalteu, de 1927 e o método clássico do Biureto.

Os métodos de Folin Ciocalteu e o de Lowry consistem na reação de oxidação-redução de um reativo fosfomolibdico fosfotúngstico oxidante (Guillou et al. 1986), conhecido como reativo de Folin-Ciocalteu (Van Camp & Huyghebaert, 1996), com os aminoácidos tirosina e triptofano das proteínas, estes redutores, com formação de compostos coloridos (Guillou et al. 1986). A intensidade da cor desenvolvida, medida por espectrofotometria no visível, é proporcional à concentração de proteínas presente na amostra.

Estes métodos não apresentam uma boa correlação com o método de Kjeldahl, o que, associado à pouca estabilidade do composto corado e ao mecanismo reacional mal conhecido, levaram à pouca utilização na determinação das proteínas do leite (Guillou et al. 1986).

O método do Biureto é uma técnica empregada em situações que requerem um método rápido mas não muito exato (Gomes, 1996). O método fundamenta-se em uma reação entre a ligação peptídica das proteínas e um metal de transição, que pode ser o níquel ou o cobre, com formação de um complexo estável e colorido, cuja intensidade de cor é medida por espectrofotometria a um comprimento de onda de 540 nm. Sua aplicação à dosagem de proteína do leite foi pequena. São interferentes à técnica o NNP e a gordura láctea (Guillou et al. 1986).

O método turbido-nefelométrico de análise de proteínas totais baseia-se na nefelometria, que consiste na medida da luz dispersada pelas partículas coloidais. No nefelômetro, um feixe luminoso monocromático de grande intensidade é emitido. O cone de luz é recolhido após focalização sobre um detector fótico e o sinal elétrico, medido em volts, é diretamente proporcional à turbidez da solução. Este método foi aplicado na quantificação das proteínas e da gordura do leite. O estabelecimento por padronização de uma curva de regressão permite transformar a percentagem de turbidez obtida pelo equipamento em concentração de proteínas. A formação do colóide protéico se dá por reação com uma mistura de ácido acético glacial, anidrido acético e ácido para-tolueno sulfônico. Consiste de um método simples, rápido e de baixo custo, apresentando uma boa repetitividade (Guillou et al. 1986).

As proteínas do leite podem ser quantificadas por espectrometria de absorção no ultravioleta (UV) em razão de os aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano e menos significativamente a fenilalanina apresentarem a propriedade de absorver a luz no intervalo de comprimento de onda do ultravioleta (Guillou et al. 1986). Mais precisamente, esta propriedade deve-se ao grupamento fenólico da tirosina e ao grupamento indólico do triptofano (Van Camp & Huyghebaert, 1996) e ao grupamento fenil da fenilalanina (Guillou et al., 1986). Este método

foi freqüentemente aplicado na dosagem de proteínas do leite baseando-se na proporção existente entre a intensidade do pico de absorção a um comprimento de onda de 280 nm e o teor em proteínas. Este comprimento de onda deve-se ao pico de absorção máximo da tirosina e do triptofano (Iwaida et al., 1967). O método apresenta diversos problemas, sendo um deles o fato de as diversas proteínas possuírem teores diferentes em aminoácidos aromáticos, apresentando portanto absorções diferentes da radiação ultravioleta, o que conduz a uma baixa correlação com o método de Kjeldahl. Outro problema é o fato de a especificidade do método ser afetada pela presença de outras substâncias capazes de apresentarem absorção da radiação ultravioleta no mesmo comprimento de onda, tais como os ácidos nucleicos e nucleotídeos (Guillou et al. 1986).

Os métodos fotométricos por fluorescência no ultravioleta foram métodos já empregados na quantificação de proteínas do leite. Estas técnicas fundamentam-se na propriedade de certas substâncias possuírem grupamentos químicos capazes de apresentarem a propriedade da fluorescência. Existem dois tipos de métodos fluorimétricos no ultravioleta: aqueles que se baseiam na propriedade de os aminoácidos aromáticos das proteínas (tirosina e triptofano) absorverem a energia ultravioleta a um comprimento de onda de 278 nm e emití-las sob forma de fluorescência a 340 nm, e os que consistem na utilização de fluoróforos (moléculas orgânicas que emitem fluorescência a um comprimento de onda definido) que se fixam às proteínas. Nos dois métodos, a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de proteínas da amostra. O método apresenta baixa correlação com o método de Kjeldahl, principalmente em casos de leites de vacas amostradas individualmente em razão de variações nos teores em aminoácidos com grupamentos fluorogênicos (Guillou et al., 1986). O método fotométrico por fluorescência com a utilização de fluoróforo emprega o ortoftaldialdeído e a fluorescamina, respectivamente com medições de intensidade de fluorescência nos comprimentos de onde de 340 nm e 480 nm.

O método de quantificação das proteínas totais do leite que se baseiam no princípio da EIVM, em razão de sua importância atual na quantificação de proteínas do leite como método

indireto, será posteriormente descrito de forma mais detalhada que os demais métodos presentes.

### 2.3.1 Análise de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (referência)

Conforme IDF (1999), os métodos de referência são aqueles internacionalmente reconhecidos por especialistas ou por concordância entre partes, que fornecem o valor “verdadeiro” ou “valor designado” da quantidade de substância a ser quantificada em uma matriz. Os métodos indiretos, por sua vez, são aqueles que não medem diretamente o componente que se pretende quantificar, mas propriedades que são funcionalmente associadas a ele. É de se esperar para estes métodos portanto, a existência de uma forte correlação entre a propriedade quantificada e a substância alvo.

No grupo dos métodos que se baseiam na determinação de proteína a partir da quantificação do nitrogênio, o mais amplamente aceito foi o método de Kjeldahl, publicado em 1883 e desenvolvido por Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl (Gomes, 1996). Trata-se de um método internacionalmente reconhecido como método de referência para quantificação de proteína em produtos lácteos, uma vez que no leite e em outros alimentos, o nitrogênio é o elemento que essencialmente caracteriza as proteínas (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992; IDF, 1999).

No desenvolvimento do método em 1883, Kjeldahl observou que ao se aquecerem compostos orgânicos na presença de ácido sulfúrico, o nitrogênio era convertido quantitativamente em sulfato de amônia e podia ser subsequenteemente estimado como amônia por destilação após adição de hidróxido de sódio seguida de titulação. Durante a digestão, o carbono é transformado em dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e o hidrogênio em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992), ocorrendo no processo a desidratação e a carbonização (Van Camp & Huyghebaert, 1996). Guillou et al. (1986) referiram-se a uma temperatura de 250°C para ocorrer a digestão e mineralização do nitrogênio presente na matéria orgânica a íon amônio, mas segundo Silva (1990), a

temperatura na mineralização deve ser de 450°C para sistemas fechados e 400°C para sistemas abertos. O método padronizado pela FIL prevê uma temperatura máxima na digestão de 430°C

(IDF, 1993). As equações químicas que explicam o processo de mineralização do nitrogênio são demonstradas pela Figura 10.

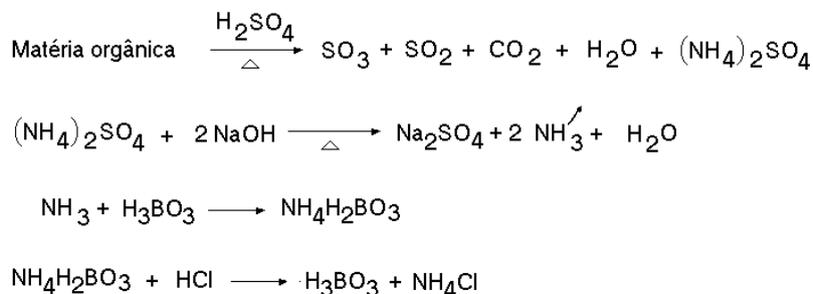


Figura 10. Representação da conversão da matéria orgânica nitrogenada em sulfato de amônio, da reação que ocorre de liberação de amônio em meio alcalino e do recebimento do amônio destilado em ácido bórico no método de Kjeldahl.

Fonte: Gomes (1996) e Silva (1990) modificado.

O método de Kjeldahl, para análise de NT e NNP em leite encontra-se normatizado pela AOAC desde 1994 pelos métodos 991.20 e 991.21 (Bradley Jr., 2000) e pela FIL por meio da norma International IDF Standard 20B: 1993 (IDF, 1993). O método tem sido estudado extensivamente e o procedimento, revisado periodicamente para melhorar a eficiência da digestão e a sua acurácia, com o objetivo de converter o mais rapidamente possível a totalidade do nitrogênio orgânico, inclusive aqueles compostos mais resistentes, em íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), sem perda de nitrogênio por decomposição térmica da amônia (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992). O método é usualmente classificado em macro, semi-micro e micro Kjeldahl conforme a quantidade absoluta de proteína na amostra que vai sofrer digestão, sendo 100 a 300 mg, 50 a 100 mg e menos de 50 mg, respectivamente, os valores de cada classe (Gomes, 1996). Já é bem estabelecido que uma digestão altamente eficiente e uma boa recuperação do nitrogênio (acima de 99%) só são obtidos com a adição de catalisador, usualmente selênio, mercúrio ou cobre, e com uma proporção adequada entre o sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) e o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), o que permite ser alcançada uma temperatura elevada de ebulição. Várias concentrações de sulfato de potássio, tipos de catalisadores (selênio, mercúrio, cobre) e agentes oxidantes já foram testados (Grappin &

Ribadeau-Dumas, 1992). Entre os agentes oxidantes têm-se como exemplos o peróxido de hidrogênio (IDF, 1993; Van Camp & Huyghebaert, 1996), o ácido perclórico, persulfatos e o ácido crômico (Van Camp & Huyghebaert, 1996). O uso de agentes oxidantes aumenta o risco da perda de nitrogênio, entretanto o peróxido de hidrogênio tem conferido bons resultados, sobretudo em matrizes ricas em carboidratos e gorduras, além de evitar a formação excessiva de espuma (Silva, 1990). Processos de digestão por microondas, que se constituíram de uma inovação ao processo tradicional, apresentam um período de digestão muito mais curto que o método de digestão tradicional e a adição de um agente oxidante como o peróxido de hidrogênio mostrou-se fundamental para a adequada mineralização do nitrogênio (Suard et al., 1997). Se, com compostos mais resistentes à digestão o mercúrio é certamente o mais eficiente catalisador, não é muito usado em razão de aspectos ambientais. O sulfato de cobre, que foi primeiramente proposto por Rowland em 1938 na proporção de 0,2g/5 mL de ácido sulfúrico (Grappin & Horwitz, 1988), para análises de leite tem se mostrado uma boa alternativa (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992). Estudos de Rexroad & Cathey (1976) citados por Grappin & Ribadeau-Dumas (1992) demonstraram que o uso dos catalisadores óxido mercúrico ( $\text{HgO}$ ) e sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ )

proporcionam resultados idênticos, a despeito da possibilidade da formação de complexos entre o íon amônio e o mercúrio no meio reacional que prejudicaria a liberação do gás amoníaco subsequente à alcalinização, tornando-se necessária a adição de sulfito de potássio ou tiosulfato de sódio (Van Camp & Huyghebaert, 1996) ou tiosulfato de zinco (Silva, 1990) para desestabilizar o complexo mercúrio-amônia formado. O selênio, ainda que acelere a digestão, tem sido associado à perda de nitrogênio (Silva, 1990). A última versão da FIL da norma do método de ensaio de determinação do teor em nitrogênio do leite, International IDF Standard 20B:1993, define o sulfato de cobre penta-hidratado como o catalisador a ser empregado, na proporção de 0,05 g para 5 gramas de leite no processo macro Kjeldahl, e 0,210 g para 2 gramas de leite no processo semi-micro Kjeldahl (IDF, 1993). Rowland (1938), citado por Grappin & Ribadeau-Dumas (1992), recomendou originalmente uma concentração de 0,2 g de sulfato de cobre penta-hidratado para cada 5 mL de ácido sulfúrico empregado. Comparativamente, uma menor quantidade de cobre foi recomendada pela norma analítica da FIL para prevenir a formação de complexos amoniacais com o cobre, o que leva a uma estimativa do teor em nitrogênio 1% inferior em termos relativos (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992).

Uma recuperação total da amônia a partir do digerido pode ser obtida pela alcalinização (pH 11-13) e uma destilação direta por 5 a 20 minutos com fornecimento moderado de calor. Se for aplicado arraste de vapor, o tempo de destilação não deve exceder 10 minutos. O gás amoníaco (NH<sub>3</sub>) liberado reage com uma solução receptora, sendo muito utilizada uma solução de ácido bórico em título que garante excesso deste após a reação completa com o gás amoníaco. O uso de um indicador adequado permite a visualização do ponto final da titulação do amônio com uma solução ácida padronizada (Van Camp & Huyghebaert, 1996). São empregados como titulantes, conforme a norma International IDF Standard 20B:1993, o ácido clorídrico ou o ácido sulfúrico em solução padronizada (IDF, 1993). Silva (1990) recomenda que a titulação seja realizada em no máximo duas horas após a finalização da recepção pela solução de ácido bórico, já que o

íon amônio neste estado encontra-se fracamente ligado ao ácido bórico, podendo desprender-se na forma de gás amoníaco (NH<sub>3</sub>).

O clássico sistema analítico composto pelo frasco Kjeldahl, queimador a gás ou aquecedor elétrico e aparato de destilação separado, tem sido substituído na rotina por bloco de digestão com aparato de destilação. A titulação tradicional empregando solução indicadora pode ser substituída por titulação automática por variação de pH ou uso de eletrodos específicos. A determinação do íon amônio pode também ser determinada colorimetricamente em sistemas automatizados, como a Análise por Injeção em Fluxo (FIA) (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992).

Por se tratar de um método de referência, os resultados obtidos pelo método Kjeldahl, quando este é corretamente executado, são considerados como o verdadeiro teor em nitrogênio do leite. Para melhorar a reprodutibilidade do laboratório, dois testes devem ser executados regularmente: a checagem da mineralização empregando-se substâncias mais resistentes à digestão, tais como triptofano, lisina ou fenacetina, e a checagem das etapas de destilação e titulação empregando-se sulfato ou oxalato de amônio. Na checagem da mineralização, a recuperação deve ser de no mínimo 98% e na checagem da destilação, de no mínimo 99% (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992; IDF, 1993).

Em estudos colaborativos realizados com a participação de 24 laboratórios em 12 países foram encontrados para o método de Kjeldahl um desvio padrão relativo da repetitividade de 0,5% e um desvio padrão relativo da reprodutibilidade de 1,0% (Grappin & Horwitz, 1988). Nos Estados Unidos, em um estudo colaborativo com a participação de 11 laboratórios observou-se um desvio padrão relativo da repetitividade de 0,31% e um desvio padrão relativo da reprodutibilidade de 0,44% (Barbano et al., 1990).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 51/2002 (Brasil, 2002a) define a proteína como um dos parâmetros de qualidade do leite de consumo no Brasil e do leite cru refrigerado, e como método oficial para a sua análise, define a norma International IDF Standard 20B:1993 (Brasil,

2002a), fundamentada no método de Kjeldahl. Em 2003, a Instrução Normativa nº 22/2003 oficializou os métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos (Brasil, 2003). Por meio deste instrumento normativo, oficializou-se um método de ensaio para análise de proteína fundamentada no método de Kjeldahl, mas até certo ponto diferente da norma International IDF Standard 20B:1993, preconizada pela Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002a). A Tabela 9 demonstra as diferenças existentes entre os métodos de ensaio. Conforme ela, observam-se diferenças entre as quantidades de

sal que elevam o ponto de ebulição da mistura em digestão, com o uso de 2,6 vezes mais quando se compara o método definido pela norma International IDF Standard 20B:1993 com a Instrução Normativa nº 22/2003 (Brasil, 2002a; Brasil, 2003). Nota-se também a expressiva menor quantidade de catalisador recomendada pelo método definido pela FIL, haja vista a prevenção da formação de complexos amoniacais com o cobre, o que leva a uma estimativa do teor em nitrogênio 1% inferior em termos relativos (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992).

Tabela 9. Comparação entre os parâmetros empregados pelos métodos de ensaio definidos pelas Instruções Normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para análise de proteína em leite, segundo Brasil (2003) e Brasil (2002a) adaptado.

Parâmetro analítico	Instrução Normativa n° 22/2003			Instrução Normativa n° 51/2002 – International IDF Standard 20B:1993	
	Micro Kjeldahl	Semi-micro Kjeldahl	Macro Kjeldahl	Macro Kjeldahl com digestão tradicional	Macro Kjeldahl com uso de bloco digestor
<b>Adição de Zn na destilação</b>	Não	Não	Sim	Não	Não
<b>Quantidade de amostra (gramas)</b>	2 g	5 g	10 g	5 g	5 g
<b>Sal elevador do ponto de ebulição</b>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; KHSO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; KHSO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; KHSO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Massa do sal elevador do P.E.*</b>	2,27 g	2,27 g	4,54 g	15 g	12 g
<b>Catalisador</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O
<b>Massa de catalisador*</b>	0,23 g	0,23 g	0,46 g	0,05 g	0,05 g
<b>Volume de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> digestor (mL)*</b>	7 mL	10 mL	20 mL	25 mL	20 mL
<b>Volume de NaOH alcalinizante*</b>	20 mL NaOH 50% m/v	20 mL NaOH 50% m/v	100 mL NaOH 50% m/v	75 mL NaOH 50% m/m	55 mL NaOH 50% m/m
<b>Uso de bloco digestor</b>	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
<b>Digestão</b>	A 400°C até que o líquido se torne límpido, transparente e azul-esverdeado	A 400°C até que o líquido se torne límpido, transparente e azul-esverdeado	A 400°C até que o líquido se torne límpido, transparente e azul-esverdeado	Entre 1,8 a 2,25 horas, sendo 1 a 1,5 horas após clareamento e cor azul-esverdeada	A 180-230°C por 30 min. Mantendo a 410-430°C até clareamento e cor azul-esverdeada, mantendo por 1 hora adicional (total máx. 1,75 a 2,5 h)
<b>Vol. de sol. H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 4%*</b>	20 mL	20 mL	25 mL	50 mL	50 mL
<b>Massa de vermelho de metila indicador no frasco receptor*</b>	1,32 x 10 <sup>-5</sup> g	1,32 x 10 <sup>-5</sup> g	1,65 x 10 <sup>-5</sup> g	5,0 x 10 <sup>-5</sup> g	5,0 x 10 <sup>-5</sup> g
<b>Massa de verde bromocresol indicador no frasco receptor*</b>	0,6 x 10 <sup>-5</sup> g	0,6 x 10 <sup>-5</sup> g	0,75 x 10 <sup>-5</sup> g	25,0 x 10 <sup>-5</sup> g	25,0 x 10 <sup>-5</sup> g
<b>Volume de destilado recebido</b>	100 mL	100 mL	Não define	100 a 125 mL	150 mL

Fonte: Brasil (2003) e Brasil (2002a) adaptado. Nota (\*) Refere-se a quantidades por amostra analisada.

Considerando-se os indicadores da qualidade analítica, a norma International IDF Standard 20B:1993 preconiza uma diferença entre réplicas de uma mesma amostra analisada sucessivamente por um mesmo operador e no mesmo equipamento, portanto sob condições de repetitividade, de no máximo 0,006% m/m quando se está quantificando o teor em NT, correspondendo a 0,038% em termos de PB, e de 0,003% m/m quando se está quantificando o teor em NNP (IDF, 1993).

Por meio de ensaios colaborativos, Bradley Jr. (2000), em instrumento de padronização de técnicas da AOAC, estabelece para o percentual de nitrogênio como PB e NNP em leite, respectivamente um desvio-padrão da repetitividade  $S_r$  de 0,014% m/m (0,385% relativo) e 0,006% m/m (2,817% relativos).

#### 2.3.1.1 Fator de conversão do nitrogênio em proteína e cálculos empregados na quantificação

Pelo método de Kjeldahl, para que seja obtido o teor em proteínas do leite, aplica-se um fator, chamado “fator de conversão Kjeldahl”. Matematicamente, é o valor pelo que se deve multiplicar o percentual de nitrogênio na amostra para convertê-lo em proteína. O valor para o leite é de 6,38, adotado e normalizado pela FIL por meio da norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993). Este valor foi originalmente proposto no século passado baseando-se no teor de 15,67% em nitrogênio encontrado em caseína precipitada por ácido e purificada. Entretanto, o termo “teor em proteína” não é de todo correto, uma vez que a proporção de NNP varia entre e dentre produtos lácteos, como por exemplo, de 3 a 8% no leite e de 25 a 30% no soro (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992). Em outros produtos tais como organismos celulares, 50% do nitrogênio presente são provenientes de ácidos nucleicos e 10% do nitrogênio de tecidos vegetais são aminoácidos não protéicos e outros compostos nitrogenados (Gomes, 1996). Para evitar confundimento, o termo proteína bruta tem sido

usado para expressar a matéria nitrogenada no leite (Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992), correspondendo ao teor percentual em nitrogênio na amostra multiplicado pelo fator de 6,38. Em verdade, o fator não é constante e é altamente dependente da composição de aminoácidos das proteínas do leite. Estudos de Karman & van Boekel (1986) baseados em seqüenciamento de aminoácidos de várias proteínas lácteas, mostraram que o valor para o leite deveria ser 6,34. Entretanto, os valores dos fatores de conversão para as diversas frações nitrogenadas do leite foram diferentes daqueles teoricamente esperados levando-se em consideração o seqüenciamento de aminoácidos das frações envolvidas, principalmente em razão da dificuldade de se obterem frações puras. Em um adendo posteriormente publicado, baseando-se em informações mais precisas quanto ao seqüenciamento de aminoácidos das proteínas envolvidas, obteve-se um fator de 6,35 ou 6,36 em substituição ao fator 6,34 proposto anteriormente (van Boekel & Ribadeau-Dumas, 1987). Walstra (1992) descreve o uso do fator de 6,35 ou 6,36 aplicado ao teor em NT na obtenção do teor em PV e não do teor em PB. IDF (1993) define como PB o percentual de NT da amostra multiplicado pelo fator 6,38. Uma técnica por ela normatizada, que envolve a precipitação da proteína com ácido tricloroacético a 12% m/v, seguida de quantificação do nitrogênio na fração precipitada, permite a obtenção do teor da amostra em nitrogênio protéico, o qual ao ser multiplicado por 6,38, é denominado “teor em nitrogênio protéico expresso em proteína equivalente”. É importante salientar que a norma International IDF Standard 20B:1993 não faz menção ao termo “proteína verdadeira”, embora este termo seja amplamente utilizado pela comunidade científica.

Para efeito de cálculos matemáticos que traduzam a quantidade de NT no leite pelo método de Kjeldahl, IDF (1993) estabelece a seguinte equação (equação 1), em se empregando o ácido clorídrico como titulante:

Equação 1:

$$\% N_{\text{total}} = \frac{1.4007 (V_s - V_b) M}{W}$$

- V<sub>s</sub> = Volume, em mililitros, da solução volumétrica padronizada de ácido usada na titulação;  
V<sub>b</sub> = Volume, em mililitros, da solução volumétrica padronizada de ácido usada no teste branco;  
M = Molaridade exata, com quatro casas decimais, da solução volumétrica padronizada de ácido usada;  
W = Massa em gramas da porção analisada da amostra.

Pelas equações químicas apresentadas pela Figura 10, nota-se uma relação mol a mol entre o ácido clorídrico e o metaborato de amônio, uma relação mol a mol entre este último e o gás amoníaco proveniente da destilação e, finalmente, a mesma relação entre o gás amoníaco e o nitrogênio. Conseqüentemente, há uma relação indireta mol a mol entre o ácido clorídrico consumido na titulação e o nitrogênio presente na porção de amostra testada.

### 2.3.2 Análise de proteína no leite pelo método espectrométrico de absorção no infravermelho médio

Os métodos espectrométricos têm sido utilizados na quantificação dos principais componentes do leite há muito tempo (Goulden, 1964; Biggs, 1967; Barbano & Clarck, 1989). Um rápido aumento da demanda de análises de leite em todo o mundo, com a finalidade de subsidiar sistemas de pagamento de produtores e serviços de melhoria de rebanhos leiteiros, motivou construtores de instrumentos analíticos a procurarem por técnicas analíticas mais rápidas (Biggs et al., 1987). Neste contexto, a EIVM foi a solução para estes propósitos, com redução dos custos analíticos para até um décimo daqueles decorrentes dos métodos tradicionais (Biggs, 1967). Os métodos baseados na EIVM se mantêm até hoje como técnica de escolha de laboratórios analisadores de leite cru, merecendo em tempos recentes uma referência como norma analítica internacional (IDF, 2000).

O método de espectrometria de absorção no

infravermelho enquadra-se na classe de métodos espectrométricos de absorção e requerem duas medidas de potência: uma antes que um feixe de radiação passe através do meio que contém o analito (P<sub>o</sub>) e outra depois (P), representado na Figura 11. Dois termos amplamente empregados em espectrometria de absorção e então relacionados com a razão entre P<sub>o</sub> e P são a Transmitância (T) e a Absorvância (A).

A transmitância é fração da radiação transmitida através do meio e pode ser também expressa em termos percentuais. A absorvância relaciona-se com a transmitância por uma relação logarítmica (Skoog et al., 2002).

As expressões matemáticas que expressam a absorvância (A) e a transmitância (T) são expressas pela equação 2.

Segundo a Lei de Beer, a absorvância é diretamente proporcional ao comprimento do caminho b percorrido pelo feixe de radiação através da solução absorvente e à concentração dos compostos absorventes presentes na solução (Skoog et al. 2002), e a expressão matemática que define esta proporcionalidade é definida pela equação 3.

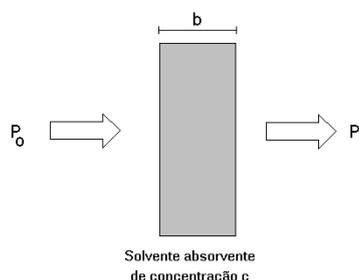


Figura 11. Atenuação do feixe de radiação por uma solução absorvente.  
Fonte: Skoog et al. (2002).

Equação 2:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \%T = \frac{P}{P_0} \times 100 \quad A = -\log_{10} T = \log_{10} \frac{P_0}{P}$$

Equação 3:

$$A = abc$$

Na equação 3, “a” é uma constante de proporcionalidade, chamada de absorvidade, “b” é o caminho óptico e c a concentração da substância absorvente. Quando o caminho óptico é expresso em centímetros e a concentração é expressa em moles por litro, a absorvidade é chamada de absorvidade molar (antes chamado de coeficiente de extinção molar), representada pelo símbolo  $\epsilon$  (Skoog et al. 2002), característica portanto do soluto e depende do solvente, da temperatura e do comprimento de onda (Biggs et al., 1987), assumindo a equação 3 a expressão definida pela equação 4:

Equação 4:

$$A = \epsilon bc$$

A região infravermelha do espectro eletromagnético estende-se desde o extremo vermelho do visível até à região das microondas, ou seja, o intervalo que compreende os comprimentos de onda entre 0,7 e 500  $\mu\text{m}$ , ou de 14.000  $\text{cm}^{-1}$  a 20  $\text{cm}^{-1}$  quando expressos em número de onda (Willard et al.,

1974). O número de onda é uma unidade útil na espectrometria do infravermelho porque, em contraste com o comprimento de onda, é diretamente proporcional à frequência e à energia da radiação (Skoog et al. 2002). O número de onda relaciona-se com o comprimento de onda pela equação 5:

Equação 5:

$$\text{n}^\circ \text{ de onda em cm}^{-1} = \frac{10^7}{\lambda} \quad (\text{com } \lambda \text{ em nm})$$

A região do espectro infravermelho é comumente dividida em infravermelho próximo, com comprimentos de onda de 0,7 a 2,5  $\mu\text{m}$ ; o infravermelho médio, com comprimentos de onda de 2,5 a 50  $\mu\text{m}$ ; e o infravermelho afastado, no intervalo de 50 a 1000  $\mu\text{m}$  (Willard et al., 1974). Entretanto, Ribadeau-Dumas & Grappin (1989) citam a região do infravermelho médio no intervalo de comprimento de onda de 2,5 a 25  $\mu\text{m}$ , enquanto Skoog et al. (2002) ratificam os intervalos citados por Willard et al. (1974).

A espectrometria no infravermelho diz respeito aos movimentos de torção, deformação, rotação e vibração dos átomos em uma molécula. Por interação com a radiação infravermelha, uma parte da radiação incidente é absorvida, para determinados comprimentos de onda, resultando nos movimentos ora citados. A multiplicidade de vibrações que ocorrem simultaneamente dá origem a um espectro de absorção extremamente complexo, característico dos grupos funcionais existentes na molécula, assim como da configuração geral de átomos desta (Willard et al., 1974). As moléculas são passíveis de sofrerem vibrações de alongamento (envolvendo aumento e diminuição do comprimento das ligações) e vibrações de deformação (alteração da posição de um átomo em relação à sua posição original com manutenção do comprimento de sua ligação ao átomo vizinho).

As moléculas constituídas por vários átomos vibram não só de acordo com as frequências das vibrações em determinada ligação (vibração fundamental), mas o resto da molécula também é afetado, gerando vibrações chamadas harmônicas ou sobretons. A banda de

combinação representa a soma ou diferença das frequências de duas ou mais bandas harmônicas e/ou fundamentais. A absoluta especificidade do espectro infravermelho resulta, em grande parte, da presença destas bandas de combinação, que são características da molécula no seu conjunto. As radiações do infravermelho mais empregadas na análise dos componentes do leite são o infravermelho próximo e o infravermelho médio. As intensidades das bandas produzidas no infravermelho próximo são usualmente fracas quando comparadas com aquelas obtidas por meio do infravermelho médio, quando originadas de vibrações fundamentais. Deste modo, as bandas do espectro gerado pela absorção de radiação no infravermelho próximo são menos específicas para uma dada molécula que aquelas geradas pela absorção no infravermelho médio, e para quantificar um componente específico, um maior número de comprimentos de onda é necessário (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989).

O leite é um sistema de difícil análise por EIVM, devido ao elevado teor em água, que absorve fortemente em todo intervalo de comprimento de onda de 2 a 10  $\mu\text{m}$ , bem como devido à propriedade de dispersão da radiação que o leite possui.

Sistemas de eliminação da absorção da água, como por exemplo duplo feixe de radiação, permitem que outros componentes tornem-se claramente visíveis no espectro formado pela

incidência de radiações de diversos comprimentos de onda (Goulden, 1964). Quando registradas como absorvâncias, a intensidade das bandas de absorção dos componentes é proporcional à concentração de cada um dos componentes considerados.

Além da absorção, a radiação ao passar através do leite sofre dispersão proporcionada pelos glóbulos de gordura e pelas micelas de caseína. Esta dispersão diminui com a redução da razão tamanho da partícula/comprimento de onda e quando o índice de refração das partículas suspensas aproxima-se do índice de refração do meio suspensor. A redução do tamanho dos glóbulos de gordura por processo de homogeneização (Goulden, 1964) para diâmetros inferiores a 1  $\mu\text{m}$  (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989) e operação com radiações de comprimentos de onda maiores (por exemplo, infravermelho médio) tornam o leite transparente quanto à perda da intensidade da radiação por dispersão (Goulden, 1964). Como o leite apresenta três principais componentes (lactose, proteína e gordura), três comprimentos de onda devem ser empregados na medição da absorvância (Goulden, 1964). De acordo com Biggs et al. (1987) e Ribadeau-Dumas & Grappin, (1989), considerando a existência de três substâncias absorventes em um dado comprimento de onda e um caminho óptico igual, as absorvâncias medidas a cada um dos três comprimentos de onda ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ )  $\lambda$  são dadas pela equação 6.

Equação 6:

$$A_1 = \varepsilon_{x1}C_x + \varepsilon_{y1}C_y + \varepsilon_{z1}C_z \quad \text{em } \lambda_1 \quad \text{(I)}$$

$$A_2 = \varepsilon_{x2}C_x + \varepsilon_{y2}C_y + \varepsilon_{z2}C_z \quad \text{em } \lambda_2 \quad \text{(II)}$$

$$A_3 = \varepsilon_{x3}C_x + \varepsilon_{y3}C_y + \varepsilon_{z3}C_z \quad \text{em } \lambda_3 \quad \text{(III)}$$

Sendo:

$\varepsilon_{x1}$ ;  $\varepsilon_{x2}$ ;  $\varepsilon_{x3}$  as absorvâncias molares do componente x em  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ , respectivamente;

$\varepsilon_{y1}$ ;  $\varepsilon_{y2}$ ;  $\varepsilon_{y3}$  as absorvâncias molares do componente y em  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ , respectivamente;

$\varepsilon_{z1}$ ;  $\varepsilon_{z2}$ ;  $\varepsilon_{z3}$  as absorvâncias molares do componente z em  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ , respectivamente;

$A_1$ ;  $A_2$ ;  $A_3$  As absorvâncias totais nos comprimentos de onda  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ , respectivamente.

As concentrações dos três componentes absorventes da radiação infravermelha podem ser obtidas pela solução simultânea das equações lineares, empregando-se as absorvidades molares dos componentes a cada um dos três comprimentos de onda (Biggs et al., 1987).

Estudos de Goulden (1964) por espectrometria no infravermelho por varredura, mostraram que o melhor comprimento de onda a ser empregado na determinação de gordura foi de 5,73  $\mu\text{m}$ , referente à absorção proporcionada pelo grupamento carbonila do grupamento carboxílico dos triacilgliceróis, no qual nem a proteína nem a lactose apresentaram absorção significativa, demonstrado pela Figura 12a. A intensidade da banda proporcionada pelo grupamento amida da ligação peptídica a um comprimento de onda de 6,46  $\mu\text{m}$  foi considerada ideal na quantificação da proteína, a despeito de a gordura apresentar absorção neste comprimento de onda, contribuindo apreciavelmente para a absorção total, o que é mostrado pela Figura 12b (Goulden, 1964). Neste comprimento de onda a lactose e elementos solúveis também absorvem a radiação em menor extensão (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989). A absorção neste comprimento de onda origina-se do estiramento da ligação C-N (40%), e da deformação por flexão da ligação N-H (60%). A ligação peptídica também apresenta bandas de absorção de radiação no comprimento de onda de 6,1  $\mu\text{m}$ , devido ao estiramento da carbonila, e no comprimento de onda 3,0  $\mu\text{m}$ , devido ao estiramento da ligação N-H (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989).

Para a lactose, conforme a Figura 12c, a radiação com comprimento de onda de 9,6  $\mu\text{m}$  foi considerada a mais conveniente, na qual este carboidrato apresenta uma absorção mais forte que a proteína (Goulden, 1964). A Figura 12 demonstra a relação entre absorvância e concentração dos três principais componentes

do leite nos três comprimentos definidos por Goulden (1964).

Teoricamente, o comprimento de onda ideal para determinação dos SNG do leite deveria ser definido a partir de duas premissas a serem atendidas: de absorção zero proporcionada pela gordura e de iguais absorvidades molares da proteína e da lactose. Goulden (1964), determinando os comprimentos de onda de atenuação zero para a gordura do leite em 6,9 e 7,95  $\mu\text{m}$ , e 7,32 e 7,65  $\mu\text{m}$  para equivalência entre as absorvidades molares da proteína e da lactose, observou que não era possível o atendimento simultâneo das duas premissas anteriormente citadas, mas definiu o que mais próximo se adequaria, definindo o valor de 7,9  $\mu\text{m}$  para quantificação da proteína e da lactose com um mínimo de interferência da gordura, somando-se uma constante referente ao teor em minerais. Em espectrômetros mais modernos, o teor em sólidos totais ou SNG pode ser determinado por dois caminhos: definindo experimentalmente determinado fator a ser adicionado aos percentuais de proteína, gordura e lactose, ou por cálculos por regressão múltipla direta aplicada aos sinais instrumentais gerados pelos comprimentos de onda para determinação de gordura, lactose e proteína (Lanher, 1996).

Mais recentemente, equipamentos permitiram a quantificação de sólidos totais como a soma do teor em gordura, proteína e lactose adicionada de uma constante representativa dos minerais, ou por meio da medição do teor em água a um comprimento de onda de 4,3  $\mu\text{m}$  (Biggs et al., 1987).

Barbano & Clarck (1989) citam como comprimentos de onda geralmente empregados na quantificação dos principais componentes do leite os valores de 5,723  $\mu\text{m}$  (comprimento de onda A) e 3,480  $\mu\text{m}$  (comprimento de onda B) para a gordura, 9,610  $\mu\text{m}$  para a lactose e 6,465  $\mu\text{m}$  para a proteína.

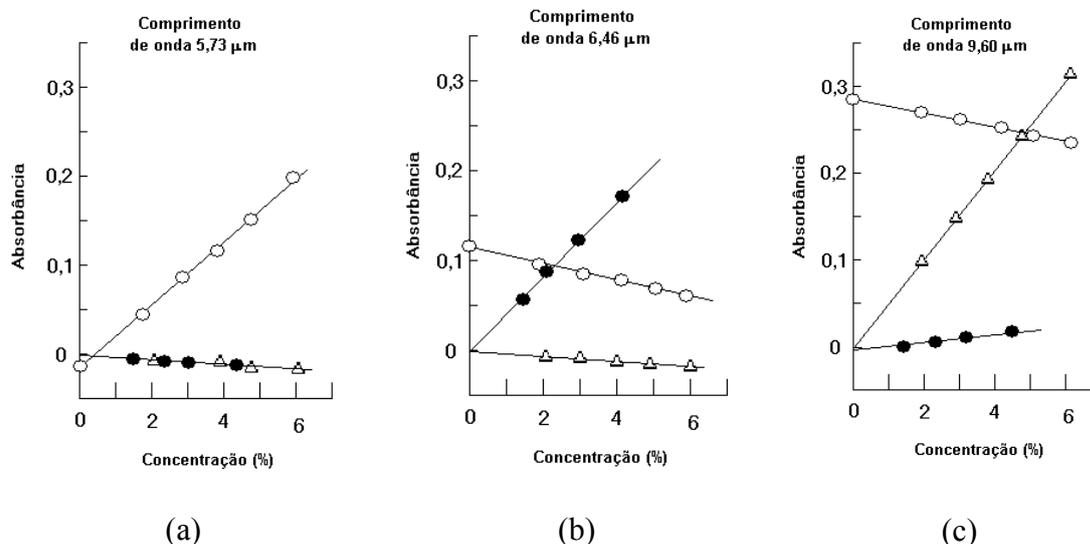


Figura 12. Relações entre absorvâncias e concentrações de gordura (o), proteína (•) e lactose (Δ) em comprimentos de onda de análise.  
Fonte: Goulden (1964).

A Tabela 10 demonstra a interferência que cada um dos três principais componentes exercem sobre os comprimentos de onda de radiações consideradas adequadas para o componente

alvo, em termos de absorvância relativa. Nota-se a maior interferência da proteína na análise da gordura e da gordura na análise da lactose.

Tabela 10. Absorvâncias relativas dos componentes interferentes a comprimentos de onda para determinação de gordura, proteína e lactose (os componentes em medição em seus comprimentos de onda ideais apresentam absorvância relativa igual a 1).

Componente interferente	Comprimento de onda ( $\mu\text{m}$ )		
	5,73 (gordura)	6,46 (proteína)	9,60 (lactose)
Gordura	1,000	-0,228	-0,081
Proteína	-0,045	1,000	+0,054
Lactose	-0,054	-0,083	1,000

Fonte: Biggs (1967).

Na prática, os analisadores dos componentes do leite no infravermelho não calculam as concentrações direta e simultaneamente por meio das equações lineares demonstradas na equação 6, tendo-se em questão as calibrações necessárias frente a métodos de referência (Biggs et al., 1987). Em razão da dependência de calibração, os métodos espectrométricos são considerados métodos indiretos (IDF, 1999). Conforme a FIL, os métodos diretos adotados atualmente para quantificação de gordura,

proteína e sólidos totais em leite são respectivamente as normas International IDF Standard 1D:1996 (IDF, 1996), IDF Standard 20C:2001 (IDF, 2001) e International IDF Standard 21B:1987 (IDF, 1987) e a EIVM encontra-se normatizada por meio da norma International IDF Standard 141C:2000 (IDF, 2000) e pela AOAC por meio do método 972.16 (Bradley Jr., 2000). A Instrução Normativa nº 51/2002 (Brasil, 2002a), referindo-se aos métodos de ensaio oficiais aplicáveis ao leite

cru refrigerado define para análise de gordura a norma International IDF Standard 1C:1987 (versão anterior da norma International IDF Standard 1D:1996), para análise de proteína a norma International IDF Standard 20B:1993 (versão anterior da norma IDF Standard 20C:2001) e para análise de sólidos totais a norma IDF Standard 21B:1987 e permite o emprego de outros métodos desde que conhecidos os seus desvios e correlações em relação aos respectivos métodos de referência (Brasil, 2002a).

A acurácia dos espectrômetros de infravermelho depende muito da acurácia da análise pelo método de referência empregado para realizar e manter a calibração (Biggs, 1972). Estudos colaborativos realizados demonstraram erros sistemáticos expressos como desvio-padrão da acurácia (decorrentes da diferença entre o método indireto e o método de referência) de 0,17% m/m absoluto, com calibrações realizadas com análises de referência executadas por cada laboratório independentemente, eles foram reduzidos para 0,044% m/m absolutos quando eram realizadas nas amostras de calibração análises por métodos de referência realizadas por um único laboratório (Biggs, 1978).

As amostras de referência analisadas por métodos químicos podem ser reunidas e analisadas tanto por unidades individuais quanto por um laboratório central que distribui as amostras para outras unidades, sendo que o último método oferece a vantagem de reduzir custo de amostragem e análise e aumentar a concordância entre resultados de diferentes laboratórios (Ginn & Packard, 1989).

De um modo geral, um procedimento completo de calibração inicia-se com a linearização da resposta do equipamento para cada um dos componentes em quantificação. A voltagem produzida pelo equipamento como efeito da medição da propriedade de uma substância não tem relação linear com a concentração do componente na amostra e o procedimento de

linearização destina-se a converter o sinal de voltagem em uma resposta em concentração do componente, em uma relação linear. Isto é feito submetendo-se amostras com concentrações crescentes de cada componente (gordura, proteína e lactose) à medição e ajuste pelo instrumento dos sinais primários. Neste ponto, as respostas linearizadas às concentrações dos componentes são denominadas valores “não corrigidos”. A segunda etapa consiste em transformar os valores “não corrigidos” em valores “corrigidos”, determinando-se o efeito que um ou mais componentes exercem na medição de um outro componente alvo, decorrente da absorção do(s) componente(s) interferente(s) no mesmo comprimento de onda de medição do componente alvo. Isto é feito por meio de uma regressão múltipla, submetendo amostras de referência (ou calibração) analisadas pelos procedimentos químicos e com valores considerados “reais” às leituras pelo equipamento, quando então são obtidos os coeficientes usados nas equações para se obterem valores corrigidos (finais) a partir dos resultados não corrigidos. Estes coeficientes são denominados coeficientes de interferência (Bentley, 1998).

A partir das equações lineares demonstradas pela equação 6, são obtidas pelo software do equipamento equações (equação 7) que refletem a relação entre a concentração final (chamados “valores corrigidos”) de cada um dos componentes gordura ( $C_f$ ), proteína ( $C_p$ ) e lactose ( $C_l$ ), com os valores “não corrigidos” de cada um dos componentes analisados, respectivamente  $C_{fu}$ ,  $C_{pu}$  e  $C_{lu}$ . Consolidando aquela relação, são estabelecidos coeficientes ( $b_1$  a  $b_6$ ) chamados fatores de correção cruzada ou coeficientes de interferência (decorrentes da interferência que os outros componentes exercem no sinal do componente em medição em seu comprimento de onda), inclinações (*slopes*) decorrentes da calibração primária ( $p_1$  a  $p_3$ ) e inclinações (*slopes*) decorrentes da calibração secundária ( $s_1$  a  $s_3$ ) (Biggs et al., 1987).

Equação 7:

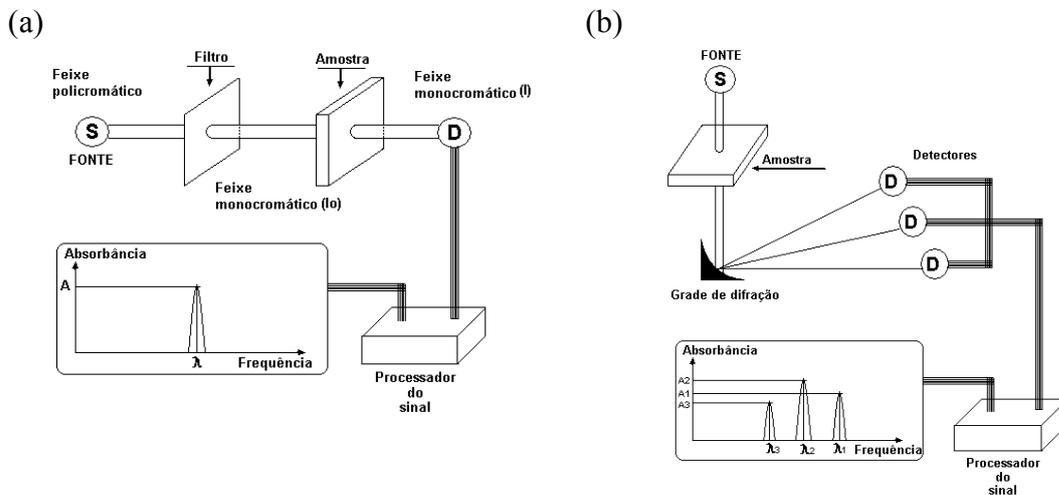
$$C_f = s_1 (p_1 \cdot C_{fu}) + b_1 (p_2 \cdot C_{pu}) + b_2 (p_3 \cdot C_{lu}) + a_f$$

$$C_p = s_2 (p_2 \cdot C_{pu}) + b_3 (p_1 \cdot C_{fu}) + b_4 (p_3 \cdot C_{lu}) + a_p$$

$$C_l = s_3 (p_3 \cdot C_{lu}) + b_5 (p_1 \cdot C_{fu}) + b_6 (p_2 \cdot C_{pu}) + a_l$$

Geralmente os EIM para análise de leite cru têm princípios gerais de funcionamento semelhante, mas diferem em espectrômetros de filtro, espectrômetros de rede de difração e espectrômetros com transformada de Fourier e interferômetro. Nos espectrômetros de filtro o feixe de radiação é gerado por uma fonte de infravermelho médio com vários comprimentos de onda (chamada de “policromática”, ainda que o infravermelho não seja uma radiação visível) e um filtro situado no caminho do feixe absorve todas as radiações com frequências (comprimentos de onda) indesejadas, sobrevivendo apenas uma. A radiação com um só comprimento de onda (chamada de “monocromática”) interage com a amostra em uma cubeta. A radiação monocromática resultante desta interação é detectada e o sinal é processado, resultando em um único resultado de absorvância para um único comprimento de onda (Figura 13a). Nos espectrômetros de infravermelho pós-dispersivo, um feixe de radiação “policromática” é gerado por uma fonte e interage diretamente com a amostra em uma cubeta. A radiação “policromática” transmitida resultante desta interação colide com uma rede de difração que a dispersa resultando feixes monocromáticos de radiação infravermelha, que são percebidos por um conjunto de detectores, que geram uma medida de absorvância para cada comprimento de onda definido a ser detectado em um dado momento (Figura 13b). Nos espectrômetros com transformada de Fourier (Figura 13c), baseados no interferômetro de Michelson, um feixe policromático de radiação infravermelha é

gerado por uma fonte e é levado a colidir com um divisor de feixe que o divide em dois feixes “policromáticos” idênticos. Um deles é levado a incidir um espelho fixo e o outro é levado a incidir um espelho móvel. Quando os dois feixes são recombinados, a diferença de fase entre os feixes cria uma interferência que pode ser matematicamente relacionada com frequência da radiação (comprimento de onda). Uma varredura pelo movimento do espelho cria uma série contínua de interferências matematicamente relacionadas com o espectro. Os feixes resultantes interagem com a amostra na cubeta e continuamente os feixes transmitidos colidem com o detector proporcionando a medição de absorvância a cada comprimento de onda do espectro completo (Lanher, 1996). Espectrômetros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) apresentam uma série de vantagens, isto é, melhoria da proporção entre sinal e ruído, uma redução significativa em tempos de varredura, energia de trabalho mais elevada e acurácia superior dos comprimentos de onda (Van de Voort et al., 1992). A performance total do FTIR é significativamente melhor que a performance de um espectrômetro de infravermelho a filtro, certamente porque o FTIR proporciona mais informação espectral da amostra de leite que o de filtro. Por isso, a influência de fatores conhecidos e desconhecidos, tais como grupamentos carboxílicos livres, NNP, proporção de insaturações podem ser mais facilmente levadas em conta que em equipamentos de filtro (Lefier et al., 1996).



Figuras 13a e 13b. Principais sistemas de espectrometria no infravermelho: (a) monocromador em filtro; (b) monocromador por rede de difração.  
 Fonte: Lefier et al. (1996)

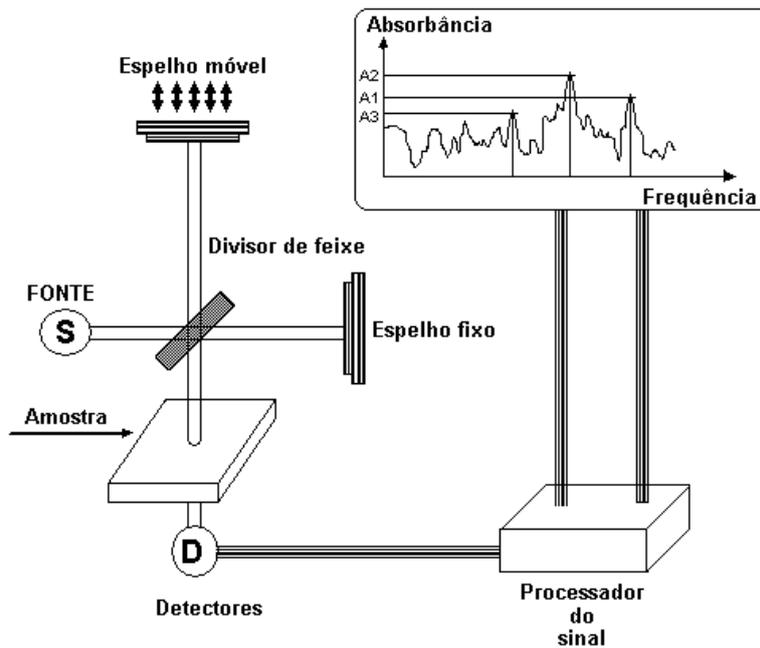
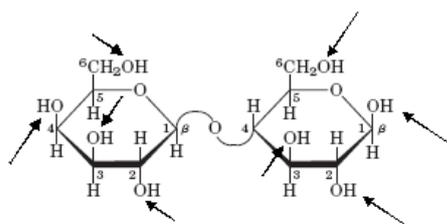


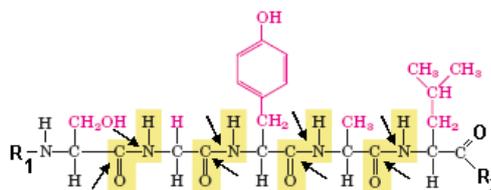
Figura 13c. Sistemas de espectrometria no infravermelho com separação de radiação com vários comprimentos de onda seguindo o princípio da interferometria com transformada de Fourier.  
 Fonte: Lefier et al. (1996)

A temperatura, vapor de água atmosférico no console óptico e a eficiência do homogeneizador e o zero óptico (absorção de fundo) são fatores que devem ser acompanhados para manter estável a performance da resposta do equipamento (Biggs et al., 1987; Ribadeau-

Dumas & Grappin, 1989). As Figuras 14 e 15 demonstram os grupamentos afetados pela radiação infravermelha nos comprimentos de onda selecionados para quantificação de gordura, proteína e lactose.



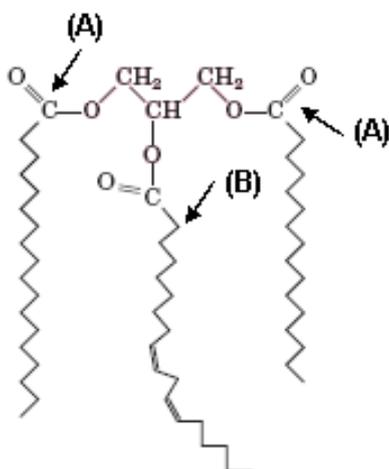
**Lactose (forma  $\beta$ )**  
 **$\beta$ -D-galactopiranosil-(1.4)- $\beta$ -D-glucopiranosido**  
 Sítios de absorção do grupo hidroxila



**Estrutura da molécula da proteína**  
 Sítios de absorção dos grupos amídicos

Figura 14. Sítios de absorção do infravermelho médio, em comprimentos de onda de 9,6  $\mu$ m nas moléculas de lactose (grupamento hidroxila), de 6,5  $\mu$ m nas moléculas de proteína (grupamento amídico CONH)

Fonte: Biggs et al. (1987) com disposição de texto em figura.



**Triacil-glicerol**  
 Sítios de absorção do grupo carbonila (A) e das ligações carbono-hidrogênio (B)

Figura 15. Sítios de absorção do infravermelho médio, em comprimentos de onda de 5,7  $\mu$ m (grupamento carbonila C=O dos triacilglicéris) e 3,5  $\mu$ m (ligações C-H das cadeias de ácidos graxos).

Fonte: Biggs et al. (1987) com disposição de texto em figura.

### 2.3.2.1 Fatores que interferem na acurácia da determinação dos componentes do leite por EIVM

A composição do leite pode variar tanto no aspecto quantitativo quanto no aspecto qualitativo em relação às suas características

químicas e físicas. O sucesso do emprego da EIVM na análise do leite deve-se principalmente à composição relativamente consistente do leite de vaca, mas pode ocorrer sobre a acurácia do método a interferência proporcionada por leite de composição anormal e leites oriundos de vacas submetidas à alimentação suplementada em ácidos graxos

poliinsaturados (Mills & Van De Voort, 1982).

Fatores que interferem na acurácia do método são as diferentes espécies e raças, o estágio de lactação, a alimentação animal, a estação do ano, o intervalo entre ordenhas, os distúrbios metabólicos causados por mastite, a síndrome da gordura baixa, cetose, etc. Estas variações podem afetar a acurácia da determinação por EIVM, principalmente no que diz respeito à alteração do número de moléculas por peso de componente, desvios da lei de Lambert-Beer e interferência resultante da presença no leite de componentes secundários (Biggs et al., 1987).

A precisão e a acurácia de resultados instrumentais de teores em gordura do leite obtidos por EIVM são afetados significativamente pela dispersão da radiação causada pelos glóbulos de gordura, de modo que o processo de homogeneização assume importância no processo. Outro fator físico é o comprimento de onda da radiação, que deve ser mantido no intervalo de  $\pm 0,002 \mu\text{m}$  em relação ao comprimento de onda empregado (Biggs, 1972).

A variação na composição química da gordura afeta a acurácia de sua determinação por EIVM. Considerando que a maior parte da gordura natural consiste em triacilgliceróis, que estes variam de peso molecular em função do tamanho da cadeia alifática dos ácidos graxos neles presentes, e que a medição da absorvância com a radiação de comprimento de onda  $5,7 \mu\text{m}$  é decorrente da absorção pelos grupamentos carbonila das ligações éster dos triacilgliceróis (três por molécula), a absorvância neste comprimento de onda tem uma relação melhor com o número de moléculas que com a massa de gordura presente na amostra (Biggs, 1972; Mills & van de Voort, 1982; Biggs et al., 1987), sendo portanto altamente influenciada pelo peso molecular dos ácidos graxos presentes (Mills & van de Voort, 1982). Conseqüentemente, variações no peso molecular médio dos constituintes da gordura do leite levam a erro de medição (Biggs, 1972; Mills & van de Voort, 1982; Biggs et al., 1987) e são a razão principal da não correspondência entre métodos químicos de análise e o método de EIVM (Van de Voort, 1980). No caso de leites de vacas com suplementação alimentar em lipídios protegidos, ocorre um aumento na participação de ácidos

graxos de maior peso molecular, tais como ácido linoléico (C18), ácido oléico (C18) e ácido esteárico (C18) e uma diminuição na participação de ácido palmítico (C16) e outros ácidos graxos de menor peso molecular, o que leva a uma interferência grande nas medições baseadas em comprimentos de onda de  $5,73 \mu\text{m}$ , e por isso, a determinação de gordura em comprimento de onda de  $3,4 - 3,5 \mu\text{m}$  baseada na absorção pelas ligações carbono-hidrogênio da parte alifática dos ácidos graxos tem sido recomendada (Mills & van de Voort, 1982), o que teoricamente leva a uma melhor relação entre massa de ácido graxo e sinal (Biggs et al., 1987). Neste comprimento de onda alternativo, existe redução da absorvância do grupo  $-\text{CH}_2-$  adjacente a um grupamento carbonila ( $\text{C}=\text{O}$ ) ou adjacente a uma ligação dupla entre carbonos (insaturação) e os grupamentos  $-\text{CH}_2-$  do glicerol não apresentam absorvância quando o carbono participa da ligação éster dos triacilgliceróis (Mills & van de Voort, 1982; Biggs et al., 1987), o que torna a absorção amplamente relacionada ao tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos envolvidos. Por outro lado, outros componentes do leite que apresentam grupamentos  $-\text{CH}_2-$ , interferem nas medições da gordura por EIVM (Biggs et al., 1987). Entretanto, comparações entre determinações de gordura nos comprimentos de onda  $3,5$  e  $5,7 \mu\text{m}$  mostraram consistentemente acurácia melhor a  $3,5 \mu\text{m}$ , indicando que as medições neste comprimento de onda são menos influenciadas por variações composicionais (Biggs et al., 1987). Barbano & Clark (1989) relatam que, na determinação da gordura do leite, a experiência prática de o uso do comprimento de onda de  $5,723 \mu\text{m}$  (comumente chamado A), em combinação com o comprimento de onda de  $3,48 \mu\text{m}$ , proporcionar uma concordância melhor entre os resultados analíticos obtidos por EIVM e os resultados obtidos por métodos químicos de referência.

Existe uma grande proporcionalidade entre as medições das proteínas do leite obtidas por espectrometria no infravermelho e a massa delas, pois a composição em aminoácidos das proteínas do leite é relativamente constante. Se ocorrer variação na composição de aminoácidos e a massa molar da proteína for maior que a média, este fato será subestimado tanto pelo método de referência Kjeldahl quanto pela

EIVM. Por outro lado, a variação no teor em NNP do leite leva a um erro analítico, pois estes não são determinados pelo método espectrométrico (Biggs et al., 1987), a despeito de Grappin (1992) fazer referência à interferência significativa da uréia (grande parte do NNP) no sinal do método espectrométrico. De acordo com Ribadeau-Dumas & Grappin (1989), a variação na proporção de NNP e a presença de ácidos carboxílicos são os maiores responsáveis pela perda de acurácia da determinação de proteína. Segundo IDF (2000), o NNP quase não contribui para o sinal instrumental no comprimento de onda em que a proteína é medida. Entretanto Grappin (1992) descreve a interferência da uréia, grande parte do NNP, nas determinações por EIVM, apresentando absorção de radiação no comprimento de onda da radiação que é absorvida pela proteína, e evidenciado por meio da Figura 4. Quando uma calibração é feita em base de proteína, assume-se que o teor em NNP das amostras de leite usadas para calibrar o equipamento é constante de amostra para amostra dentro de um lote de amostras e de lotes para lotes. Se o NNP variar entre amostras de um mesmo lote de amostras de calibração, distorções no ajuste da inclinação do sinal corrigido no canal de proteína causa um grande desvio-padrão das diferenças entre os resultados de NT pelo método de referência de Kjeldahl (MRK) e a EIVM. A média das diferenças interlaboratoriais e o desvio-padrão dessas diferenças em teor em proteína são aumentados quando há variação no NNP dentro e entre conjuntos de amostras de calibração empregados pelos diferentes laboratórios quando a calibração é baseada em NT (proteína bruta). Neste caso, é importante que a média do teor em NNP dos leites empregados na calibração seja o máximo compatível com a média populacional e que a variação da razão NNP/NT de amostra para amostra dentro do mesmo conjunto de amostras de calibração seja a menor possível.

Em relação ao desvio na acurácia entre o método de referência e o método de EIVM, o hidrogenofosfato de potássio em sua concentração presente no leite apresenta absorção interferente na quantificação da lactose, e o citrato de sódio ou potássio apresenta absorção interferente na quantificação da proteína (Biggs et al., 1987). Segundo Biggs

et al. (1987) citando Gaudillère & Grappin (1982), variações no teor em citrato que ocorrem naturalmente em leites de fêmeas amostradas individualmente respondem por 40 a 60% das diferenças entre o método de EIVM e o MRK para PV. Aumento da concentração do citrato em 0,01% absoluto, aumenta a leitura de proteína em 0,075 g/100g (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989).

O efeito da lipólise sobre as determinações dos componentes do leite por EIVM afeta as determinações tanto em comprimentos de onda de 3,4 – 3,5  $\mu\text{m}$ , quanto de 5,7  $\mu\text{m}$ , e suas causas não são claras, mas supõe-se que seja decorrente da ligação da água aos ácidos graxos liberados na lipólise ou em razão da formação de dímeros de ácidos graxos. Adicionalmente, o rompimento das ligações éster permite que os grupamentos  $-\text{CH}-$  do glicerol passem a absorver radiação infravermelha (Biggs et al., 1987). Os resultados de proteína aumentam levemente, com resultados obtidos experimentalmente de 0,01% absoluto/meq ácido graxo livre (Biggs et al., 1987) e 0,023% absoluto de proteína por microequivalente de ácido graxo livre por mililitro de leite (Van de Voort et al., 1987), decorrente das formas ionizadas dos ácidos graxos que produzem uma banda intensa a 6,50  $\mu\text{m}$  (Van de Voort et al., 1987 citando Bellamy, L. J. 1975). Segundo IDF (2000), um aumento do índice de lipólise em 1 miliequivalente por 100 g de gordura muda o sinal do instrumento em +0,013% no comprimento de onda de 6,5  $\mu\text{m}$  para uma amostra contendo 3,0% m/m de proteína. Os teores em gordura decrescem na proporção de 0,033% absoluto a cada microequivalente por mililitro de ácido graxo livre formado (Robertson et al. 1981). Segundo IDF (2000), um aumento do índice de lipólise em 1 miliequivalente por 100 g de gordura muda o sinal do instrumento em -0,022% no comprimento de onda de 5,7  $\mu\text{m}$  (filtro A) e em +0,006% a 3,5  $\mu\text{m}$  (filtro B) em uma amostra contendo 3,5% m/m de gordura. Resultados obtidos por Van de Voort et al. (1987) mostraram um decréscimo de 0,031% absoluto de gordura a cada microequivalente por mililitro de ácido graxo livre formado. Van de Voort et al., 1987 relatam discrepância existente entre o método químico de análise de gordura e o método de EIVM causado por lipólise decorrente de variações de tempo entre coleta e

análise e temperatura inadequada de transporte das amostras de leite coletadas.

No primeiro espectrômetro infravermelho adotado para o propósito de análise de leite em alta escala (IRMA<sup>®</sup>), observou-se que o processo de homogeneização até a pressão de 3000 psi reduziu o sinal para a gordura, quando comparado àquele obtido com leite cru (Biggs, 1967), o que foi demonstrado também em experimento de Robertson et al. (1981), com redução de 0,103% e 0,110% absoluto no teor em gordura do grupo de amostras de leite submetidas à homogeneização a 100 Kg/cm<sup>2</sup>, quando comparados a um grupo controle de amostras não submetidas à homogeneização. A homogeneização aumenta a acurácia dos resultados obtidos por EIVM por reduzir a dispersão causada pelos glóbulos de gordura maiores (Barbano & Clarck, 1989). Resultados obtidos experimentalmente por Rémillard et al. (1993), comparando resultados de gordura de leite cru analisados por método químico de referência com resultados de gordura analisados por EIVM de leites submetidos a quatro processos de homogeneização diferentes mostraram que a homogeneização diminui os resultados de gordura obtidos por EIVM quando comparados com o método químico de referência. É condição ideal em EIVM que o tamanho das partículas seja menor que o comprimento de onda da radiação incidente para se obter um melhor espectro de absorção. Caso contrário, ocorre refração e reflexão da radiação. Os glóbulos de gordura passam a funcionar como lentes minúsculas que refratam a radiação que passa através da cubeta. O detector não podendo diferenciar entre a luz perdida, refratada e a realmente absorvida pelo componente, interpreta tudo como absorção e o efeito é incluído no resultado da medição (Van de Voort, 1980).

A fermentação da lactose provoca a formação de ácidos carboxílicos. Conseqüentemente, o sinal referente à lactose diminui. Os ácidos carboxílicos formados absorvem a aproximadamente 5,85  $\mu\text{m}$  no estado não dissociado, mas no leite normal, com pH 6,8, a interferência na leitura em comprimento de onda de 5,7  $\mu\text{m}$  não é grande. A interferência principal é nos comprimentos de onda de 3,4 – 3,5  $\mu\text{m}$ , de quantificação da gordura (Biggs et al., 1987). Adicionalmente na forma dissociada,

os sais dos ácidos carboxílicos absorvem no comprimento de onda de 6,5  $\mu\text{m}$ , de quantificação da proteína, aumentando o sinal. Em experimentos conduzidos por Robertson et al. (1981) com amostras de leite adicionadas de culturas lácticas, demonstrou-se a redução do teor em lactose decorrente do processo fermentativo de 5,049% a 4,715% com a queda do pH de 6,5 para 5,48.

De um modo geral, espectrômetros calibrados com amostras de leite representativo de rebanhos têm acurácia prejudicada quando empregado na análise de leite de animais amostrados individualmente, em razão da maior variabilidade composicional existente nos últimos (Van de Voort, 1980). Walstra (1992) refere-se à necessidade de se promover a calibração dos espectrômetros de infravermelho com amostras que, em relação aos componentes, representem a média esperada para as amostras de leite analisadas na rotina.

Os fatores biológicos que causam erros sistemáticos na EIVM originam-se de alterações em características físicas e químicas dos constituintes individuais do leite (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989). O leite de certas raças pode apresentar em média teores maiores em certos constituintes que aqueles de leites normais, levando a certos erros na medição. Neste caso, a acurácia da determinação também pode ser afetada quando se tem variação significativa na composição dos ácidos graxos, na composição do leite e na proporção de NNP em relação ao nitrogênio protéico (Biggs et al., 1987). Tem-se como exemplo a raça Jersey que apresenta leite com composição química diferente das demais, com especial atenção ao NNP (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989).

O estágio de lactação afeta sobretudo as medições dependentes da radiação de comprimento de onda de 5,7  $\mu\text{m}$ , no qual a gordura é quantificada. Desvios associados à alimentação e estação reportam-se também à alteração da composição do leite com especial atenção ao aumento de ácidos graxos insaturados na gordura e alteração do peso molecular médio da gordura do leite (Biggs et al., 1987). Estudos de Dunkley et al. (1976), baseados em estudos anteriores que relatavam o aumento da percentagem de lipídios no leite quando as vacas eram alimentadas com rações

suplementadas com estes componentes, demonstraram que as diferenças entre resultados analíticos de gordura de leite obtidos pelo método de referência e por EIVM eram maiores em amostras de animais que receberam ração suplementada de lipídio que em amostras de animais alimentados com ração convencional, revelando o primeiro grupo de animais um teor mais baixo em gordura pelo método de EIVM. Esta alteração foi atribuída ao aumento do peso molecular médio dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis, fato este significativo nas determinações baseadas no comprimento de onda de 5,73  $\mu\text{m}$  (grupo carbonila da ligação éster).

Pesquisas conduzidas por Eastridge & Palmquist (1989) mostraram que o estágio de lactação pode ter um efeito maior no peso molecular dos ácidos graxos da gordura do leite que alterações da dieta por enriquecimento em gordura e fatores interferentes relacionados ao manejo. Consequentemente, o estágio de lactação é um fator mais importante que deve ser levado em consideração na avaliação das causas de perda da acurácia das determinações espectrométricas no infravermelho da gordura do leite

Em relação à influência da dieta, a produção de leite aumenta 3 a 8% quando é consumida dieta enriquecida com 5% de gordura adicionada na ração e fornecendo-se ração rica em gordura para vacas quase sempre se observou o aumento do teor em ácidos graxos de cadeia longa, aumentando o peso molecular médio da gordura do leite (Palmquist & Jenkins, 1979).

Relacionando a mudança da percentagem de insaturação da gordura do leite com a diferença de resultados obtidos pelos métodos de EIVM e Mojonier (químico), Stegeman et al. (1991) encontraram uma relação linear com inclinação de 0,010 e intercepto de -0,013 e r de 0,997.

Com os equipamentos modernos, excelentes valores de repetitividade de 0,02 g/100 g para a gordura, proteína e lactose, expressos por meio de seus desvios-padrão, são facilmente obtidos. O desvio-padrão da acurácia varia de 0,08 g/100g para leites de vacas amostrados individualmente, a 0,04 g/100g para leites de rebanho (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989). A norma International IDF Standard 141C:2000

(IDF, 2000) determina que a repetitividade dos equipamentos analisadores de leite por EIVM não seja maior que 0,04% para cada componente em mais que 5% dos casos. Estabelece também como um máximo para o valor da média das diferenças entre resultados instrumentais e obtidos pelo método de referência (sendo n o número de análises) de  $0,14\sqrt{n}$  para leites amostrados de rebanhos (com desvio-padrão máximo da acurácia de 0,07%) e de  $0,2\sqrt{n}$  para leite individualmente amostrado de vacas (com desvio-padrão máximo da acurácia de 0,1%).

O primeiro equipamento que adaptou a técnica de espectrometria de absorção molecular no infravermelho para análise de leite foi o Infrared Milk Analyzer, popularizado sob a sigla IRMA (Goulden, 1967; Grappin & Ribadeau-Dumas, 1992). Atualmente no Brasil, laboratórios credenciados pelo MAPA que constituem a RBQL (Brasil, 2002b) estão dotados de equipamentos de modelos Milkoscan® (Foss A/S, Hillerød, Dinamarca) e Bentley® (Bentley Instruments Inc., Chaska, Estados Unidos da América).

2.3.2.2 Avaliação da acurácia entre o método de referência e o método indireto por EIVM (segundo IDF)

A FIL, por meio da norma International IDF Standard 128A:1999 (IDF, 1999) determina uma série de protocolos analíticos para a determinação da acurácia total de métodos indiretos frente aos métodos diretos ou de referência e utiliza termos e definições recomendados pela norma da International Standard Organization ISO 3534 (ISO, 1993a e b) para parâmetros de avaliação.

As seguintes definições são estabelecidas por IDF (1999):

a) Valor verdadeiro de uma determinação: o valor que caracteriza perfeitamente a quantidade definida nas condições que existem quando esta quantidade é considerada. É um valor ideal que poderia ser obtido somente quando todas as causas de erro de medição fossem eliminadas e a população fosse infinita;

b) Método de referência: um método internacionalmente reconhecido por especialistas ou por concordância entre as partes, que produz o valor verdadeiro ou valor designado da quantidade do parâmetro em mensuração;

c) Método indireto: método que não mensura diretamente o componente objeto da mensuração, mas uma ou mais quantidades ou propriedades que são funcionalmente relacionadas ao componente. O sinal deve ser relacionado a valores quantitativos conhecidos ou valores verdadeiros do componente, obtidos por materiais de referência ou instrumentos, ou mais freqüentemente, empregando-se um método de referência;

d) Acurácia total: grau de confiança que se atribui ao valor de uma medição, ou a extensão de sua exatidão. É um índice que indica a quantidade de erro envolvido, e é comumente expresso como o erro associado ao método usado e calculado sob condições convenientes. Quando se realiza uma medição ( $m_i$ ) de um determinado parâmetro com um determinado método de análise, o valor obtido é sempre uma estimativa de seu valor verdadeiro ( $\mu$ ). O erro do método é dado pela diferença  $m_i - \mu$ . A acurácia total do método é melhor quanto menor é a diferença  $m_i - \mu$ . Esta diferença depende das principais características analíticas do método: precisão, acurácia da média, sensibilidade e limite de detecção do procedimento analítico;

e) Precisão: nível de concordância entre resultados obtidos por um mesmo método quando aplicados a materiais idênticos sob condições fixas. A precisão se divide em repetitividade e reprodutibilidade.

f) Repetitividade ( $r$ ): valor abaixo do qual a diferença absoluta entre os resultados de duas simples determinações, obtidos com o mesmo método em materiais idênticos, sob as mesmas condições (mesmos aparatos, operador, laboratório e em rápida sucessão), é esperada com uma probabilidade determinada (por exemplo 95%);

g) Reprodutibilidade ( $R$ ): valor abaixo do qual a diferença absoluta entre os resultados de duas simples determinações, obtidos em materiais idênticos obtidos sob diferentes condições

(diferentes operadores, aparatos, laboratórios e/ou diferentes tempos) é esperada com uma probabilidade determinada (por exemplo 95%);

h) Acurácia da média: nível de concordância entre o valor verdadeiro e a média de resultados obtida a partir da realização de várias medições com o método indireto em condições de repetitividade, de modo a minimizar erros aleatórios de precisão. A acurácia da média é constituída por dois componentes: exatidão da calibração e acurácia propriamente ditas. É representada na Figura 16 como  $(\bar{x}_i - \bar{y}_i)$ , sendo  $\bar{x}_i$  a média de determinações do componente S realizadas na amostra com o método indireto e  $\bar{y}_i$  o valor verdadeiro do componente S na amostra;

i) Exatidão da calibração: nível de concordância a cada nível quantitativo do parâmetro analisado, entre a média de várias determinações com o método indireto em uma mesma amostra e a média estimada do valor verdadeiro do método de referência obtido pela equação de regressão. É representada na Figura 16 como  $(\bar{x}_i - \hat{y})$ , sendo  $\hat{y}$  a média estimada da quantidade do componente S na amostra relativa ao método referência, obtida a partir da equação de regressão;

j) Acurácia: nível de concordância entre a média estimada da quantidade do componente S na amostra relativa ao método referência (obtida a partir da equação de regressão frente aos resultados obtidos pelo método indireto) e o valor verdadeiro da quantidade do parâmetro analisado na amostra, desde que a calibração seja exata; Na Figura 16 é representada por  $(\hat{y} - \bar{y}_i)$ . É o maior componente da acurácia da média, caracterizando a importância dos erros sistemáticos de um método indireto;

k) Acurácia total: é o nível de concordância entre o resultado obtido em uma única determinação do componente S na amostra em análise pelo método indireto e o seu valor verdadeiro na amostra. Na Figura 16 é representada por  $(x_i - \bar{y}_i)$ , sendo  $x_i$  o resultado obtido em uma única determinação do componente S na amostra em análise;

l) Calibração do instrumento: refere-se ao ajuste do sinal instrumental de modo que, a cada nível do componente em quantificação, a média de resultados individuais dados pelo instrumento seja o mais próximo do valor verdadeiro da concentração do componente.

A acurácia total de uma medição por método indireto (por exemplo, EIVM), pode ser

definida como a soma do erro proporcionada pela repetitividade do método, o erro decorrente da exatidão da calibração e a acurácia propriamente dita, e é matematicamente expressa pela equação 8. A Figura 16 reflete graficamente como cada fonte de erro participa em proporcionar o distanciamento do valor de uma única medição do valor verdadeiro referente àquela medição.

Equação 8:

$$(x_i - \bar{y}_i) = (x_i - \bar{x}_i) + \begin{cases} (\bar{x}_i - \bar{y}_i) \\ \text{acurácia da média} \\ (\bar{x}_i - \hat{y}) + (\hat{y} - \bar{y}_i) \\ \text{exatidão da calibração} \quad \text{acurácia} \\ \text{calibração} \end{cases}$$

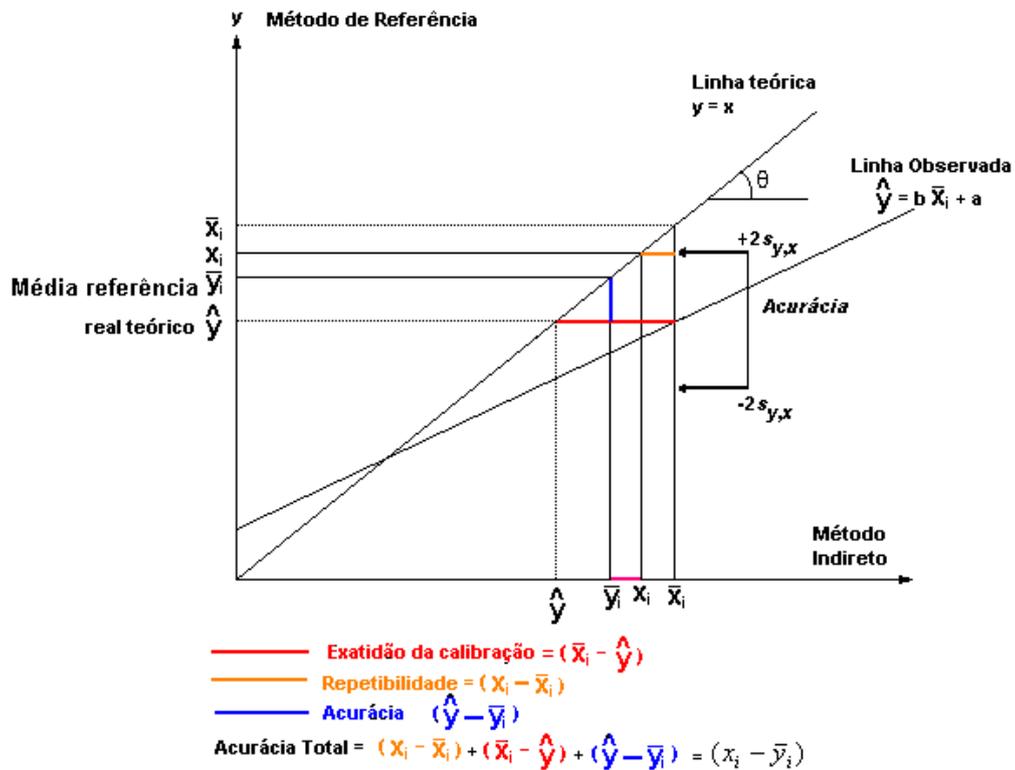


Figura 16. Decomposição da acurácia total de um método indireto em repetitividade e acurácia da média (esta decomposta em exatidão da calibração e acurácia), referente à determinação do componente S na amostra. Fonte: IDF (2000).

A avaliação intralaboratorial de um método indireto em relação à sua precisão e acurácia segue relações matemáticas que fornecem parâmetros importantes na avaliação intrínseca do desempenho de medições realizadas pelo laboratório por um método indireto e a comparação com o método de referência. Estas relações e o cálculo matemático destes parâmetros são amplamente abordados por IDF (1999). São eles:

a) Intrínsecos respectivamente aos métodos de referência e indireto:

- Desvio-padrão da repetitividade;
- Desvio-padrão da reprodutibilidade.

b) Parâmetros resultantes da análise de regressão da associação dos resultados obtidos pelo método de referência e indireto:

- Inclinação (slope),
- Intercepto,
- Desvio-padrão residual da regressão,
- Equação de regressão;
- Comparação estatística da inclinação b

da referida equação de regressão com o valor teórico igual a 1,

- Comparação estatística do intercepto a da equação de regressão com o valor teórico igual a zero,
- Comparação de médias dos resultados obtidos pelos métodos indireto e de referência,
- Avaliação se a média das diferenças entre os resultados obtidos pelos métodos indireto e direto (*bias* médio) se encontra dentro de limites estatísticos aceitáveis.

### 2.3.2.3 Indicadores de desempenho dos equipamentos EIVM

Os valores dos indicadores de desempenho de repetitividade e acurácia dos analisadores de componentes do leite por EIVM são definidos pela AOAC (Bradley Jr., 2000) na descrição do método 972.16 e pela FIL por meio da norma International IDF Standard 141C:2000 (IDF, 2000) são os demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros de avaliação da performance dos equipamentos de análise de PB por EIVM em leite, quanto a repetitividade e acurácia, segundo a AOAC (Bradley Jr., 2000) e FIL (IDF, 2000).

Parâmetros	AOAC				IDF
	Gordura	Proteína	Lactose	Sólidos totais	Todos parâmetros
Desvio-padrão da diferença entre duplicatas	≤ 0,02 %	≤ 0,02 %	≤ 0,02 %	≤ 0,04 %	≤ 0,02 %*
Diferença absoluta entre duplicatas	* - *	* - *	* - *	* - *	≤ 0,06 %
Média das diferenças absolutas entre duplicatas	≤ 0,02 %	≤ 0,02 %	≤ 0,02 %	≤ 0,03 %	* - *
Desvio-padrão da diferença entre os métodos de referência (Kjeldahl) e EIVM	≤ 0,06 %	≤ 0,06 %	≤ 0,06 %	≤ 0,12 %	≤ 0,07 %
Média das diferenças absolutas entre os métodos de referência (Kjeldahl) e EIVM	≤ 0,05 %	≤ 0,05 %	≤ 0,05 %	≤ 0,09 %	* - *
Média das diferenças entre os métodos de referência (Kjeldahl) e EIVM (não absolutas)	* - *	* - *	* - *	* - *	≤ 0,14 / $\sqrt{2}$

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

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

## 2.4 PAGAMENTO DO LEITE POR QUALIDADE

Monardes (2004) citando e aplicando preceitos de Valfrè & Moretti (1997) aos produtos lácteos, conceitua qualidade total como qualidade higiênica (inocuidade), composicional, nutricional, sensorial, tecnológica (aptidão ao processamento). O leite é um conjunto nutricional preparado pela natureza que não contém só proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais de altíssima disponibilidade biológica, mas também outras substâncias sobre as quais se começa hoje a contar com evidências de efeitos sobre a saúde do consumidor (Monardes, 2004). O leite é um dos alimentos de maior importância para a sociedade humana e em função de sua composição equilibrada, o leite figura entre os alimentos essenciais dos seguimentos mais frágeis da sociedade: as crianças, as gestantes e os idosos (Dürr, 2004). Isto os torna os principais clientes finais da cadeia do leite, e por isso, suas exigências de ordem econômica, tecnológica, sanitária, nutricional e moral são premissas a serem atendidas por todos os seguimentos anteriores, desde a produção da matéria-prima leite cru, até os beneficiadores e industrializadores dos produtos lácteos. Diz-se de exigências de ordem econômica porque o cliente tem influência nas definições de lucro máximo conferido por um produto lácteo ao seu industrializador ou beneficiador; de ordem tecnológica porque os estabelecimentos transformadores se vêem obrigados a manter condições relacionadas ao conhecimento das variáveis do processo produtivo, ao emprego de equipamentos de ponta e o emprego de processos adequados; de ordem sanitária pela necessidade de os clientes consumirem alimentos inócuos e inocuidade dos lácteos representa a responsabilidade da cadeia do leite para com a sociedade e compromisso com a saúde da população (Monardes, 2004); de ordem nutricional em razão das necessidades específicas de cada grupo de consumidores; e finalmente de ordem moral porque os produtos devem atender requisitos mínimos de qualidade previstos em normas e leis e serem isentos de fraudes de ordem econômica. Os conceitos básicos de prevenção e controle da contaminação alimentar e das doenças transmitidas através dos alimentos sugerem, geralmente, melhorar a qualidade higiênica dos

alimentos crus aplicando boas práticas de produção e criação e processamento (Monardes, 2004).

Dürr (2004) ressalta a necessidade de a qualidade do leite e dos produtos lácteos advir de procedimentos adequados ainda nos estabelecimentos rurais de produção da matéria-prima, o leite *in natura*, com a ordenha higiênica de vacas sadias e conservação do produto a baixas temperaturas e Portugal (2003) faz referência à presença indevida de resíduos de antibióticos no leite resultante das terapias de tratamento da mastite de vacas leiteiras.

O transporte até o posto de coleta ou fábrica de laticínios, o beneficiamento e a transformação, o transporte do produto acabado, as condições de comercialização e o produto no seu local de consumo final são etapas que justificam a responsabilidade e compromisso de todos os envolvidos no processo da cadeia do leite em se alcançar a qualidade total (Meirelles, 2004). Ainda Meirelles (2004), as estratégias de alcance da qualidade total passam por etapas cronológicas e sincronizadas de diagnóstico da situação, estabelecimento de objetivos a serem alcançados, definição de tempo realístico de alcance dos objetivos, definição de procedimentos para alcance dos objetivos e finalmente, a estratégia de implementação.

O setor lácteo brasileiro, a despeito de alterações significativas ocorridas a partir da metade da década de 90, com especial atenção à refrigeração do leite na propriedade rural e seu transporte a granel aos estabelecimentos beneficiadores e industrializadores, lida com um grande desafio: incentivar a melhoria da qualidade em parâmetros mais refinados, tais como composição, valor nutritivo e sanitário, em um sistema que ainda vive sintomas de excedente e entressafra no mesmo ano, no qual há alterações dos parâmetros básicos de valorização do produto em base do volume produzido.

Laranja (2001) faz referência à complexidade de preços praticada no Brasil após a liberação do controle de leite pelo governo a partir de 1991, com variação significativa de preço entre regiões e até mesmo micro-regiões. Meirelles (2004), refere-se ao fato de uma maior produção não ser sinônimo de maior renda se o efeito for

o de gerar oferta excedente e ressalta a necessidade de um contínuo aumento da produtividade leiteira, ainda muito baixa.

A sustentabilidade do agronegócio do leite no Brasil depende da reorganização dos diversos segmentos da cadeia produtiva, sendo necessário o incentivo ao desenvolvimento de tecnologias e pesquisa aplicadas, contribuindo efetivamente para os diferentes sistemas de produção (Portugal, 2003).

Em relação à composição do leite, Monardes (2004) e Ibarra (2004) referem-se à iniciativa original de os países valorizarem a gordura. A tendência atual é de se valorizar mais a proteína como reflexo de pressões de nutricionistas, consumidores e fabricantes de queijos, devendo os produtores buscar o aumento da concentração deste componente do leite; os processadores remunerar o esforço dos produtores; e os consumidores aceitar pagar o justo preço pelo esforço que vai de encontro às suas necessidades (Monardes, 2004). No final dos anos 60 iniciaram-se as discussões de pagamento por qualidade em bases de SNG e proteína na Suíça (Zurborg, 1992). Desde o ano de 1969, a França realiza pagamento por qualidade em bases de teor em gordura e PB do leite (passando para PV em 1974), valorizando inicialmente mais a fração lipídica em relação à protéica numa proporção de 74:26, com uma inversão de valores em 1976 para 34:66 (Grappin, 1992). Ibarra (2004) relata a inversão do valor da proteína em relação ao valor da gordura ocorrida entre os anos de 1990 e 1996 na Dinamarca, justificado pela aplicação de 40% do leite na fabricação de queijos. Países pioneiros no setor leiteiro como a Dinamarca e Holanda já pagam por qualidade em base no teor em proteína há 30 anos, sendo uma tendência natural para os países preponderantemente produtores de leite em pó, queijos, caseína ou caseinatos o fazerem desta forma (Ibarra, 2004). Entretanto, dados de 1981 coletados em diversos países ainda não demonstravam uma forte relação entre o peso dos componentes na composição do preço do leite e a aplicação do leite (queijo e manteiga) (IDF, 1985).

Mais precisamente, na Holanda o pagamento de proteína pela qualidade iniciou-se em 1955, em razão de as cooperativas perceberem que leites

com o mesmo percentual de gordura apresentavam diferentes rendimentos na produção de queijos, o que foi atribuído ao diferente percentual de proteína (Walstra, 1992).

Levantamentos realizados pela FIL em 1989 em diversos países mostraram diferenças entre os parâmetros de valorização do leite muito diferentes. Alguns ainda baseavam-se em tradição (por exemplo, Austrália), e outros respondiam à necessidade de qualidade dos produtos lácteos (por exemplo, França), outros a uma demanda nutricional (por exemplo, Noruega), além do desestímulo já existente àquela época em se produzir gordura. Nesta época parâmetros composicionais como gordura, proteína, SNG geravam bonificações ou descontos, enquanto água adicionada, resíduos de antibióticos, contagem de microrganismos e de células somáticas levavam a penalidades, inclusive não recebimento do leite (IDF, 1991b).

Walstra (1992) faz referência à discussão ocorrida na Holanda entre indústrias e químicos quanto à melhor maneira de expressar proteína se bruta (total) ou verdadeira, inclusive para pagamento por qualidade do leite, permanecendo ao longo do tempo neste caso, a PB (IDF, 2002). Na França, o pagamento por qualidade do leite baseado em teor protéico iniciou-se em 1960, passando a ser em base de proteína e gordura em 1968. Em razão da grande variabilidade do NNP do leite, que interfere na acurácia tanto do MRK quanto no método de EIVM, decidiu-se em 1976 naquele país mudar o pagamento por qualidade em proteína na base de PB para PV (Grappin, 1991).

A produção de leite com alto teor em proteína gera custos adicionais que são recuperados somente com uma aplicação adequada deste leite em produtos que dependem do teor protéico, como é o caso do queijo (Walstra, 1992). Emmons et al. (1990a) referem-se à necessidade incontestável de se estabelecer sistemas de valorização do leite em concordância com a utilização a ele conferida na obtenção de produtos. Na Holanda, com a adoção do sistema de pagamento por qualidade iniciado em 1955, os especialistas em melhoramento animal esperavam obter sucesso na seleção de animais para aumentar o teor em

proteína no leite, o que, todavia não ocorreu. Assim apenas nos anos 80 atingiu-se um percentual de 3,4%, um pouco maior que o original de 3,2%. Todavia, a gordura respondeu bem ao sistema adotado, de modo que no mesmo período, o teor médio em gordura no leite subiu de 3,7% para 4,4% (Walstra, 1992).

Em uma visão mais capitalista de Emmons et al. (1990b), o processador não deve pagar mais que o valor do leite em termos da quantidade de produtos que podem ser produzidos e os produtores devem receber integralmente o valor do leite nos mesmos termos. Assim, o pagamento pela qualidade do leite deve estar bem afinado com o destino do leite, e fórmulas múltiplas devem ser adotadas por região, por unidade processadora e até mesmo por linhas de produção.

Confirmou-se a influência das políticas de PPQ sobre estratégias de melhoramento genético e a alimentação fornecida aos animais (IDF, 1991b). As análises laboratoriais que davam suporte aos programas de PPQ nos países integrantes da FIL eram governamentais, independentes ou ligados a instituições de controle (IDF, 1991b).

Mais recentemente, em um levantamento realizado pela FIL em 2000 entre seus associados, revelaram-se diferenças entre os sistemas de PPQ colocados em prática por eles, mas com uma tendência quase unânime em bonificar a gordura e a proteína. Os parâmetros utilizados podem ser vistos na Tabela 12 (componentes) e Tabela 13 (aspectos higiênico-sanitários) (IDF, 2002).

As quatro categorias de qualidade higiênico-sanitária da Dinamarca são instrumentos de bonificação e penalização, sendo a primeira bonificada em 2,5%, a segunda recebendo o preço básico e as terceira e quarta apresentando deduções de 2,5% e 5,0% respectivamente. Mantendo-se na quarta categoria sucessivamente, um produtor pode ser penalizado em até 50% do valor do leite. A proteína e a gordura são valorizadas em uma base de unidade monetária por quilograma do componente (Ibarra, 2004).

Na província canadense do Québec, adota-se um sistema em que a contribuição de cada componente no rendimento dos produtos terminados dita o seu valor (Monardes, 1998).

Tabela 12. Parâmetros de composição empregados pelos diversos países membros da FIL, no ano calendário de 2000, em fórmulas de pagamento pela qualidade do leite cru.

Parâmetros de composição	Países membros da Federação Internacional de Laticínios avaliados																	
	Canadá	Croácia	Argentina	Dinamarca	Bélgica	Grécia	Nova Zelândia	Noruega	França	Estados Unidos	Áustria	Espanha	África do Sul	Suíça	Portugal	Zimbábue	Suécia	Hungria
Gordura	+	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+	+
Proteína total	+	+		+	+		+	+			+	+	+	+	+		+	+
Proteína verdadeira									+	+								
Lactose											+		+					
Lactose e outros sólidos	+									+			+					
Sólidos totais							+										+	
Gordura + proteína				+														
Sólidos não gordurosos		+								+	+							
Outros							+											

Fonte: IDF (2002).

Tabela 13 Classes de qualidade dos parâmetros higiênico-sanitários de contagem de germes/mL e CCS/mL no leite cru de alguns países membros da FIL.

	Categoria	Nova Zelândia	Bélgica	Dinamarca	Estados Unidos	Canadá	Argentina
Germes totais/mL	Classe I	< 100	< 100	≤ 30	-	-	< 100
	Classe II	100 a 200	1 mês > 100	30 a 100	-	-	100 a 300
	Classe III	200 a 500	2 meses* > 100	100 a 300	-	-	300 a 500
	Classe IV	500 a 1.000	3 meses* > 100	> 300	-	-	> 500
	Classe V	> 1.000	4 meses* > 100	-	-	-	-
	Rejeição	-	4 meses* > 100	-	> 100	> 100	-
Células somáticas/mL	Classe I	< 400	< 400	≤ 300		≤ 500	< 200
	Classe II	400 a 500	1 mês* > 400	300 a 400			200 a 400
	Classe III	500 a 600	2 meses* > 400	400 a 600			400 a 600
	Classe IV	> 600	3 meses* > 400	> 600			> 600
	Classe V		4 meses* > 400				
	Rejeição		4 meses* > 400		> 750	> 4 penalidades	

Nota: (\*) meses em sucessão. Os valores estão expressos em 1.000 germes/mL e 1.000 células/mL. A notação original “germe” do autor não esclarece uma utilização da contagem bacteriana total (CBT) por citometria de fluxo ou uma correspondência desta à contagem padrão em placa, reportando-se à norma International IDF Standard 100B:1991.

Fonte: IDF (2002).

Na Nova Zelândia, avaliando-se condições higiênico-sanitárias, se paga o preço básico (classe I), sobre o qual impõem-se somente deduções (classes II a IV) e para componentes, o sistema de pagamento por qualidade baseia-se em teores diferenciados em gordura e proteína. O Uruguai, em função de uma tendência de se firmar como exportador de leite em pó e queijo, adotou um sistema de pagamento baseado em teor protéico e em gordura a partir de 1992 (Ibarra, 2004). Nos Estados Unidos, a legislação restringe à aceitação contagens superiores a 100.000 microrganismos (em UFC por mililitro) em leite amostrado individualmente por produtor, a 300.000 microrganismos (em UFC por mililitro) em leite amostrado de uma mistura de leites de vários produtores e a 750.000 células somáticas por mililitro. Este padrão de CCS é superior ao adotado pela Comunidade Econômica Européia, mas acredita-se que este valor seja adequado para garantir uma segurança alimentar (Philpot, 1998).

No Brasil, as tendências mostram uma rejeição crescente a produtos gordurosos, especialmente gordura saturada de origem animal, o que tem

levado a queda do valor da gordura láctea paga aos produtores. Nos anos de 1994 e 1998, o teor em gordura constava como sendo o terceiro parâmetro mais utilizado na composição do leite em bases de qualidade (Laranja, 2001). Analisando-se o fato, naquela época havia uma restrição muito grande proporcionada pela falta de ferramentas de diagnóstico da situação composicional do leite, sobretudo em termos de proteína e sólidos totais. A RBQL, instituída pela Instrução Normativa nº 37/2002 (Brasil, 2002b), com atribuições de realização de análises laboratoriais de fiscalização em amostras de leite cru, coletadas em propriedades rurais e em estabelecimentos responsáveis por sua conservação e/ou beneficiamento. Esta rede de laboratórios é dotada de EIM de aplicação em análise dos principais componentes do leite, como proteína, lactose, gordura e sólidos totais ou SNG, além de equipamentos de contagem de células somáticas e de bactérias totais pelo método instrumental indireto de citometria de fluxo, todos com alta capacidade analítica. A Instrução Normativa nº 59/2002 (Brasil, 2002c) instituiu como base operacional inicial da RBQL a Clínica do Leite, da Escola Superior de

Agricultura Luiz de Queiroz (Universidade de São Paulo), o Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros da Universidade de Passo Fundo (UPF) – RS, o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG, o Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – MG, o Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa – PR, o Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros de Pernambuco da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – PE e o Laboratório de Qualidade do Leite do Centro de Pesquisa de Alimentos da Universidade Federal de Goiás (UFG), estes na condição de Laboratórios Credenciados, e o Laboratório Nacional Agropecuário em Pedro Leopoldo (LANAGRO/MG) da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, este como Laboratório Oficial de Referência (Brasil, 2002c). As análises realizadas pela RBQL podem ser empregadas para fins de fiscalização ou de sistemas de pagamento por qualidade definidos por estabelecimentos processadores.

As tendências de consumo da população brasileira deve ser sempre levada em conta, porque o mercado potencial do país em termos de consumo de lácteos é muito grande. Monardes (2004) ressalta a tendência de o setor leiteiro continuar localizado, com a maioria dos produtos sendo consumido no próprio país, a exemplo do que acontece no mundo. O Brasil vêm experimentando uma exportação crescente predominantemente de produtos lácteos concentrados e desidratados (MAPA, 2006). Dados da utilização em níveis mundiais de leite apontam 30% para a fabricação de queijo e 15% para a fabricação de leite em pó (Ibarra, 2004)

Para atuar de modo competitivo nos mercados internacionais, Martins et al. (2004) ressaltam a necessidade de a cadeia láctea nacional elevar a produtividade da matéria-prima, incluindo-se neste raciocínio a necessidade de melhorar a sua qualidade, permitindo maiores rendimentos industriais e maior tempo de vida de prateleira dos produtos. Martins et al. (2004) citam quatro obstáculos a serem vencidos em se reportando ao PPQ no Brasil: mudança na estrutura

produtiva para produzir leite de elevado padrão higiênico-sanitário com mais gordura e proteína; necessidade de melhoria da estrutura de laboratórios de análise; aplicação de tecnologia na propriedade para atender as novas exigências e demandas; necessidade de nivelamento financeiro e de conhecimentos. O sistema de PPQ, a exemplo de outros países que já se encontram em um *status* tecnológico mais avançado, deve ser implementado em etapas. Ibarra (2004) afirma a necessidade de compilar dados de parâmetros de qualidade por um período de no mínimo um ano, definir os objetivos a serem alcançados com a aplicação do sistema de PPQ, escolher em seguida o sistema de pagamento, realizar a divulgação entre os participantes, aplicar o plano e efetuar ajustes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Determinar o perfil do leite cru refrigerado de propriedades rurais de Minas Gerais quanto aos teores em gordura, proteína, lactose, sólidos não gordurosos e sólidos totais e à contagem de células somáticas e à contagem de microrganismos de crescimento a 30°C/72 horas, indicadores de qualidade do leite usualmente empregados para propósitos de PPQ;
- Avaliar como esses indicadores de qualidade do leite possivelmente interagem entre si;
- Correlacionar esses indicadores de qualidade do leite com produção média diária de leite de diferentes propriedades rurais de Minas Gerais;
- Estabelecer um perfil das propriedades rurais de Minas Gerais quanto ao atendimento dos preceitos de qualidade estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51/2002 do MAPA.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil do leite cru refrigerado de propriedades rurais de Minas Gerais quanto ao teor em NNP, NNP/NT e PV;

Avaliar como esses parâmetros de composição do leite possivelmente interagem entre si e com os demais indicadores de qualidade do leite;

- Avaliar uma possível interferência do NNP nas determinações de teores em PB do leite por EIVM;
- Avaliar o cumprimento dos preceitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51/2002 para os parâmetros de qualidade PB, gordura, SNG, CCS e contagem microbiana a 30°C/72 horas;
- Estabelecer um modelo de predição do teor em PV do leite em função do teor em PB;
- Avaliar as relações entre teores de PB obtidos pelo método de referência (Kjeldahl) e pelo método indireto por EIVM e estabelecer possíveis fontes de variação que afetariam a acurácia;
- Estabelecer a estabilidade do soro de precipitação do leite com ácido tricloroacético ao congelamento por 90 dias na quantificação do teor em NNP do leite;
- Estabelecer a interferência que a adição de uréia pode causar na determinação dos teores em PB do leite obtidos por EIVM (hipótese de fraude).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA, TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS

Neste experimento chamou-se de amostras primárias as 200 amostras de leite cru coletadas no período de agosto a novembro de 2005 diretamente dos tanques de refrigeração representativos de propriedades rurais da região do entorno de Belo Horizonte, com rotas de captação centralizadas nos municípios da região metropolitana de Belo Horizonte, Cristiano Ottoni, Conselheiro Lafete e Piracema. Nas propriedades rurais, as amostras primárias foram coletadas após homogeneização do conteúdo do tanque de refrigeração, e introduzidas em recipiente estéril de polipropileno autoclavável. O procedimento de

coleta da amostra primária seguiu os preceitos da norma International IDF Standard 50C:1995 (IDF, 1995b).

Desde as coletas nas propriedades rurais, as amostras primárias de leite cru foram mantidas sob refrigeração (IDF, 1995b) garantida por recipientes isotérmicos adicionados de gelo reciclável previamente mantidos a uma temperatura não superior a -10°C e em quantidade suficiente para garantir a manutenção das amostras a uma temperatura não superior a 4°C sem congelarem.

Atribuiu-se o nome de amostras secundárias aquelas obtidas por tomada de alíquota a partir das amostras primárias.

No mesmo dia, prepararam-se amostras secundárias para fins de análise de contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas por citometria de fluxo, retirando-se de cada amostra primária uma alíquota de 40 mL, em ambiente estéril proporcionado por chama, para um frasco plástico inerte e estéril, com adição subsequente de 4 gotas de conservante azidiol por frasco, observando-se homogeneização prévia do leite cru contido nos frascos originais. Obtidas as amostras secundárias de leite para análise de contagem bacteriana, seguiram-se os procedimentos de vedação dos frascos e homogeneização do conservante. As amostras secundárias foram devidamente identificadas com rastreamento ao tanque de refrigeração e data de coleta, e então conservadas sob refrigeração a 5-7°C até o momento de análise no Laboratório de Controle da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG). O leite restante à retirada da primeira alíquota de 40 mL, remanescente nos frascos originais, foi mantido sob refrigeração adequada e conduzido ao Laboratório Nacional Agropecuário em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO-MG/MAPA) em recipientes isotérmicos com gelo reciclável previamente mantidos a uma temperatura não superior a -10°C em condições que não permitissem congelamento das amostras.

No momento da segunda amostragem secundária para análise de componentes (gordura, PB, lactose e sólidos totais) por EIVM segundo procedimentos preconizados pela FIL

(IDF, 2000), análise de CCS (IDF, 1995a) e análise de PB e NNP pelo método Kjeldahl (IDF, 1993), cada frasco original contendo amostra de leite cru representativo do tanque de refrigeração da propriedade rural foi aquecido a 20°C e adicionado de uma barra magnética de 37 mm de comprimento e 7 mm de diâmetro. O leite contido nos frascos foi então submetido à agitação magnética sobre um agitador magnético múltiplo Modelo RO 10 Power, Marca IKA – Werke, em posição de agitação nº 8 (em uma escala existente no equipamento variando de 0 a 10) por dois minutos, após o que a velocidade de agitação foi reduzida para a posição nº 5 (agitação leve) e mantida nesta velocidade em todo o processo de obtenção de alíquota para análise por EIVM e CCS e tomada de alíquota para análise de PB por MRK. Os dois procedimentos foram conduzidos em momentos imediatamente subsequentes para garantir que as alíquotas tomadas fossem representativas da amostra original e equivalentes entre si em composição e células somáticas. Para análise de componentes do leite

por EIVM e CCS, de cada frasco original representativo do tanque de refrigeração da propriedade rural foi tomada uma alíquota de 40 mL (amostragem secundária) e introduzida em um frasco plástico inerte e estéril. Adicionou-se a cada um destes frascos de amostragem secundária, um comprimido de conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol), o que garantiu uma concentração de 8 mg/40 mL de leite do componente ativo. Imediatamente os frascos foram identificados e colocados sob refrigeração a 3° - 5°C e freqüentemente homogeneizados até completa dissolução dos comprimidos de conservante, após o que foram conduzidos ao LabUFMG para análise de componentes e CCS sob refrigeração a 3 - 5° C garantida por caixas isotérmicas e gelo reciclável congelado.

O fluxograma de obtenção de amostras primárias e secundárias para condução do experimento é demonstrado por meio da Figura 17.

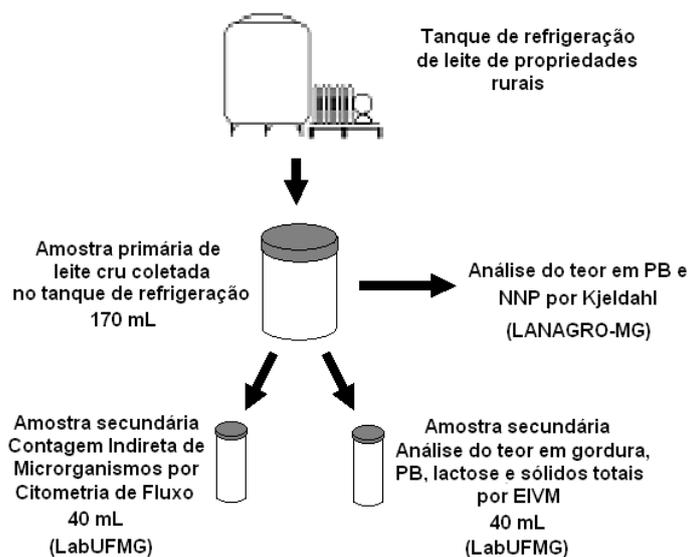


Figura 17. Fluxograma de obtenção das amostras primária e secundária rastreado ao tanque de refrigeração do leite da propriedade rural, para realização das análises previstas no experimento.

#### 4.2 TESTE DE HOMOGENEIDADE DA AMOSTRAGEM SECUNDÁRIA

Com o objetivo de se avaliar a efetividade do processo de homogeneização por agitação

magnética adotado e descrito anteriormente, em garantir a obtenção de réplicas de amostras secundárias equivalentes entre si para determinação espectrométrica de componentes e para determinação de NNP e proteína bruta pelo

método Kjeldahl, foi realizado um teste de homogeneidade. A importância atribuída a este teste deveu-se ao fato de a equivalência entre alíquotas obtidas do processo de homogeneização adotado ser considerado um ponto crítico na comparação entre os métodos de análise de PB por EIVM e por MRK.

Segundo Olivieri (2005), entende-se por homogeneidade, a uniformidade de composição ou estrutura do material, com respeito à propriedade de interesse, sendo que um material é considerado homogêneo para uma determinada propriedade, se o valor desta, obtido por meio de amostras representativas, ficar situado em faixa de incerteza considerada satisfatória e a variabilidade do material deverá ser menor do que a do método de ensaio utilizado.

O teste de homogeneidade consiste em se utilizar o procedimento de análise de variância (ANOVA), e o modelo permite que sejam calculadas a variância da análise, a variância interna aos frascos (dentre frascos) e a variância entre os frascos, onde cada uma delas indica a dispersão dos respectivos resultados em torno de sua média aritmética. A razão entre a variância “entre” frascos e a variância “dentre” frascos (esta última, variância do erro ou resíduo) fornece o valor F para a fonte de variação “entre frascos”, que é comparado ao valor F crítico obtido a partir dos graus de liberdade do erro (dentre frascos) e dos frascos (fonte sendo testada). Sendo o valor de F calculado inferior ao F crítico, conclui-se que não há motivo estatisticamente comprovado para não aceitação da homogeneidade entre os frascos. A relação contrária entre os valores de F calculado e crítico fornece subsídios para considerar que não há homogeneidade entre os frascos.

A análise de variância empregada é a de um fator, considerando-se a variância entre frascos e a variância dentre frascos, esta última correspondendo à variância do erro ou resíduo (ou da análise) (Chui et al., 2005).

Segundo a norma ISO/REMCO N247 citada por Olivieri (2005), recomenda-se o preparo de 12 frascos por meio de um método apropriado (ou em teste), que são analisados em duplicata por um método adequado. Outros modelos fatoriais

podem ser empregados (ANVISA, 2005; Chui et al.; 2005), atentando-se ao grau de liberdade mínimo do erro.

Leites crus refrigerados representativos de dez tanques de refrigeração foram introduzidos em um béquer de vidro de 1000 mL de capacidade, perfazendo um volume final de 1000 mL. A temperatura foi ajustada a 20°C por aquecimento em banho-maria a 40° ± 1°C. Introduziu-se uma barra magnética com comprimento de 78 mm e diâmetro de 13 mm, garantindo-se aproximadamente uma proporção volumétrica entre leite e barra magnética equivalente à dos frascos de coleta e as barras magnéticas empregadas na obtenção das amostras secundárias e realizou-se a agitação no agitador magnético múltiplo Modelo RO 10 Power, Marca IKA – Werke, em posição de agitação n° 8 por dois minutos, após o que a velocidade de agitação foi reduzida para a posição n° 5 (agitação leve) e mantida nesta velocidade. O volume de leite contido no béquer foi distribuído em seis frascos idênticos (150 mL de leite) àquele empregado na coleta de amostra primária, contendo cada um uma barra magnética de 37 mm de comprimento e 7 mm de diâmetro, idêntica à empregada no procedimento analítico de obtenção das amostras secundárias para a realização dos experimentos. Foi mantida a agitação magnética na posição n° 5. Dos seis frascos, foram tomadas 20 alíquotas de 40 mL, introduzidas em frascos plásticos estéreis idênticos àqueles empregados para armazenar as amostras secundárias do experimento principal. Em cada um dos 20 frascos, foi adicionado um comprimido de bronopol, e procedidas a homogeneização e a refrigeração conforme executado no experimento principal. As amostras foram conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG para análise em duplicata de gordura, lactose, proteína, sólidos totais por EIVM e células somáticas por citometria de fluxo, constituindo a duplicata a análise e reanálise dos parâmetros citados no mesmo frasco. Os dados obtidos foram empregados para avaliação da homogeneidade das amostras e conseqüentemente, da adequabilidade do procedimento de homogeneização do leite por agitação magnética empregada no experimento principal.

#### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE COMPONENTES (EIVM) E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CITOMETRIA)

Recebidas pelo LabUFMG, as amostras foram analisadas em duplicata definindo-se os teores em gordura, proteína, lactose e sólidos totais pelo método de EIVM e a CCS por citometria de fluxo. Os equipamentos encontravam-se devidamente calibrados frente a amostras de referência fornecidas pelo Canadá, e realizadas as checagens de rotina (estabilidade em curto prazo, purga da célula, *zero-settings*) recomendadas pelo manual dos equipamentos Bentley 2000<sup>®</sup> e Somacount 300<sup>®</sup> (Bentley, 1997; Bentley, 1998) e norma International IDF Standard 141C:2000 (IDF, 2000). O equipamento empregado nas análises foi um sistema Combi, constituído por uma combinação dos equipamentos Bentley 2000<sup>®</sup> e Somacount 300<sup>®</sup>, denominado Bentley 2300<sup>®</sup>. Conforme orientação do fabricante (Bentley, 1997; Bentley, 1998), as amostras foram colocadas em *racks* para análise em seqüência, colocados em banho de água para as amostras serem aquecidas a  $40^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Após equilíbrio térmico na temperatura desejada, foram realizadas 15 a 20 agitações manuais dos *racks* para permitir homogeneização do conteúdo dos frascos. Em seguida, os *racks* foram colocados um a um em posição de análise, ou seja, em posição de serem mecanicamente transportados para que as amostras se alinhassem à pipeta dosadora que realiza a tomada de alíquota da amostra para introdução no equipamento. No momento da tomada de alíquota, 12,5 mL de amostra foram pipetados de forma automática e bombeados para o homogeneizador que proporcionou por pressão positiva, a redução e uniformização do tamanho dos glóbulos de gordura. Em seguida, 9 mL da amostra homogeneizada foram conduzidas à cubeta, onde recebeu a incidência de radiações infravermelhas nos comprimentos de onda de absorção e quantificação da gordura (comprimentos de onda A e B), proteína e lactose. A quantidade de energia transmitida para cada radiação incidente foi detectada e transformada pelo programa computacional do equipamento em teor em cada um dos principais componentes do leite, expressos na tela do monitor do computador em g/100 g de leite (% m/m).

Simultaneamente à análise de componentes, 3,5 mL de amostra homogeneizada foram direcionados para a CCS, num processo que consiste basicamente de mistura da alíquota à solução detergente e à solução contendo o corante brometo de etídio (que se liga ao DNA das células) por meio de três bombas de seringa e válvulas de retenção. A suspensão de células foi conduzida para uma agulha de injeção para combinar-se com o fluido de condução. Este processo proporcionou a disposição das células uma a uma em um fluxo contínuo em direção à incidência da radiação laser verde-azul. Quando as células sofreram a incidência da radiação laser verde e azul emitiram radiação laser vermelha que foi detectada e transformada em um pulso elétrico, cada um representando uma célula somática contada. O resultado foi expresso no monitor do computador em milhares de células somáticas/mL de leite, em conjunto com os resultados de componente obtidos pelo Bentley 2000<sup>®</sup>.

#### 4.4 CONTAGEM INDIRETA DE MICRORGANISMOS A 30°C/72 HORAS PELO MÉTODO DE CITOMETRIA DE FLUXO

Uma vez recebidas pelo LabUFMG, as amostras destinadas à contagem de bactérias foram analisadas em duplicata no equipamento Bactocount<sup>®</sup> (Bentley Instruments, Chaska, EUA). O equipamento encontrava-se devidamente calibrado frente a amostras analisadas pelo método de contagem padrão em placa de referência definido pela norma International IDF Standard 100B:1991 (IDF, 1991a), permitindo a conversão da contagem bacteriana total em contagem padrão, em atendimento à Instrução Normativa n° 51/2002 (Brasil, 2002a).

As amostras foram dispostas em *racks* e foram realizadas 15 a 20 agitações manuais para permitir homogeneização do conteúdo dos frascos. Em seguida, os *racks* foram colocados um a um em posição de análise, ou seja, em posição de serem mecanicamente transportados para que as amostras se alinhassem à pipeta dosadora que realiza a tomada de alíquota da amostra para introdução no equipamento. Sendo a alíquota submetida a procedimentos de

eliminação enzimática de interferentes e fixação de corante fluorescente brometo de etídio por meio de incubação, as bactérias foram enumeradas, obtendo-se o resultado final em milhares de UFC/mL de leite.

#### 4.5 ANÁLISE DE PROTEÍNA BRUTA PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA (KJELDAHL)

A quantificação da PB das amostras representativas dos 200 tanques de refrigeração de propriedades rurais foi realizada em conformidade com a norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993), segundo determinação da Instrução Normativa nº 51/2002 (Brasil, 2002a) para análise de leite cru refrigerado. Empregou-se o método macro-Kjeldahl que emprega bloco de digestão, parte 2 da referida norma analítica e as análises foram realizadas em duplicata.

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico (P.A.), a balança analítica empregada encontrava-se calibrada com certificado emitido pela Rede Brasileira de Calibração (RBC) e a água empregada era deionizada e destilada. Em conformidade com a norma NBR ISO 17025, para fins de rastreamento, foram registradas as informações quanto ao preparo e aos insumos empregados no preparo de soluções que atuaram como reagentes e como soluções volumétricas (ABNT, 2005)

Concomitantemente à obtenção da alíquota de 40 mL de leite para análise de componentes por EIVM e CCS, uma alíquota correspondente a aproximadamente 5 g de amostra foi analítica e exatamente pesada ao 0,1 mg e introduzida no fundo de um tubo de digestão de vidro resistente a aquecimento. Não se admitiu escorrimento da amostra pelas paredes internas do tubo e porções mínimas de amostra aderidas a elas foram decorrentes da projeção proporcionada pelo gotejamento da amostra sobre o conteúdo do fundo do tubo durante o procedimento de pesagem, e foram posteriormente encobertos pela mistura dos reagentes adicionados. A massa de amostra foi devidamente registrada.

Sobre a porção de amostra e em capela de exaustão foram adicionados 12,0 gramas de sulfato de potássio, 1,0 mL de solução de

sulfato de cobre penta-hidratado e 20 mL de ácido sulfúrico concentrado com título não inferior a 98% m/m. Realizou-se agitação leve dos tubos com movimentos circulares para permitir mistura dos reagentes adicionados ao leite. Na abertura dos tubos de digestão foram colocados funis de vidro destinados a proporcionar a condensação e hidratação do trióxido de enxofre e retorno dele ao meio reacional na forma de ácido sulfúrico, garantindo-se quantidade suficiente de ácido durante todo o processo de digestão e mineralização.

Em capela de exaustão, os tubos foram conduzidos ao bloco de digestão do equipamento Kjeltec 2200<sup>®</sup> (Foss A/S, Hillerød, Dinamarca) em número de 20 tubos por procedimento completo de digestão (capacidade do bloco digestor). Iniciou-se o tratamento térmico a 210°C por 30 minutos e em seguida elevou-se a temperatura para 350°C, na qual os tubos permaneceram por 30 minutos. Posteriormente, elevou-se a temperatura do bloco de digestão para 420°C até completarem-se 2,5 horas de tempo de digestão total. Não foi necessário o emprego de antiespumante de silicone. Decorrido o tempo de digestão, observando-se que os digeridos tornavam-se totalmente incolores e transparentes quando em temperatura elevada, os tubos foram retirados do bloco digestor e mantidos na capela de exaustão para serem naturalmente resfriados à temperatura ambiente, quando então os digeridos adquiriam coloração levemente azulada.

Os funis foram devidamente rinsados com água deionizada e destilada, com recolhimento do líquido de rinsagem no interior dos tubos. Foi adicionada água deionizada destilada para lavagem das paredes internas dos tubos e solubilização dos cristais formados, perfazendo um total de 85 mL de água deionizada destilada por tubo, aguardando-se em seguida resfriamento à temperatura ambiente.

O processo de destilação foi realizado em equipamento Kjeltec 2200<sup>®</sup> (Foss A/S, Hillerød, Dinamarca) programado para adição de 70 mL de água deionizada destilada, 65 mL de solução de hidróxido de sódio 40% m/m e destilação com insuflação de vapor durante 4 minutos, suficientes para produzir entre 150 e 200 mL de destilado. Os tubos de digestão foram bem

acoplados ao equipamento e realizada a destilação. O destilado foi recolhido em frasco erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 50 mL de solução de ácido bórico a 4% m/v adicionado de indicadores de pH vermelho de metila e verde de bromocresol em uma concentração final de  $5,0 \times 10^{-5}$  g/50 mL e  $25,0 \times 10^{-5}$  g/50 mL. A solução receptora inicialmente vermelha adquiria coloração verde azulada com a recepção do destilado contendo amônia. A solução obtida foi titulada contra solução volumétrica de ácido clorídrico de concentração de 0,1 mol/L com fator de correção conhecido. A bureta empregada foi automática Metrohm®, com sensibilidade ao centésimo do mililitro e o ponto de viragem foi considerado aquele em que se observou o primeiro traço de coloração rosa em substituição à coloração verde (IDF, 1993).

#### 4.5.1 Ensaios de brancos na determinação de proteína bruta por Kjeldahl

O ensaio em branco, realizado para eliminar dos cálculos qualquer incidência de nitrogênio adversa e cumulativa nos reagentes empregados, foi conduzido conforme a norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993). Foram executados os mesmos procedimentos aplicados à amostra, entretanto o leite foi substituído por 5 mL de água deionizada destilada e 0,85 g de sacarose Reagen® de qualidade analítica. Esta quantidade de sacarose consome aproximadamente a mesma quantidade de ácido sulfúrico que 5 gramas de leite. Os ensaios foram realizados em cada dia de análise e os volumes encontrados em mL foram deduzidos dos volumes encontrados quando da realização das análises das amostras.

#### 4.6 ANÁLISE DE NNP E PROTEÍNA VERDADEIRA PELO MÉTODO DE KJELDAHL

A quantificação de NNP das amostras representativas de tanques de refrigeração de propriedades rurais foi realizada em conformidade com a norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993). Empregou-se o método Kjeldahl que emprega bloco de digestão, parte 4 da referida norma analítica. Todos os reagentes empregados foram de grau analítico (P.A.) e a balança analítica empregada encontrava-se calibrada com certificado emitido

pela Rede Brasileira de Calibração (RBC) e a água empregada era deionizada e destilada. Em conformidade com a norma NBR ISO 17025, para fins de rastreamento, foram registradas as informações quanto ao preparo e aos insumos empregados no preparo de soluções que atuaram como reagentes e como soluções volumétricas (ABNT, 2005).

Seqüencialmente à pesagem do leite para determinação da PB, uma alíquota correspondente a 20 mL de amostra foi analítica e exatamente pesada sobre um Erlenmeyer e adicionada de 80 mL de solução de ácido tricloroacético 12% m/v também analítica e exatamente pesados. Procedeu-se agitação manual leve com movimentos circulares, e aguardou-se no mínimo 5 minutos para precipitação das proteínas. Todo o conteúdo do Erlenmeyer foi vertido para um funil de vidro contendo um papel de filtro qualitativo Nalgon®, e realizada a filtração completa. O filtrado foi recolhido em frasco de vidro e devidamente vedado com tampa de encaixe sob pressão. As amostras foram congeladas em temperatura de  $-18^{\circ}$  a  $-15^{\circ}$  C. A transparência e limpidez do filtrado amarelo claro foram sempre observadas, como forma de controle da eficiência do processo de retenção pelo papel de filtro das proteínas das amostras. De 15 amostras coletadas no mês de agosto, os procedimentos de obtenção do filtrado foram realizados em duplicata, objetivando realização de experimento paralelo de estabilidade das amostras congeladas, analisando-se o teor em NNP no dia de obtenção do filtrado e com quatro meses sob congelamento de  $-18^{\circ}$  C a  $-15^{\circ}$  C.

No dia de realização da análise de NNP, os filtrados representativos das amostras foram descongelados em banho de água à temperatura ambiente (com trocas sucessivas de água) e uma vez sendo alcançada a temperatura ambiente, os frascos foram adicionados de uma barra magnética de 37 mm x 7 mm. Procedeu-se a homogeneização do conteúdo de cada frasco por agitação magnética e uma alíquota de 20 mL de cada um deles foi analítica e exatamente pesada e transferida para os respectivos tubos de digestão. Deste ponto em diante, procedeu-se a adição de sulfato de potássio, solução de sulfato de cobre penta-hidratado a 5% m/v e ácido sulfúrico concentrado, e realizaram-se a

digestão e destilação de forma idêntica àquela empregada na determinação de PB em leite anteriormente descrita, exceto pela adição de antiespumante de emulsão de silicone na quantidade de 4 gotas por tubo. Obteve-se o destilado e a titulação foi realizada contra solução volumétrica de ácido clorídrico 0,01 mol/L de fator de correção conhecido e o

volume foi registrado com sensibilidade ao centésimo do mililitro.

Na determinação do teor em NNP das amostras empregou-se a fórmula definida pela norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993), demonstrada pela equação 9.

Equação 9:

$$\% \text{ NNP (\% m/m)} = \frac{1,4007 (V_s - V_b) M}{(W_f \times W_m) / (W_t - 0,065 W_m)}$$

- V<sub>s</sub> = Volume, em mililitros, da solução volumétrica padronizada de ácido usada na titulação da amostra;
- V<sub>b</sub> = Volume, em mililitros, da solução volumétrica padronizada de ácido usada no teste branco;
- M = Molaridade exata, com quatro casas decimais, da solução volumétrica padronizada de ácido usada = 0,01 x F<sub>c</sub>;
- F<sub>c</sub> = Fator de correção da solução de HCl 0,01 mol/L;
- W<sub>f</sub> = Massa em gramas de 20 mL do filtrado;
- W<sub>m</sub> = Massa em gramas do leite amostrado;
- W<sub>t</sub> = Massa em gramas do leite amostrado mais a massa de solução de ácido tricloroacético adicionada.

#### 4.6.1 Ensaios de branco na determinação de NNP

Conforme a norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993), realizaram-se ensaios em branco para eliminar dos cálculos qualquer incidência de nitrogênio adversa e cumulativa nos reagentes empregados na determinação de NNP. Os ensaios em branco foram conduzidos realizando-se os mesmos procedimentos aplicados à amostra, entretanto o filtrado foi substituído por 16 mL de solução de ácido tricloroacético a 12% m/v e 0,1 g de sacarose de qualidade analítica marca Reagen<sup>®</sup>. Os ensaios foram realizados em cada dia de análise e os volumes encontrados em mL foram deduzidos dos volumes encontrados quando das análises das amostras.

#### 4.6.2 Avaliação da estabilidade ao congelamento do teor em NNP no soro

Foram selecionadas 16 amostras de leite cru

refrigerado de tanques de refrigeração provenientes de duas coletas realizadas em agosto para realizar o ensaio de estabilidade do teor em NNP em função do tempo de estocagem do soro filtrado da precipitação do ácido tricloroacético a 12% m/v. Estas amostras foram submetidas à pesagem de 40 mL de cada uma delas aos quais adicionaram-se 160 mL de solução de ácido tricloroacético a 12% m/v, ambos exata e analiticamente pesados ao 0,1 mg. Foi realizada a agitação leve para precipitação ácida das proteínas e realizada filtração completa em papel de filtro. O soro obtido de cada uma das amostras, amarelo claro e transparente, foi homogeneizado por agitação magnética e dividido em duas porções, uma delas analisada em teor em NNP no dia seguinte à coleta do leite cru refrigerado e a outra porção foi congelada de -15° a -18°C durante 90 dias, após o que foram descongeladas, homogeneizadas por agitação magnética e analisadas em seu teor em NNP conforme o mesmo procedimento de análise. Os dados obtidos foram comparados para se avaliar o

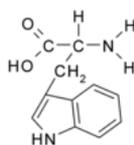
efeito de congelamento por 90 dias do soro tricloroacético sobre a determinação do NNP.

#### 4.6.3 Determinação do teor em proteína verdadeira

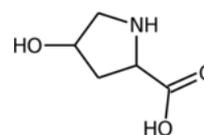
Segundo Barbano & Lynch (1992) e Silva (1997), o teor percentual em PV na amostra é calculado deduzindo-se do percentual em NT o percentual em NNP e multiplicando-se o resultado, nitrogênio protéico, por 6,38, o fator do método de Kjeldahl.

#### 4.7 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DO NITROGÊNIO

Foram realizados ensaios de recuperação de nitrogênio conforme a norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993), submetendo-se à digestão materiais de referência com teor em nitrogênio conhecido. Os resultados foram obtidos por meio da relação percentual entre o teor de nitrogênio encontrado e aquele que teoricamente deveria ser encontrado. O objetivo deste ensaio foi verificar se as condições de digestão não permitiam a perda de nitrogênio por aquecimento excessivo ou mineralização insuficiente; ou se as condições de destilação não impunham a perda de nitrogênio; ou se não havia erro no processo de titulação.



Triptofano



Hidroxirolina

Figura 18. Aminoácidos empregados nos ensaios de recuperação do método de Kjeldahl de análise de nitrogênio.

#### 4.8 EXPERIMENTO DE AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE URÉIA AO LEITE

Realizou-se um experimento para avaliar o efeito da adição de uréia ao leite na determinação de PB por EIVM. Trinta e duas amostras de leite cru de tanques de refrigeração de diferentes propriedades rurais foram submetidos ao procedimento de homogeneização por agitação magnética anteriormente descrito (item 3.1) e cada amostra

As substâncias empregadas foram o triptofano (IDF, 1993) marca Fluka Sigma-Aldrich®, a hidroxiprolina Sigma® (Figura 18) e o sulfato de amônio (IDF, 1993) Fisher®, seco em estufa a 102°C ± 2°C por 2 horas, todos com pureza não inferior a 99%. O triptofano foi analisado pesando-se exata e analiticamente 0,18 g do, adicionados de 0,67 g de sacarose já qualificada anteriormente e realizando-se os procedimentos aplicados à análise da amostra. A hidroxiprolina foi analisada do mesmo modo que o triptofano, exceto por serem utilizados em torno de 0,16 g. O sulfato de amônio foi analisado pesando-se exata e analiticamente 0,12 g, adicionados de 0,85 g de sacarose já qualificada anteriormente e realizando-se os procedimentos aplicados à análise da amostra. Os resultados obtidos em volume de solução volumétrica de ácido clorídrico 0,1 mol/L foram registrados para realização dos cálculos de recuperação.

A hidroxiprolina, ainda que não se trata de uma substância prevista na norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993), foi empregada em teste por apresentar como o triptofano, um nitrogênio presente em um anel com quatro carbonos adicionais. Estes compostos são mais dificilmente mineralizados (Etheridge et al., 1998).

foi distribuída em 4 frascos plásticos inertes e estéreis. O conteúdo em leite distribuído no primeiro frasco de cada uma das 32 amostras foi pesado ao miligrama com quantidade em torno de 40 gramas e adicionado de um comprimido de bronopol que também foi pesado ao miligrama. Estes frascos foram denominados C0 por não conterem uréia adicionada. Ao segundo frasco representativo de cada uma das 32 amostras de leite foram adicionados 40,000 ± 0,001 g de leite, um comprimido de bronopol pesado ao miligrama e 65 µL a 20°C de uma

solução de uréia a 40,04% m/m (densidade igual a 1,11073 g/mL), correspondendo a 0,07220 g de uréia. Estes frascos foram denominados C1 por conterem o primeiro nível de uréia adicionada. Ao terceiro frasco representativo de cada uma das 32 amostras de leite foram adicionados 40,000 ± 0,001 g de leite, um comprimido de bronopol pesado ao miligrama e 130 µL a 20°C de uma solução de uréia a 40,04% m/m (densidade igual a 1,11073 g/mL), correspondendo a 0,14439 g de uréia. Estes frascos foram denominados C2 por conterem o segundo nível de uréia adicionada. Ao terceiro frasco representativo de cada uma das 32 amostras de leite foram adicionados 40,000 ± 0,001 g de leite, um comprimido de bronopol pesado ao miligrama e 260 µL a 20°C de uma solução de uréia a 40,04% m/m (densidade igual a 1,11073 g/mL), correspondendo a 0,28879 g de uréia. Estes frascos foram denominados C3 por conterem o terceiro nível de uréia adicionada. O conteúdo dos 128 frascos gerados foi homogeneizado por agitação manual, visando a dissolução do conservante e a dispersão da uréia adicionada. Os frascos foram em seguida submetidos à refrigeração a 3°- 5°C e conduzidos ao LabUFMG para análise em duplicata por EIVM quanto aos teores em gordura, PB, lactose e sólidos totais.

#### 4.9 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

No presente experimento, os dados foram analisados por meio de regressão linear, estatística descritiva, pareamento (análise de

variância de dois fatores), análise de variância de um fator (delineamento inteiramente casualizado) segundo Sampaio (2002) e análise multivariada, sendo empregados os programas estatísticos Minitab versão 14.0 e o Infostat 2006.

Para comparação de médias, adotou-se o teste de Tukey em avaliações com coeficiente de variação (CV) ≤ 15% e o teste t de Student em avaliações com 15% < CV < 30%). Nenhum experimento apresentou mais de quatro tratamentos, que abonasse o emprego de outro teste de comparação de médias.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA HOMOGENEIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para avaliar o processo de homogeneização das amostras primárias visando obter as amostras secundárias, utilizaram-se análises de variâncias de um fator do Teste de Homogeneidade aplicadas a cada conjunto de dados obtidos para os parâmetros gordura, proteína, lactose, sólidos totais por EIVM e células somáticas por citometria de fluxo (Tabelas 1 a 5 do Anexo, com nível de significância de  $\alpha$  igual a 0,05). A CCS, por não apresentar distribuição normal, foi transformada por logaritmo decimal dos dados antes de se realizar a análise de variância.

Tabela 14. Indicadores estatísticos de avaliação do Teste de Homogeneidade aplicado às amostras de leite na avaliação do sistema de homogeneização das amostras primárias para obtenção de amostras secundárias.

Parâmetro de análise do leite	Indicadores estatísticos de avaliação	
	Razão da variância entre frascos/dentre frascos	Propabilidade
	(F)	P
Gordura	1,47	0,198
Proteína	0,69	0,787
Lactose	1,47	0,198
Sólidos Totais	1,16	0,37
CCS	1,88	0,084

$F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}} = 2,155$ : não houve diferença entre frascos e dentre frascos ( $P > 0,05$ ).

Concluiu-se pelo teste F com nível de significância  $\alpha$  igual a 0,05 que o processo de homogeneização por agitação magnética do leite cru refrigerado em procedimento padronizado no experimento foi capaz de proporcionar amostras estatisticamente equivalentes em todos os parâmetros de avaliação testados, ou seja, gordura, PB, lactose e sólidos totais por EIVM e CCS por citometria de fluxo (Tabela 14), sendo adequado portanto ao procedimento de obtenção de amostras secundárias para a comparação de métodos de doseamento de PB por Kjeldahl e por EIVM. Conseqüentemente, o emprego de amostras secundárias não constitui uma fonte de variação a ser considerada no experimento.

Os resultados obtidos das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração analisadas no período de agosto a novembro de 2005 de propriedades rurais de Minas Gerais forneceram, conforme a Tabela 15, os seguintes parâmetros estatísticos de gordura, PB, lactose e sólidos totais por EIVM (IDF, 2000), PB, NNP e PV pelo método de referência baseado no método de Kjeldahl (IDF, 1993). Na Tabela 16 demonstra-se a estatística descritiva referente à CCS e contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas nas referidas amostras, com medidas de dispersão na forma de mediana, quartis, máximo e mínimo por não apresentarem distribuição normal.

## 5.2 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS COMPONENTES DO LEITE, CCS E MICRORGANISMOS

Tabela 15. Estatística descritiva dos valores obtidos nas análises do leite cru de 200 tanques de refrigeração de 200 propriedades rurais de Minas Gerais, coletadas no período de agosto a novembro de 2006

Parâmetro	Unidade	n° observações	Média	EP média	Desvio-padrão	C.V.	Primeiro quartil	Mediana	Terceiro quartil	Mínimo	Máximo
NT (Kjeldahl)	% m/m	200	0,488	0,002	0,026	5,40	0,470	0,485	0,504	0,428	0,595
NNP (Kjeldahl)	mg/100g	200	26,055	0,334	4,727	18,14	22,696	25,847	29,128	13,927	38,695
NNP/NT	%	200	5,346	0,068	0,960	17,96	4,667	5,301	5,957	2,938	7,944
PB (Kjeldahl)	% m/m	200	3,113	0,012	0,168	5,40	2,998	3,097	3,219	2,729	3,797
PV (Kjeldahl)*	% m/m	200	2,947	0,012	0,165	5,61	2,836	2,933	3,049	2,575	3,632
Gordura (EIVM)	% m/m	200	3,455	0,029	0,416	12,04	3,243	3,438	3,695	1,365	4,630
PB (EIVM)	% m/m	200	3,093	0,012	0,171	5,53	2,985	3,075	3,200	2,725	3,850
Lactose (EIVM)	% m/m	200	4,549	0,011	0,154	3,38	4,466	4,540	4,644	4,035	5,015
ST (EIVM)	% m/m	200	12,072	0,032	0,447	3,70	11,810	12,055	12,335	10,215	13,815
SNG (EIVM)	% m/m	200	8,617	0,018	0,253	2,94	8,440	8,600	8,801	7,910	9,265

\* Parâmetro analisado pelo método indireto, correspondente a  $\% PV = (NT - NNP) \times 6,38$ .

Tabela 16. Estatística descritiva da CCS e contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas em leite cru de 200 tanques de refrigeração de 200 propriedades rurais de Minas Gerais, coletadas no período de agosto a novembro de 2006.

Parâmetro	Unidade	N° observações	Média geométrica	Primeiro quartil	Mediana	Terceiro quartil	Mínimo	Máximo
Contagem de células somáticas (citometria de fluxo)	CCS x 10 <sup>-3</sup> /mL	200	346,5	187,3	371,0	619,3	11,0	3113,0
Contagem padrão de microrganismos (citometria de fluxo)	UFC x 10 <sup>-3</sup> /mL	200	153,5	31,5	135,0	734,5	3,0	6893,0

Nota: Os valores de mediana, quartis e valores máximos e mínimos foram obtidos a partir de médias geométricas entre duplicatas de cada amostra analisada. A contagem padrão de microrganismos (citometria de fluxo) refere-se à contagem de microrganismos a 30°C/72 horas obtida por conversão a partir de valores de contagem bacteriana total (CBT) obtidos por citometria de fluxo.

Os teores em NNP e NNP/NT obtidos, com respectivas médias de 26,055 mg/100 g, e 5,35% encontram-se dentro dos valores típicos para esta fração nitrogenada. Robertson & Elfriede (1990) encontraram teores em NNP de 24 a 36 mg/100g e 4,82 a 5,57% para a relação

NNP/NT. A partir dos dados obtidos, pôde-se estabelecer uma categorização dos parâmetros de qualidade do leite cru refrigerado em função dos preceitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51/2002 do MAPA, (Brasil, 2002a) conforme Tabela 17.

Tabela 17. Categorização das 200 amostras de leite cru de tanque de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais coletadas de agosto a novembro de 2002 face aos preceitos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51/2002 (Brasil, 2002a).

Parâmetro de qualidade face à Instrução Normativa nº 51/2002	SNG (Mínimo 8,4 % m/m)	PB (Kjeldahl) (Mínimo 2,9 % m/m)	PB (EIVM) (Mínimo 2,9 % m/m)	CCS (Máx. 1.000.000)	CCS (Máx. 400.000)	Contagem de mesófilos (Máx. 1.000.000)	Contagem de mesófilos (Máx. 100.000)
<b>Não atende</b>	19,0%	8,5%	10,5%	9,5%	47,0%	21,0%	53,5%
<b>Atende</b>	81,0%	91,5%	89,5%	90,5%	53,0%	79,0%	46,5%

Entre as amostras que não atenderam os preceitos da Instrução Normativa nº 51/2002 (Brasil, 2002a) quanto ao parâmetro SNG (19,0% do total), 60,5% atendem este dispositivo normativo quanto ao teor em PB e, conseqüentemente, 39,5% não o fazem, o que corresponde respectivamente a 11,5% e 7,5% do total de amostras respectivamente, mostrando que níveis baixos de lactose têm representado um peso importante no não cumprimento daquela norma em SNG quando os teores em PB atendem os preceitos mas são marginais aos limites. A célula somática influencia este processo, conforme indicado pela Tabela 21. Amostras com CCS  $\geq$  400.000 células/mL e  $<$  400.000 células/mL apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) quanto aos teores em SNG e lactose, e foram similares ( $P > 0,05$ ) quanto aos teores em PB. Estabelecendo um estudo de distribuição de frequência (qui-quadrado) para os parâmetros de PB, SNG, CCS e contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas em duas classes quanto ao cumprimento ou não da Instrução Normativa nº 51/2002 (atende/não atende), dividiram-se também 198 amostras de leites de tanque de refrigeração de Minas Gerais em quatro classes de produção diária média de leite da propriedade rural: 1 a 100 litros, 101 a 200 litros, 201 a 600 litros e mais de 600 litros. O teste estatístico demonstrou não haver associação ( $P > 0,05$ ) entre atendimento/não atendimento dos preceitos estabelecidos pela norma para PB,

SNG e CCS com a disposição da produção média diária naquelas classes ( $\chi^2$  calc.  $<$   $\chi^2$  crítico = 7,82) (Tabela 6 do Anexo). Entretanto houve associação ( $P < 0,05$ ) entre produção média diária de leite e contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas, concorrendo as duas primeiras classes, de 1 a 101 litros e 101 a 200 litros, para um índice maior de não atendimento à Instrução Normativa nº 51/2002, e as classes de 201 a 600 litros e mais de 600 litros para um índice maior de atendimento ( $\chi^2$  cor. Yates calc. = 9,12  $>$   $\chi^2$  crítico = 7,82).

Outrossim, dividindo as propriedades rurais nas quais as amostras de leite cru refrigerado foram coletadas em quatro classes de produção diária média de leite: 1 a 100 litros, 101 a 200 litros, 201 a 600 litros e mais de 600 litros, e categorizando-as em relação ao atendimento e não atendimento da Instrução Normativa nº 51 (respectivamente correspondendo a atendimento ao mesmo tempo a todos os parâmetros PB, SNG, CCS, contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas e gordura, e não atendimento de pelo menos um dos parâmetros estabelecidos), obtiveram-se para as quatro classes, 40,4%, 35,6%, 57,7% e 70% de percentual de atendimento. Realizando-se um estudo de distribuição de frequência (qui-quadrado) das quatro classes em relação ao atendimento e não atendimento conforme descrito anteriormente, observou-se que a variação dos percentuais de atendimento de uma

forma geral não era devido à casualidade ( $P = 0,005 < 0,05$ ), concluindo-se haver uma associação entre produção diária média e atendimento à referida Norma. Para uma maior percepção desta associação, realizou-se o estudo de distribuição de frequência compactando-se as classes duas a duas em conformidade com Sampaio (2002), obtendo-se as classes 0 a 200 litros e > 200 litros. Uma vez mais o teste estatístico demonstrou uma associação entre produção média diária e atendimento à Instrução Normativa nº 51 ( $P = 0,001 < 0,05$ ), perfazendo a primeira classe um percentual de atendimento à referida Norma de 37,9 % e a segunda classe, 62,1 %.

### 5.3 PREDIÇÃO DA PROTEÍNA VERDADEIRA NO LEITE

A partir das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de Minas Gerais, obteve-se média para a PV de 2,947% m/m com desvio-padrão de 0,165% m/m.

Realizando-se uma análise de regressão entre teores em PB e PV do leite dos 200 tanques de refrigeração de Minas Gerais, com o objetivo de se estabelecer uma equação que melhor representasse a relação entre estes dois parâmetros de composição do leite cru refrigerado, obtiveram-se dados extraídos da análise de variância da regressão (Tabela 7 do Anexo). O modelo apresentou uma boa capacidade de previsão, com coeficiente de determinação de 0,9679. Por outro lado, a razão entre as variâncias da regressão e do erro ( $F_{calc}$ ) apresentou valor de 5.964,40, superior ao  $F_{crítico_{gl=1 e 198}}$  de 3,89, condizente com uma inclinação da curva de regressão diferente de zero (Sampaio, 2002),.

A equação que representa o modelo matemático da predição em leite cru refrigerado do teor em PV (% m/m) a partir do teor em PB (% m/m) é indicada na Figura 19.

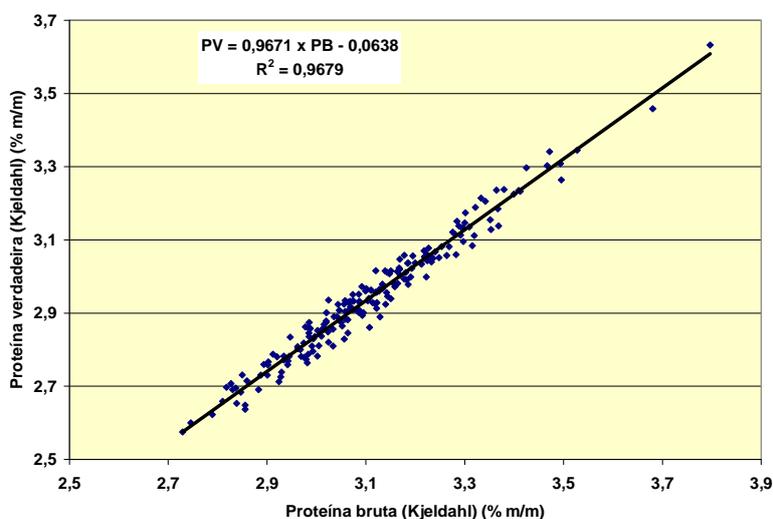


Figura 19. Gráfico de dispersão entre os dados de % m/m de PB analisada pelo método Kjeldahl e a % m/m de PV, indicando a equação de regressão obtida e o valor do coeficiente de determinação.

Nota-se que há uma ótima predição dos teores de PV a partir dos teores de PB obtidos ( $r^2 = 0,9679$ ), de modo que em média a PV responde por 96,8% das variações da PB. Os 3,2 % restantes obviamente são em sua maioria atribuídos ao NNP, e em menor extensão pelos

desvios analíticos inerentes aos métodos de análise de PB e de NNP.

A partir da análise de leite coletado de 200 tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais, em média o NNP respondeu

por 5,35% do NT e conseqüentemente por 5,35 % da PB, cuja média foi de 3,11 % m/m. Portanto, 0,17% m/m em PB em média não constituíram PB e sim NNP. Este fato deve ser considerado em sistemas de PPQ sobretudo quando a proteína é um componente do leite de importância na obtenção de derivados lácteos, com especial atenção ao queijo, requeijão e similares, uma vez que apresenta efeito no rendimento daqueles produtos e no cálculo do balanço de massas referente à proteína que é recebida pelo estabelecimento e a que efetivamente se encontra nos derivados lácteos produzidos. Em função da grande variabilidade do NNP, equações de regressão devem ser estabelecidas regional e sazonalmente e freqüentemente checadas a médio e longo prazos. Alternativamente, a calibração dos equipamentos de alta capacidade analítica baseados em EIVM poderão ser calibrados em base de PV, eliminando a interferência do NNP, mas o que exige uma discussão maior com todos os seguimentos envolvidos, como ocorreu em vários países nas décadas de 80 e 90. É importante lembrar que no texto da Instrução Normativa nº 51/2002 do MAPA, em seu anexo IV, encontra-se definido como parâmetro de qualidade do leite o termo “proteína”, não fazendo referência a PB ou PV, o que talvez tenha sido decorrente de uma estratégia do legislador, prevendo discussões futuras a respeito.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DE ACURÁCIA E REPETITIVIDADE NO DOSEAMENTO DA PB

Para realizar a comparação entre teores em PB de leites de tanques de refrigeração de propriedades rurais, obtidos por MRK e por EIVM, respectivamente preconizados pela norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993) e IDF Standard 141C:2000, o primeiro definido como oficial pela legislação brasileira (Brasil, 2002a), empregaram-se as ferramentas estatísticas estabelecidas pela norma International IDF Standard 128A:1999 (IDF, 1999), bem como parâmetros de julgamento preconizados pela norma International IDF Standard 141C:2000 (IDF, 2000) e AOAC (Bradley Jr., 2000).

Na quantificação do NT pelo método de

Kjeldahl a partir das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração, obtiveram-se a média de 0,4879% m/m, diferença média entre réplicas de -0,000278% m/m e desvio-padrão das diferenças entre réplicas de 0,002732% m/m, com uma diferença máxima de 0,005250% m/m e um mínimo de -0,005950% m/m, estando portanto dentro das exigências de no máximo 0,006% m/m (absoluto) preconizadas pela norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993).

Na quantificação do teor em NNP das mesmas 200 amostras de leite anteriormente citadas, a média obtida foi de 0,02606% m/m (26,06 mg/100 g de leite), diferença média entre réplicas de -0,0000214% m/m e respectivo desvio-padrão de 0,001141% m/m, com uma diferença máxima de 0,002932% m/m e mínima de -0,002834% m/m, estando portanto dentro das exigências de no máximo 0,003% m/m (absoluto) preconizadas pela norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993). O desvio-padrão da repetitividade (IDF, 1999) foi estimado em 0,0008% m/m.

Em relação aos teores de PB obtidos por MRK (NT x 6,38), a média foi de 3,113% m/m, o desvio-padrão da repetitividade foi de  $S_r = 0,0124\%$  m/m (0,397% relativo à média de PB), compatíveis com resultados obtidos em estudos colaborativos da AOAC de 0,014% m/m e 0,385%, respectivamente (Bradley Jr., 2000). As diferenças entre duplicatas apresentaram um máximo de 0,0335% m/m e um mínimo de -0,0379% m/m e desvio-padrão de 0,0174% m/m.

O método de quantificação da PB por EIVM apresentou média de PB de 3,093% m/m, e desvio-padrão da repetitividade ( $S_r$ ) de 0,0106% m/m (0,341% relativo à média de PB), baseando-se nas diferenças entre duplicatas. O desvio-padrão das diferenças entre duplicatas foi de 0,014% m/m, valor dentro dos limites impostos pelas normas da AOAC (Bradley Jr., 2000) e da FIL (IDF, 2000), de no máximo 0,02% m/m. Os valores máximo e mínimo para as diferenças entre duplicatas do teor em PB por EIVM foram de 0,03 e -0,05% m/m, atendendo o máximo absoluto de 0,06 % m/m estabelecido pela FIL (IDF, 2000). A média dos valores absolutos (sem o sinal) das diferenças entre os teores em PB obtidos em duplicata por EIVM

foi de 0,0111% m/m, inferior ao máximo de 0,02% estabelecido pela AOAC (Bradley Jr., 2000).

Avaliando-se a acurácia do método de EIVM frente ao MRK na quantificação da PB, obteve-se um desvio-padrão de 0,0955% m/m para as diferenças entre os resultados obtidos pelos dois métodos, valor acima do máximo de 0,06% m/m preconizado pela AOAC (Bradley, 2000) e 0,07% pela FIL (IDF, 2000). O valor para a média dos desvios de 0,0204% m/m (Figura 20) foi superior ao crítico de 0,00989 ( $= 0,14/\sqrt{n}$ ) determinado como limite pela FIL (IDF, 2000) e a média das diferenças absolutas

entre os métodos foi de 0,077% m/m, superior ao valor de 0,05% m/m preconizado pela AOAC (Bradley, 2000) como máximo. A distribuição das diferenças de resultados do teor em proteína bruta por EIVM e por Kjeldahl encontra-se demonstrada por meio da Figura 20.

Na determinação de PB, os testes de avaliação da repetitividade do método EIVM proporcionaram portanto resultados satisfatórios, enquanto os testes de avaliação da acurácia (diferença entre o método indireto e o método de referência) revelaram resultados diferentes das especificações.

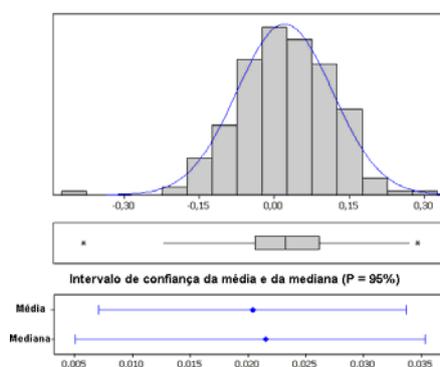


Figura 20. Distribuição das diferenças de resultados de teor em PB do leite cru obtidos pelos métodos Kjeldahl e de EIVM.

Considerando os valores obtidos pelo método EIVM como a variável independente (x) e os obtidos pelo método de referência como a variável dependente (y) (IDF, 1999), a hipótese nula de equivalência baseia-se na equação  $y = a + bx$ , em que as médias y e x seriam estatisticamente equivalentes, a inclinação b seria estatisticamente igual a 1 e o intercepto seria estatisticamente igual a zero, ou seja,  $y = x$ .

Avaliando-se a hipótese de a curva de regressão passar pelo centro de gravidade (ponto médio teórico) da população de amostras, observou-se que a média dos valores de PB obtidos pelo método indireto foi de 3,093 e não se situou no intervalo de confiança da média dos resultados de PB obtidos por meio da equação de regressão para o método de referência, com máximo de 3,126 e mínimo de 3,100, rejeitando-se portanto, com nível de significância  $\alpha = 0,05$ ,

aquela hipótese.

Testando-se a hipótese nula de a média das diferenças entre os resultados obtidos pelos dois métodos não diferir estatisticamente de zero, foram encontrados os valores máximo de -0,00768 e mínimo de -0,0330. Como o intervalo não contém o valor zero, concluiu-se, com nível de significância  $\alpha = 0,05$ , que a média das diferenças com valor igual a -0,0204 difere estatisticamente de zero, rejeitando-se a hipótese nula.

Testando-se a hipótese nula de o intercepto “a” não diferir estatisticamente de zero, obtiveram-se os valores do intervalo de confiança de “a” entre 0,786 e 0,326, não contendo portanto, com nível de significância de  $\alpha = 0,05$ , o valor zero, rejeitando-se a hipótese nula. O valor de a = 0,556 difere estatisticamente de zero.

Finalmente, testando-se a hipótese nula de a inclinação “b” não diferir estatisticamente de 1, obtiveram-se os valores do intervalo de confiança de “b” de 0,901 e 0,753, que não contém 1, rejeitando-se portanto, com nível de significância de  $\alpha = 0,05$ , a hipótese nula. O valor encontrado de  $b = 0,827$  difere estatisticamente de 1.

Por meio da Figura 21 demonstra-se a dispersão dos resultados de PB obtidos pelos dois

métodos, e visualmente a disposição da linha de tendência real obtida em relação à linha de tendência teórica  $y = x$  (tracejada).

Concluiu-se que fontes de variação a serem reconhecidas provocaram a inclinação da curva obtida frente à curva  $y = x$  teórica e ideal, sendo o modelo obtido em desacordo com os três parâmetros de avaliação (centro de gravidade, intercepto e inclinação).

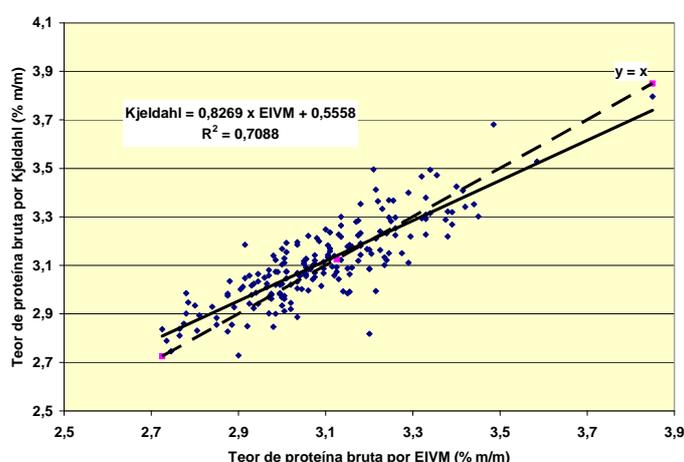


Figura 21. Gráfico de dispersão entre os resultados de PB obtidos pelo método indireto EIVM e pelo método de referência de Kjeldahl ( $NT \times 6,38$ ), e respectiva curva de regressão (linha contínua). A linha tracejada refere-se à linha de tendência ideal  $y = x$ .

A Tabela 8 do Anexo explicita a análise de variância da regressão, pela qual se obteve o F calculado da regressão igual a 481,84, superior ao  $F_{gl\ 1,101}$  crítico = 3,94 com nível de significância de  $\alpha$  igual a 0,05, o que indicou que o valor da inclinação b é significativo, ou seja, difere estatisticamente de zero; e obteve-se o valor de F da falta de ajuste de 1,21, inferior portanto ao F crítico para 2 e 97 gl da falta de ajuste de 3,09, indicando ser a falta de ajuste não significativa. Conclui-se que o modelo linear obtido apresenta com nível de significância de  $\alpha$  igual a 0,05 uma boa predição dos resultados de teor em PB por Kjeldahl a partir daqueles obtidos por EIVM, mas não é adequado quando se deseja um modelo mais próximo de  $y = x$  avaliando-se a acurácia, conforme a norma International IDF Standard 128<sup>a</sup>:1999 (IDF, 1999).

Na tentativa de se estabelecer uma causa da falta

de concordância entre os resultados de PB quantificada por MRK e EIVM, e não tendo sido o experimento planejado para tal fim, estabeleceu-se a comparação dos métodos por amostras analisadas por calibração realizada do equipamento de EIM, realizadas em agosto, setembro e outubro de 2005. Não se obteve uma equivalência entre as médias dos resultados de PB pelos dois métodos em 5 dos 6 grupos de calibrações ( $P < 0,001$ ) (Tabela 18), sendo equivalentes as médias de amostras analisadas com a calibração 01 ( $P = 0,223 > 0,05$ ) sendo todavia importante fazer referência ao baixo número de amostras analisadas naquela calibração (22 amostras), com 10 graus de liberdade do erro na análise de variância. As análises de variância respectivas às amostras analisadas pelos dois métodos a partir de diferentes calibrações do EIM encontram-se discriminadas pelas Tabelas 9 a 14 do Anexo.

Tabela 18. Comparação de médias dos teores em PB pelos métodos MRK e EIVM em uma mesma calibração do EIM.

Calibração realizada	Média PB por MRK	Média PB por EIVM	Diferença entre métodos
01	3,147 <sup>a</sup>	3,111 <sup>a</sup>	0,036
02	3,070 <sup>a</sup>	3,132 <sup>b</sup>	-0,062
03	3,080 <sup>a</sup>	3,021 <sup>b</sup>	0,059
04	3,158 <sup>a</sup>	3,093 <sup>b</sup>	0,065
05	3,102 <sup>a</sup>	3,152 <sup>b</sup>	-0,050
06	3,100 <sup>a</sup>	3,008 <sup>b</sup>	0,092

Medias seguidas de letras diferentes na mesma linha significa diferença significativa pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ).

Tentou-se estabelecer uma associação das diferenças entre os dois métodos com os principais componentes do leite (lactose, gordura, PB por MRK e por EIVM, e NNP) e com as calibrações realizadas, e para tanto, definiu-se a categorização das diferenças entre os teores em PB obtidos por MRK e EIVM (PB por MRK menos PB por EIVM) em três classes, sendo a primeira aquela cujos valores das diferenças entre os métodos encontraram-se compreendidos entre + 0,426 DP e -0,426 DP em relação à média das diferenças (correspondendo a aproximadamente 33% das amostras) e as outras duas classes com valores das diferenças respectivamente superiores e inferiores a + 0,426 DP e -0,426 DP em relação à média das diferenças, correspondendo cada uma aproximadamente 33% das amostras. O mesmo foi realizado com as respostas de lactose, gordura, NNP, PB por infravermelho (IV), PB por Kjeldahl (KJ), sendo todos classificados em valores altos, médios e baixos em relação à média. Procedeu-se a elaboração de Tabelas de contingência entre as três classes de diferenças entre os métodos e as três classes de cada um dos parâmetros de análise citados para aplicação do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ), admitindo-se para a hipótese nula ( $\chi^2_{\text{calc.}} < \chi^2_{\text{crítico}}$ ) que os valores altos (positivos), médios e baixos (negativos) das diferenças entre os métodos estariam equitativamente dispersos conforme as frequências esperadas para cada um dos nove grupos de associação gerados. Assim,

obtiveram-se os valores de  $\chi^2_{\text{calc.}}$ . Conforme a Tabela 15 do Anexo, para cada uma das associações testadas. A partir dos valores obtidos, concluiu-se que diferentes níveis de teor em lactose do leite possuem uma associação estatisticamente significativa com as diferenças entre os métodos de quantificação de PB ( $\chi^2_{\text{calc.}} = 14,46 > \chi^2_{\text{crítico}} = 9,49$ ), sendo que foi observada a tendência de valores mais altos de lactose estarem associados à diminuição da frequência de diferenças tipicamente positivas e ao aumento da frequência das diferenças tipicamente negativas e valores mais baixos de lactose estarem associados a uma diminuição da frequência de diferenças tipicamente negativas, mas pouca associação com diferenças tipicamente positivas. Entre os métodos. Estas quatro associações responderam sozinhas por um  $\chi^2$  de 11,20 (significativo), em um total de 14,46.

Não foram constatadas associações significativas das diferenças na quantificação da PB entre os métodos MRK e EIVM com os teores em gordura e NNP. Em relação aos próprios componentes das diferenças entre os métodos, os teores de PB por MRK e por EIVM, não foi encontrada associação estatisticamente significativa das diferenças com os teores em PB obtidos por MRK, ( $\chi^2_{\text{calc.}} = 4,77 < \chi^2_{\text{crítico}} = 9,49$ ), mas o sendo com os teores em PB obtidos por EIVM ( $\chi^2_{\text{calc.}} = 25,18 > \chi^2_{\text{crítico}} = 9,49$ ), mostrando ser a diferença

entre os métodos mais influenciada pela resposta instrumental que pela resposta por análise química.

Estabeleceu-se um estudo das respostas relativas aos teores em gordura, lactose e PB por EIVM, PB por MRK e as diferenças entre os dois métodos de quantificação de PB, baseando-se em procedimentos exploratórios de análise multivariada, com o intuito de se observarem as interações entre aquelas respostas de uma maneira analítica e quantitativa. A análise de componentes principais, ferramenta da análise multivariada, é indicada para conjuntos de medidas correlacionadas linearmente, o que permite reduzi-las a poucas variáveis sintéticas denominadas componentes principais, que se relacionam por meio de disposições vetoriais em eixos (CP1, CP2, CP3, etc.) que representam as variações observadas entre os dados. Os eixos são extraídos de modo que o primeiro explica a maior parte da variação, o segundo explique a maior parte da variância residual e assim sucessivamente, de modo que os eixos não são correlacionados e podem ser considerados como vetores independentes.

Quanto maior for a correlação entre as medidas originais, maior é a parcela de variação explicada pelos eixos principais (Prado d d., 2002).

Adotou-se o critério de teste de associação de variáveis que proporcionasse a obtenção de uma proporção acumulada nos três primeiros eixos do plano cartesiano igual ou superior a 0,70, ou seja, os três eixos respondendo juntos por pelo menos 70% das variações observadas.

A análise multivariada por componentes principais do conjunto das respostas de teor em lactose, gordura e sólidos totais obtidos por EIVM originou a disposição vetorial demonstrada na Figura 22. O grau de inércia da análise obtido a partir dos autovalores foi de uma proporção acumulada de 0,97 nos três primeiros eixos, sendo que o primeiro respondeu por 47%, o segundo por 33% e o terceiro por 17% das variações. Os resultados da análise de componentes principais desta avaliação encontram-se descritos nas Tabelas 16 a 20 do Anexo.

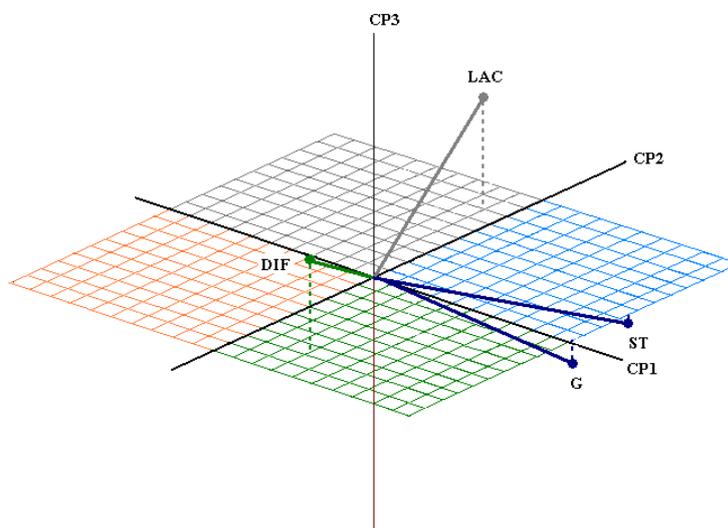


Figura 22. Disposição vetorial nos eixos CP1, CP2 e CP3 das respostas de associação dos teores em lactose, gordura e ST de leite cru por EIVM com as diferenças entre os dois métodos de quantificação de PB, obtida por análise multivariada das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de Minas Gerais.

Observou-se por meio da disposição cartesiana que o teor em lactose apresentou-se em posição

vetorial resultante antagônica nos eixos CP1 e CP2 à posição das diferenças entre os dois

métodos de quantificação da PB. A gordura, por sua vez, apresentou-se levemente relacionada (sinergismo) com as diferenças na resultante vetorial dos três eixos. Os ST, com vetor em ângulo próximo a 45° com o vetor das diferenças, demonstrou pouca relação com estas últimas. É importante esclarecer que disposições antagônicas de respostas são aquelas que aumentando contribuem para a diminuição do valor da outra. As conclusões obtidas com a análise multivariada mostraram-se compatíveis com as inferências extraídas da análise por tabela de contingência (distribuição qui-quadrado), demonstrando, fora os componentes da própria diferença (PB por MRK e PB por EIVM), ser o teor em lactose do leite que mais interagiu com as diferenças entre os dois métodos de quantificação da PB.

Procedendo-se a análise multivariada do conjunto das respostas dos teores do leite em PB quantificados por EIVM e por MRK e as diferenças entre estes dois métodos, obtiveram-se os dados contidos nas Tabelas 21 a 25 do Anexo, que deram origem à disposição vetorial demonstrada na Figura 23. O grau de inércia da

análise obtido a partir dos autovalores foi de uma proporção acumulada de 100% nos dois primeiros eixos, sendo que o primeiro respondeu por 61%, e o segundo por 39% das variações. A inércia já obtida no segundo plano cartesiano foi decorrente em primeiro, pelo número reduzido de variáveis em associação e em segundo, em razão da forte associação entre as variáveis, já que os teores em PB do leite por MRK e por EIVM são elementos que matematicamente formam as diferenças entre os dois métodos de quantificação da PB. A partir da Figura 23, nota-se que PB por EIVM (PB IV) apresenta antagonismo com as diferenças (DIF) entre os métodos, por se encontrarem em planos cartesianos opostos. O mesmo não se observa com PB por MRK, que apresenta associação muito fraca com as diferenças. Estes resultados mostram-se compatíveis com aqueles encontrados empregando-se a tabela de contingência (qui-quadrado) em que teores em PB por EIVM categorizados em altos, baixos e médios teores apresentaram associação significativa com as diferenças entre os métodos, enquanto teores em PB por MRK não apresentaram.

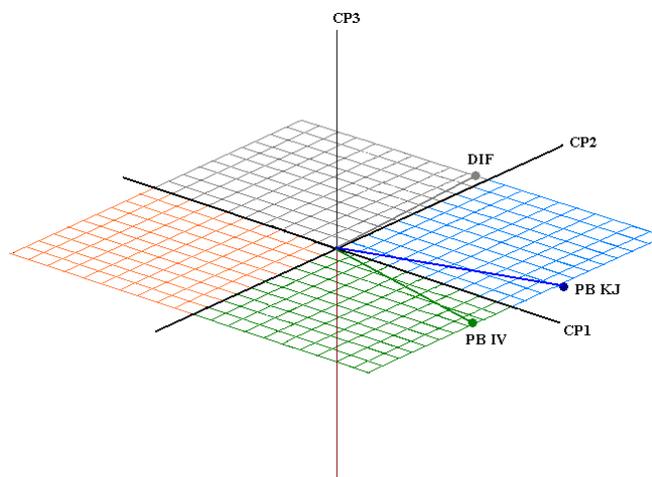


Figura 23. Disposição vetorial nos eixos CP1, CP2 e CP3 das respostas de associação dos teores em PB por EIVM e PB por MRK com as diferenças entre os dois métodos de quantificação de PB, obtida por análise multivariada das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de Minas Gerais. As abreviaturas PB KJ e PB IV referem-se respectivamente às respostas de teor em PB do leite obtidas por MRK e PB IV.

Na tentativa de se estabelecer uma associação da calibração dos EIM com as diferenças entre os dois métodos de quantificação da PB,

elaborou-se uma tabela de distribuição de frequências das diferenças entre os métodos MRK e EIVM na quantificação da PB em três

classes, conforme critério já descrito anteriormente com participação de 33% dos dados em cada classe (Tabela 26 do Anexo). Observou-se uma forte associação da tendência (valores positivos, médios ou próximos a zero e valores negativos) das diferenças entre os métodos com calibração realizada ( $\chi^2_{\text{calc}} = 103,177 > \chi^2_{\text{crítico}} = 18,31$ ) para probabilidade do erro tipo I igual a 0,05 e 29,59 para a probabilidade do erro tipo I igual a 0,001). Concluiu-se que a calibração foi um fator associado à tendência das diferenças

apresentarem valores predominantemente positivos (PB por MRK > PB por EIVM) e negativos (PB por MRK < PB por EIVM).

A Tabela 19 descreve, por calibração realizada do EIM, os parâmetros das equações de regressão, inclinação e intercepto, e respectivos coeficientes de correlação e determinação, referentes aos teores em PB obtidos por MRK e EIVM. Observou-se que as médias das diferenças variou entre as calibrações realizadas, inclusive com valores positivos e negativos.

Tabela 19. Parâmetros de avaliação das equações de regressão obtidas por associação entre os teores em PB obtidos por Kjeldahl e EIVM, por calibração realizada do EIM e indicação de respectivas médias das diferenças entre os dois métodos (referente a um total de 200 amostras de leite de tanque de refrigeração).

Calibração realizada	n	Inclinação	Intercepto	r	r <sup>2</sup>	Diferenças médias
01	11	0,7527	0,8057	0,8447	0,7135	0,0361
02	42	0,9273	0,286	0,8981	0,8065	-0,0627
03	19	0,8973	0,2572	0,9172	0,8413	0,0592
04	64	0,8093	0,5374	0,8974	0,8053	0,0648
05	34	1,0067	0,0293	0,9545	0,9111	-0,0501
06	30	0,9152	0,1715	0,8701	0,7570	0,0914

Realizou-se também uma análise de componentes principais por meio da análise multivariada (Tabelas 27 a 31 do Anexo), com o objetivo de verificar a associação do NNP, em combinação com a gordura e os SNG (estes representando a PB e a lactose juntas quantificadas por EIVM) com as diferenças entre os dois métodos de quantificação da PB. Obteve-se uma inércia de 0,85 a partir dos autovalores dos três primeiros planos

cartesianos, o primeiro, segundo e terceiro eixos representando respectivamente 38%, 26% e 21% das variações. Na Figura 24 encontra-se explicitada a disposição espacial dos vetores nos três eixos, em que se observou a disposição antagônica dos SNG e a relação positiva da gordura e mais fracamente positiva do NNP em relação às diferenças entre os dois métodos de quantificação da PB.

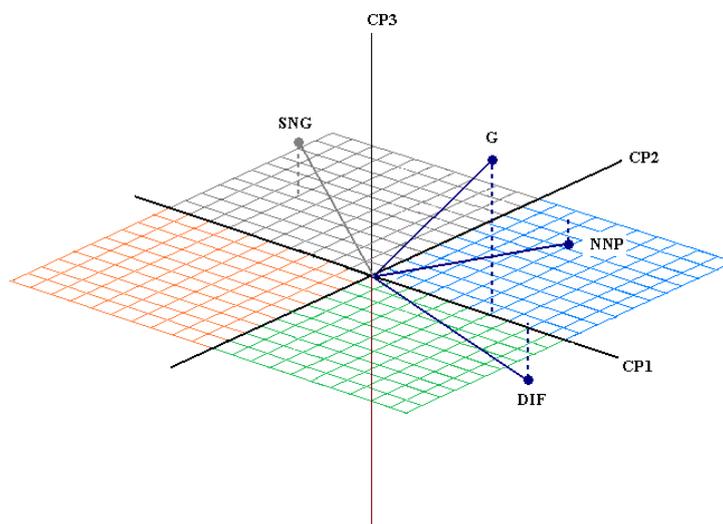


Figura 24. Distribuição espacial dos vetores CP1, CP2 e CP3 extraídos da análise multivariada dos componentes principais, sendo estes os SNG, gordura (G), NNP e diferença entre métodos MRK e EIVM de quantificação da PB (DIF), a partir de dados de análise em 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de Minas Gerais.

A interferência da composição do leite cru refrigerado reforça a necessidade de as amostras de calibração dos equipamentos de EIVM empregados no Brasil na análise de leite cru serem elaboradas com distribuição de macromoléculas que reflita a composição do leite brasileiro e até mesmo, se necessário, de determinadas regiões dentro do país. Não foi observada a ação preponderante do NNP sobre as diferenças entre os métodos de quantificação de PB, possivelmente em função do confundimento gerado pelos outros fatores mais atuantes na redução da acurácia do método de análise da PB do leite por EIVM.

### 5.5 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DO SORO TRICLOROACÉTICO SOBRE A DETERMINAÇÃO DO NNP

Os dados obtidos de NNP da análise das 16 amostras de soro congeladas a uma temperatura de  $-15^{\circ}$  a  $-18^{\circ}\text{C}$  por 90 dias ( $t = 90$  dias) e respectivas amostras analisadas logo após a obtenção do soro ( $t = 0$  dias) foram submetidos à análise de variância de dois fatores (amostra e

tempo) com nível de significância  $\alpha$  igual a 0,05, produzindo-se os resultados conforme a Tabela 32 do Anexo.

Pelo teste t de Student não foi encontrada diferença significativa ( $P = > 0,05$ ) entre o grupo de soro tricloroacético analisado logo após a precipitação e filtração e após congelamento por 90 dias.

### 5.6 TESTES DE RECUPERAÇÃO REFERENTES AO MÉTODO DE REFERÊNCIA

Empregando-se o triptofano e a hidroxiprolina nos testes de recuperação para avaliar a digestão e a destilação do método de Kjeldahl (IDF, 1993), e o sulfato de amônio para avaliar a destilação (IDF, 1993) obtiveram-se os resultados dispostos na Tabela 20, com valores em conformidade com as especificações estabelecidas pela norma International IDF Standard 20B:1993. O valor mínimo de recuperação do nitrogênio do triptofano e do sulfato de amônio, estabelecido por aquela norma é de respectivamente, 98% e 99%.

A partir dos dados obtidos (Tabela 20), observou-se que o sistema semi-automático de quantificação do nitrogênio no leite operou de acordo com as especificações estabelecidas pela

norma International IDF Standard 20B:1993 (IDF, 1993), com recuperações superiores a 98% para o aminoácido triptofano e superiores a 99% para o sulfato de amônio.

Tabela 20. Valores de recuperação do nitrogênio obtidos para o método de Kjeldahl, empregado em sistema de digestão por bloco e destilação automatizada, proporcionados pelo equipamento Kjelttec® 2200 (Foss A/S, Dinamarca).

Substância	Data do ensaio	Recuperação mínima* média (%)	Recuperação máxima* média (%)	Especificação segundo IDF (1993)
Triptofano	19/08/2005	98,65	99,64	Mínimo 98%
Triptofano	09/09/2005	98,46	99,46	
Triptofano	18/10/2005	98,32	99,31	
Hidroxiprolina	27/09/2005	98,57	99,57	Sem especificação
Hidroxiprolina	03/10/2005	98,53	99,52	
Hidroxiprolina	18/10/2005	98,52	99,52	
Hidroxiprolina	19/08/2005	98,19	99,20	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	09/09/2005	99,05	100,05	Mínimo 99%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18/10/2005	99,21	100,21	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19/08/2005	99,07	100,07	

\* Recuperação máxima e mínima calculadas a partir da pureza mínima de 99% e máxima de 100% dos compostos nitrogenados empregados. As médias foram calculadas em triplicata por data de ensaio.

## 5.7 VARIAÇÕES ENTRE PARÂMETROS

### 5.7.1 Variações associadas à CCS

Distribuindo os resultados de CCS do leite dos 200 tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais em dois grupos ( $\leq 400.000$  células/mL e  $> 400.000$  células/mL) e comparando-se os dois grupos frente aos demais

parâmetros analisados, obtiveram-se os resultados dispostos na Tabela 21. O valor  $400.000$  CCS/mL corresponde àquele adotado pela CEE (Comunidade Econômica Européia) como nível de aceitação da contagem de células/mL no leite cru refrigerado, a ser considerado em todo o Brasil a partir de 2012 (Brasil, 2002<sup>a</sup>) e pouco superior à média geométrica das 200 amostras analisadas ( $346,5 \times 10^3$  células/mL).

Tabela 21. Comparação entre médias dos parâmetros obtidos por análise de 200 amostras representativas de leite cru de tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais, dos grupos 1 (CCS ≤ 400.000 células/mL) e grupo 2 (CCS > 400.000 células/mL)

Parâmetro	Método	n1	n2	Média grupo 1	Média grupo 2	CV (%)
SNG (% m/m)	EIVM	106	94	8,687 <sup>a</sup>	8,544 <sup>b</sup>	2,83
Lactose (% m/m)	EIVM	106	94	4,597 <sup>a</sup>	4,500 <sup>b</sup>	3,21
Sólidos totais (% m/m)	EIVM	106	94	12,055 <sup>a</sup>	12,097 <sup>a</sup>	3,71
Contagem padrão de microrg. (log <sub>10</sub> UFC/mL)	Citometria de fluxo	106	94	5,154 <sup>a</sup>	5,226 <sup>a</sup>	16,21
Proteína bruta (% m/m)	EIVM	106	94	3,088 <sup>a</sup>	3,104 <sup>a</sup>	5,53
Gordura (% m/m)	EIVM	106	94	3,371 <sup>b</sup>	3,556 <sup>a</sup>	11,74
NNP/NT (%)	-	106	94	5,383 <sup>a</sup>	5,304 <sup>a</sup>	18,00
NNP (mg/100g)	Kjeldahl	106	94	0,026 <sup>a</sup>	0,026 <sup>a</sup>	18,19
Proteína bruta (% m/m)	Kjeldahl	106	94	3,096 <sup>a</sup>	3,132 <sup>a</sup>	5,39
Proteína verdadeira (% m/m)	Kjeldahl (indireto)	106	94	2,930 <sup>a</sup>	2,966 <sup>a</sup>	5,59

Médias seguidas de letras distintas nas linhas indicam valores estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.

Observou-se que os SNG e a lactose apresentaram médias estatisticamente diferentes entre os dois níveis de CCS/mL. Observou-se redução de 1,6% no teor em SNG e de 2,1% no teor em lactose. Estes resultados estão em conformidade com as alterações do teor em lactose previsíveis em casos de mastite clínica ou subclínica. Como a mastite provoca um aumento da concentração de cloreto de sódio no leite, este fato inibe a secreção de lactose, consequência da necessidade natural de se manter o equilíbrio osmótico do complexo, uma vez que a lactose, junto com os íons sódio, potássio e cloreto, são em conjunto responsáveis pela manutenção da pressão osmótica no

sistema mamário (Fox & McSweeney, 1998). Observou-se diferença significativa entre os grupos quanto ao teor em gordura, apresentando maior teor de gordura aqueles com maior contagem de CCS. As frações nitrogenadas do leite analisadas não apresentaram variação associada à variação da CCS em termos absolutos. Entretanto, expressando os teores de proteína bruta e proteína verdadeira em percentuais de sólidos totais e sólidos não gordurosos observaram-se diferenças estatisticamente significativas nos resultados percentuais de PB e PV nos SNG entre as duas classes de CCS, conforme demonstrado pela Tabela 22.

Tabela 22. Comparação de médias de percentuais de participação da PB e PV respectivamente nos ST e SNG em distribuição pelas classes de CCS ( $\leq 400.000$  células/mL e  $> 400.000$  células/mL)

Parâmetro (%)	Classe 1	Classe 2	CV (%)
	$\leq 400.000$ células/mL	$> 400.000$ células/mL	
PB/ST	25,61 <sup>a</sup>	25,64 <sup>a</sup>	4,71
PB/SNG	35,51 <sup>a</sup>	36,30 <sup>b</sup>	3,82
PV/ST	24,31 <sup>a</sup>	24,53 <sup>a</sup>	4,69
PV/SNG	33,73 <sup>a</sup>	34,72 <sup>b</sup>	4,47

Médias seguidas de letras distintas nas linhas indicam valores estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.

Alguns sistemas de pagamento de leite pela qualidade adotados no Brasil baseiam-se em enquadramento dos resultados analíticos do leite em classes de qualidade, especialmente por meio da combinação dos resultados obtidos dos teores em PB, gordura, SNG ou ST e CCS e contagem indireta de microrganismos a  $30^{\circ}\text{C}/72$  horas. Quando ST ou sobretudo SNG são parâmetros empregados no PPQ, o teor em PB do leite deveria ser adotado como parâmetro de qualidade na forma de sua participação relativa nos ST ou nos SNG e não na forma de seu teor absoluto, evitando-se bonificação em base de parâmetros com grande associação. É importante citar que, por exemplo, aumentos obtidos no teor em SNG do leite de rebanhos devem-se principalmente ao aumento no teor em proteína e não em lactose. Portanto, bonificações atribuídas aos SNG seriam praticamente concedidas em duplicata em razão da bonificação concedida resultante do aumento do teor em PB. Entretanto, bonificando-se o leite pelo teor em SNG e em percentual de PB nos SNG não se corre este risco. Raciocínio idêntico se aplica à gordura em relação aos ST.

Procedendo-se uma análise multivariada de

componentes principais entre CCS e teores em lactose, SNG e gordura quantificados por EIVM e PB por MRK, obteve-se o gráfico conforme Figura 25, por meio do qual se vê pela disposição vetorial em três planos cartesianos a associação entre estes parâmetros. A CCS apresentou um nítido antagonismo com a lactose e uma associação sinérgica com a gordura. Menos associados à CCS foram a PB e os SNG, que por outro lado mostraram forte associação sinérgica entre si. Nesta análise multivariada (Tabelas 33 a 37 do anexo), a inércia do modelo foi de 0,84, ou seja, os três planos cartesianos explicaram 84% das variações, sendo 37% explicado pelo primeiro, 29% pelo segundo e 17% pelo terceiro.

O antagonismo da lactose e o sinergismo da gordura com a CCS apresentaram-se em conformidade com a comparação de médias entre os dois grupos de CCS anteriormente descrita e discutida. O sinergismo entre PB e SNG deve-se ao fato de o aumento do teor em PB do leite ser o maior responsável pelo aumento do teor em SNG, em comparação com a lactose que é pouco variável.

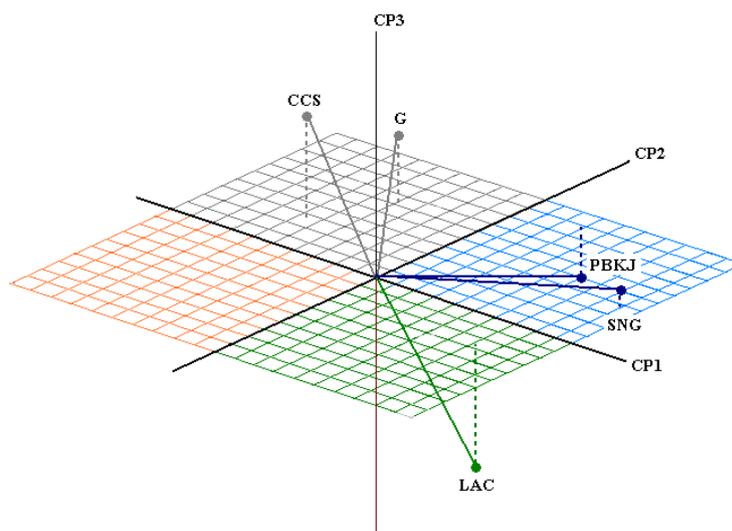


Figura 25. Disposição vetorial de CCS, PB analisada por MRK (PB KJ), SNG, gordura e lactose analisados por EIVM, a partir de dados obtidos da análise multivariada de componentes principais dos resultados de análise das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais.

### 5.7.2 Variações associadas à produção média diária

As amostras coletadas em 200 tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais apresentaram distribuição percentual das raças de 0,5% Gir leiteiro, 78,3% Girolando, 1,0% Holandês + Nelore, 0,5% de Holandês + Girolando, 9,1% de Holandês, 1,0% de Girolando + Jersey e 0,5% de Girolando +

Pardo suíço, 1% Jersey, 7,6% mestiço e 0,5% Zebu mestiço. Dividindo-se as amostras coletadas de leite cru dos 154 tanques de refrigeração de propriedades com criação de gado Girolando em quatro classes de produção média diária de leite dos respectivos rebanhos (0 a 100 litros; 101 a 200 litros; 201 a 400 litros e > 400 litros), observaram-se associações com os parâmetros de composição conforme demonstrado pela Tabela 23.

Tabela 23. Comparação de médias dos parâmetros de qualidade do leite considerando 4 classes de produção média diária de leite em propriedades com criação de girolando (154 tanques de refrigeração amostrados).

Variável	Classe 1 0 a 100 litros/dia	Classe 2 101 a 200 litros/dia	Classe 3 201 a 400 litros/dia	Classe 4 > 401 litros/dia	CV (%)
CP microrganismos log <sub>10</sub> (UFC/mL) <sup>1</sup>	5,55 <sup>a</sup>	5,39 <sup>a</sup>	5,17 <sup>a,b</sup>	4,81 <sup>b</sup>	15,35
CCS - log <sub>10</sub> (CCS/mL) <sup>2</sup>	5,53 <sup>a</sup>	5,55 <sup>a</sup>	5,56 <sup>a</sup>	5,60 <sup>a</sup>	6,41
SNG (EIVM) <sup>2</sup> (% m/m)	8,61 <sup>a</sup>	8,63 <sup>a</sup>	8,62 <sup>a</sup>	8,56 <sup>a</sup>	3,08
Lactose (EIVM) <sup>2</sup> (% m/m)	4,54 <sup>a</sup>	4,56 <sup>a</sup>	4,51 <sup>a</sup>	4,56 <sup>a</sup>	3,61
ST (EIVM) <sup>2</sup> (% m/m)	12,01 <sup>a</sup>	12,11 <sup>a</sup>	11,99 <sup>a</sup>	12,03 <sup>a</sup>	3,68
PB (EIVM) <sup>2</sup> (% m/m)	3,11 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	3,07 <sup>a</sup>	5,64
PB (MRK) <sup>2</sup> (% m/m)	3,10 <sup>a</sup>	3,12 <sup>a</sup>	3,12 <sup>a</sup>	3,08 <sup>a</sup>	5,45
Gordura (EIVM) <sup>2</sup> (% m/m)	3,40 <sup>a</sup>	3,49 <sup>a</sup>	3,37 <sup>a</sup>	3,48 <sup>a</sup>	11,88
NNP/NT <sup>1</sup> (%)	5,27 <sup>a,b</sup>	4,99 <sup>b</sup>	5,50 <sup>a</sup>	5,62 <sup>a</sup>	16,96
NNP <sup>1</sup> (mg/100 g)	26,56 <sup>a,b</sup>	24,37 <sup>b</sup>	26,82 <sup>a</sup>	27,23 <sup>a</sup>	17,52
PV (MRK) <sup>2</sup> (% m/m)	2,93 <sup>a</sup>	2,96 <sup>a</sup>	2,95 <sup>a</sup>	2,91 <sup>a</sup>	5,57

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) pelos testes: 1: Teste t de Student; 2: Teste de Tukey.

Observou-se que o nível de produção média diária de leite influenciou a obtenção de diferentes médias de contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas, apresentando as propriedades com produção diária média de 0 a 100 litros uma contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas de 355.000 UFC/mL, contra 65.000 UFC/mL nas propriedades com produção diária média superior a 400 litros. Outrossim, o NNP (% m/m) e o NNP/NT (%) mostraram-se influenciados pelo nível de produção médio diário da propriedade, apresentando maiores níveis de NNP/NT as propriedades com produção de 201 a 400 litros de leite (média de 5,50%) e superior a 400 litros (média de 5,62%). O menores níveis foram encontrados nas propriedades com produção diária de 101 a 200 litros de leite (média de 4,99%).

Realizou-se uma análise exploratória por meio da análise multivariada de componentes principais dos dados de contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas, gordura, produção média diária, CCS, ST e PB analisada por MRK, encontrando-se os dados compilados

nas Tabelas 38 a 42 do Anexo. A inércia da análise foi de 0,74 nos três primeiros eixos cartesianos (CP1, CP2 e CP3), sendo que o primeiro respondeu por 37%, o segundo por 21% e o terceiro por 16% das variações (Figura 26). Notou-se forte associação sinérgica entre ST com PB e gordura, como era de se esperar, face à composição dos ST por estes componentes do leite. Observou-se também que produção média diária de leite apresentou antagonismo com a contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas, como revelado pela análise de variância dos resultados entre grupos de categorização da produção média diária de leite (Tabela 23). Além disso, observou-se que CCS apresentou associação levemente sinérgica com gordura (mesmo octante) e sem associação considerável com produção de leite. Nota-se claramente que em relação à produção média diária de leite da propriedade, a contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas é a mais prontamente influenciada (em relação antagonística), seguida da CCS e gordura (em relação sinérgica), dos ST e da PB.

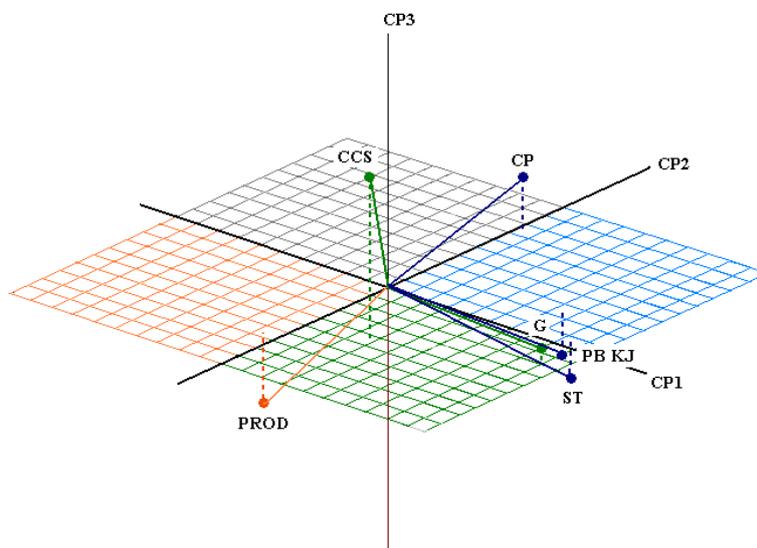


Figura 26. Disposição vetorial de CCS, contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas (CP), PB analisada por MRK, gordura (G), lactose (LAC) e ST analisados por EIVM, a partir de dados obtidos da análise multivariada dos resultados de análise das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais.

Em relação ao teor em NNP do leite associado à produção diária média da propriedade, aquelas com maior produção apresentaram maiores níveis de NNP (médias estatisticamente equivalentes de 27,23 mg/100 g e 26,82 mg/100 g, respectivamente às classes de > 400 litros e 201 a 400 litros de leite), apresentando menor teor médio em NNP do leite aquelas propriedades com produção média diária de 101 a 200 litros.

Esta relação sinérgica entre NNP e produção média diária de leite pode estar relacionada com maior fornecimento de fontes nitrogenadas ao rebanho, em função de melhores condições de manejo, aumentando o teor de síntese protéica e excesso de amônia ruminal, e conseqüentemente maior conversão de amônia a uréia no fígado, e maior excreção deste composto nos fluidos corporais, inclusive o leite (Barros, 2002; Wattiaux, 2006). Por outro lado, amostras representativas de leites de tanques de refrigeração de propriedades com menor produção média diária de leite (101 a 200 litros/dia) apresentaram em média teor em NNP do leite menor que aquele das classes 3 e 4 de produção média diária de leite (Tabela 23). Isto pode estar associado a uma situação de equilíbrio entre energia e nitrogênio fornecidos aos animais. Em contrapartida, referindo-se à classe 1 de menor produção média diária de leite (1 a 101 litros/dia) há um deslocamento antagônico da média do teor em NNP (26,56

mg/100 g de leite) para valores intermediários comuns às classes 2 e 3, o que pode ser relacionado a uma deficiência energética dos rebanhos, com conseqüente produção de energia a partir de aminoácidos da reserva corpórea, e produção de uréia, sendo esta excretada pelos fluidos corporais (Barros; 2002; Wattiaux, 2006).

A análise multivariada de componentes principais realizada com os dados de produção média diária de leite, teores em NNP, PB por MRK e gordura por EIVM do leite proporcionou uma inércia de 0,84 nos três eixos cartesianos, sendo as variações de 35%, 29% e 21% apresentadas respectivamente pelos primeiro, segundo e terceiro eixos cartesianos (Tabelas 43 a 47 do anexo). A projeção vetorial das correlações com as variáveis originais encontra-se demonstrada na Figura 27, na qual se observa uma associação moderadamente sinérgica nos dois primeiros eixos entre gordura e proteína e outra associação entre produção e NNP, também, moderadamente sinérgica nos dois primeiros eixos, o que é compatível com o indicado pela comparação de médias de teores em NNP do leite entre classes de produção diária média de leite da propriedade associada ao tanque de refrigeração, com redução observada da classe 4 (> 400 litros/dia) para a classe 2 (101 a 200 litros/dia). Em uma visão geral dos vetores resultantes, não foi observado nenhum antagonismo entre as repostas.

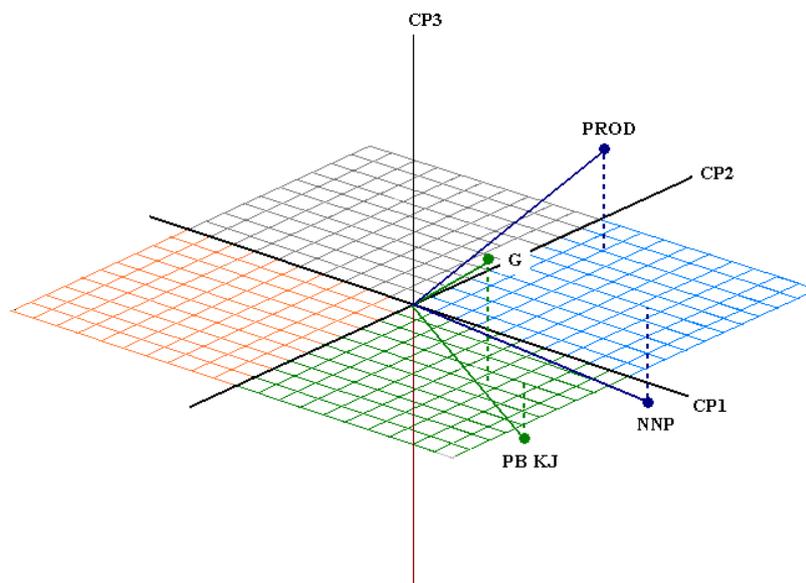


Figura 27. Disposição vetorial de produção média diária de leite (PROD), NNP, gordura (G) e PB por MRK (PB KJ), a partir de dados obtidos da análise multivariada dos resultados de análise das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de propriedades rurais de Minas Gerais.

## 5.8 AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE URÉIA AO LEITE NA RESPOSTA DE PROTEÍNA BRUTA ANALISADA POR EIVM

### 5.8.1 Interferência da adição de uréia na resposta do teor em proteína bruta por EIVM

Avaliando-se os resultados por análise de

variância (Sampaio, 2002) de dois fatores (amostra e concentração) obtidos de PB nos quatro grupos com diferentes quantidades de uréia adicionada, ou seja, C0, C1, C2, C3, respectivamente com adição de uréia na concentração final do leite de 0% m/m, 0,0723% m/m, 0,1445% m/m e 0,2891% m/m, foram obtidas as médias e demais parâmetros de cálculo estatístico conforme a Tabela 24.

Tabela 24. Parâmetros de cálculo estatístico de PB dos quatro grupos experimentais resultantes de diferentes concentrações de uréia adicionada ao leite.

Grupo experimental	Concentração de uréia adicionada (% m/m)	Número de amostras	PB média (% m/m)	Soma	Soma dos quadrados
C0	0	32	3,1981	102,3399	327,7733
C1	0,0723	32	3,2237	103,1598	333,0278
C2	0,1445	32	3,2568	104,2189	339,9112
C3	0,2891	32	3,3179	106,1723	352,7355

Pela análise de variância de dois fatores (grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras), foram comparadas as médias relativas aos quatro tratamentos (Tabela 48 do Anexo).

Com uma diferença mínima significativa pelo

teste t de Student (Sampaio, 2002) de 0,00459 e de 0,00338 pelo teste de Tukey entre as médias de cada um dos grupos com diferentes teores em uréia adicionada, observou-se que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os teores em PB dos quatro grupos experimentais pelo teste de Tukey (Tabela 25).

Tabela 25. Quadro de médias das respostas de PB analisada por EIVM dos quatro grupos experimentais relativos ao teor em uréia adicionada ao leite.

Grupo experimental	Concentração de uréia adicionada ao leite (% m/m)	Número de amostras	Média
C0	0	32	3,1981 <sup>d</sup>
C1	0,0723	32	3,2237 <sup>c</sup>
C2	0,1445	32	3,2568 <sup>b</sup>
C3	0,2891	32	3,3179 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na coluna das médias indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

O aumento teórico esperado nos teores em PB baseando-se no aumento do teor em nitrogênio nas amostras com concentrações finais de uréia adicionada ao leite de 0%, 0,0723%, 0,1445% e 0,2891% m/m, são demonstrados na Tabela 26. A concentração final de equivalente-proteína

adicionado reflete o aumento esperado no teor em PB com a adição de uréia. Na mesma tabela observa-se efetivamente o quanto em média foi observado de aumento no teor em PB por análise do leite por EIVM.

Tabela 26. Relação entre os valores teóricos esperados do aumento do teor em PB (por análise por Kjeldahl) de leites adicionados de quantidades conhecidas de uréia e o aumento real encontrado por análise por EIVM.

Concentração final de uréia adicionada ao leite (% m/m)	Valores teóricos esperados (Kjeldahl)		Valor real por EIVM
	*Aumento teórico do NT adicionado ao leite por meio da uréia (% m/m)	*Aumento teórico do equivalente-proteína adicionado ao leite por meio da uréia (% m/m), equivalente a NT adicionado pela uréia x 6,38	Aumento médio do teor em PB no leite observado por análise por EIVM (% m/m)
0,0723	0,03373	0,2152	0,0256
0,1445	0,06746	0,4304	0,0587
0,2891	0,13492	0,8608	0,1198

Nota: (\*) Cálculos teóricos considerando uréia com 100% de pureza e um teor de 46,646% em nitrogênio na uréia.

Observou-se, portanto, que a uréia apresentou absorção da radiação de comprimento de onda de quantificação da proteína, o que já havia sido observado por Grappin (1992) e demonstrado na Figura 4. Observou-se também que o aumento do teor em PB foi de aproximadamente 13% daquele esperado para o aumento do teor em PB

pela relação  $PB = NT \times 6,38$ .

Estabelecendo-se uma análise de regressão entre os dados de % m/m de uréia adicionada ao leite e a variação realmente observada na % m/m de PB analisada por EIVM, e conseqüentemente realizando-se a análise de variância, obtêm-se

respectivamente os dados demonstrados pela Tabela 27 e o gráfico de dispersão demonstrado pela Figura 28. O modelo apresentou uma boa capacidade de previsão, com coeficiente de determinação de 0,9676. Por outro lado, a razão entre as variâncias da regressão e do erro ( $F_{\text{calc}}$ ) apresentou valor de 2.809,29, superior ao  $F_{\text{crítico}}$  de 3,96 (com 1 e 92 graus de liberdade),

condizente com uma inclinação da curva de regressão diferente de zero. O valor calculado de F resultante da razão entre as variâncias da falta de ajuste e do erro foi equivalente a 1,40, inferior ao valor de  $F_{\text{crítico}}$  de 3,11 (com 2 e 92 graus de liberdade), conduzindo para uma falta de ajuste da regressão não importante.

Tabela 27. Análise de variância da regressão entre os dados de % m/m de uréia adicionada ao leite e a variação realmente observada na % m/m de PB analisada por EIVM.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	95	0,15080			
Regressão	1	0,14591	0,14591	2809,29	0,000
Falta de ajuste	2	0,00014	0,00007	1,40	0,251
Erro	92	0,00474	0,00005		

Nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

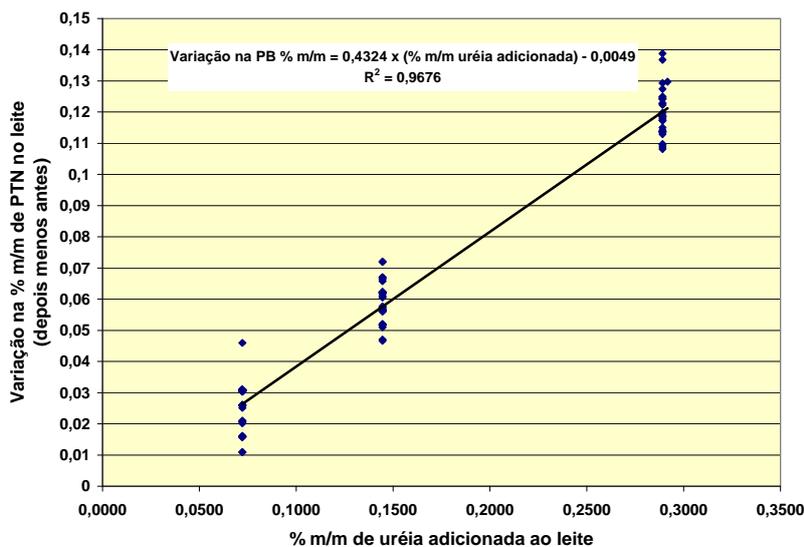


Figura 28. Dispersão entre os dados de % m/m de uréia adicionada ao leite e a variação realmente observada na % m/m de PB analisada por EIVM, indicando a equação de regressão obtida e o valor do coeficiente de determinação.

### 5.8.2 Interferência da adição de uréia na resposta do teor em gordura por EIVM

Avaliando-se os resultados por análise de variância (Sampaio, 2002) de dois fatores (amostra e concentração final de uréia após adição) obtidos de gordura nos quatro grupos

com diferentes quantidades de uréia adicionada, ou seja, C0, C1, C2, C3, respectivamente com adição de uréia na concentração de 0% m/m, 0,0723% m/m, 0,1445% m/m e 0,2891% m/m, foram obtidas as médias e demais parâmetros de cálculo estatístico conforme a Tabela 28.

Tabela 28. Parâmetros de cálculo estatístico de gordura dos quatro grupos experimentais resultantes de quatro diferentes concentrações de uréia adicionada ao leite cru.

Grupo experimental	Concentração de uréia adicionada (% m/m)	Número de amostras	Gordura média (% m/m)	Soma	Soma dos quadrados
C0	0	32	3,671	117,472	443,307
C1	0,0723	32	3,666	117,312	442,004
C2	0,1445	32	3,640	116,467	435,714
C3	0,2891	32	3,639	116,450	435,532

Pela análise de variância de dois fatores (Grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras), foram comparadas as médias relativas aos quatro tratamentos (Tabela 49 do Anexo).

Com uma diferença mínima significativa (Sampaio, 2002) de 0,0157 pelo teste de Tukey entre as médias de cada um dos grupos com diferentes teores em uréia adicionada, concluiu-se por ambos os testes que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os teores em gordura do leite do grupo sem adição de uréia

(controle) com o primeiro nível de adição de uréia (C1 = 0,0723% m/m), sendo que o teor em gordura do grupo com o segundo nível de adição de uréia (C2 = 0,1445% m/m) é significativamente diferente do grupo com o primeiro nível C1 ( $P < 0,05$ ), e não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os teores em gordura dos grupos com o segundo e terceiro níveis de adição de uréia (C3 = 0,2891% m/m) (Tabela 29). Observou-se que a adição de uréia reduziu a resposta do equipamento em relação à gordura do leite quando analisada por EIVM.

Tabela 29. Quadro de médias das respostas de teores em gordura (% m/m) analisada por EIVM dos quatro grupos experimentais relativos ao teor em uréia adicionada ao leite cru.

Grupo experimental	Concentração de uréia adicionada ao leite (% m/m)	Número de amostras	Média
C0	0	32	3,671 <sup>a</sup>
C1	0,0723	32	3,666 <sup>a</sup>
C2	0,1445	32	3,640 <sup>b</sup>
C3	0,2891	32	3,639 <sup>b</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na coluna das médias indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

### 5.8.3 Interferência da adição de uréia na resposta do teor em lactose por EIVM

Avaliando-se os resultados por análise de variância (Sampaio, 2002) de dois fatores (amostra e concentração final de uréia após adição) obtidos de lactose nos quatro grupos

com diferentes quantidades de uréia adicionada, ou seja, C0, C1, C2, C3, respectivamente com adição de uréia na concentração de 0% m/m, 0,0723% m/m, 0,1445% m/m e 0,2891% m/m, foram obtidas as médias e demais parâmetros de cálculo estatístico conforme a Tabela 30.

Tabela 30. Parâmetros de cálculo estatístico de lactose dos quatro grupos experimentais resultantes de diferentes concentrações de uréia adicionada ao leite.

Grupo experimental	Concentração de uréia adicionada (% m/m)	Número de amostras	Lactose média (% m/m)	Soma	Soma dos quadrados
C0	0	32	4,4558	142,5844	635,5216
C1	0,0723	32	4,4625	142,8001	637,4430
C2	0,1445	32	4,4689	143,0050	639,2677
C3	0,2891	32	4,4735	143,1535	640,5975

Pela análise de variância de dois fatores (grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras), foram comparadas as médias relativas aos quatro tratamentos (Tabela 50 do Anexo e Tabela 31).

Com uma diferença mínima significativa (Sampaio, 2002) pelo teste t de Student de

0,00269 e de 0,00354 pelo teste de Tukey entre as médias de cada um dos grupos com diferentes teores em uréia adicionada, observou-se que há diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no teor em lactose do leite em todos os níveis de adição de uréia ao leite (C1, C2 e C3), inclusive o nível de controle sem adição (C0) (Tabela 31).

Tabela 31. Quadro de médias das respostas de teor em lactose (% m/m) analisada por EIVM dos quatro grupos experimentais relativos ao teor em uréia adicionada ao leite.

Grupo experimental	Concentração de uréia adicionada ao leite (% m/m)	Número de amostras	Média
C0	0	32	4,4558d
C1	0,0723	32	4,4625c
C2	0,1445	32	4,4689b
C3	0,2891	32	4,4735 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na coluna das médias indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

Observou-se que maiores teores em uréia adicionada ao leite aumentam os teores em lactose do leite analisados por EIVM.

#### 5.8.4 Interferência da adição de uréia na resposta do teor em sólidos totais por EIVM

Avaliando-se os resultados por análise de variância (Sampaio, 2002) de dois fatores

(amostra e concentração final de uréia após adição) obtidos de sólidos totais nos quatro grupos com diferentes quantidades de uréia adicionada, ou seja, C0, C1, C2, C3, respectivamente com adição de uréia na concentração de 0% m/m, 0,0723% m/m, 0,1445% m/m e 0,2891% m/m, foram obtidas as médias e demais parâmetros de cálculo estatístico conforme a Tabela 32.

Tabela 32. Parâmetros de cálculo estatístico de sólidos totais dos quatro grupos experimentais resultantes de diferentes concentrações de uréia adicionada ao leite.

Grupo experimental	Concentração de uréia adicionada (% m/m)	Número de amostras	Sólidos totais – média (% m/m)	Soma	Soma dos quadrados
C0	0	32	12,298	393,546	4847,569
C1	0,0723	32	12,334	394,683	4875,464
C2	0,1445	32	12,357	395,423	4893,657
C3	0,2891	32	12,438	398,011	4957,929

Pela análise de variância de dois fatores (grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras) foram comparadas as médias relativas aos quatro tratamentos (Tabela 51 do Anexo; Tabela 32).

Com uma diferença mínima significativa (Sampaio, 2002) de 0,0129 pelo teste de Tukey

entre as médias de cada um dos grupos com diferentes teores em uréia adicionada, concluiu-se que houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no teor em sólidos totais do leite em todos os níveis de adição de uréia ao leite (C1, C2 e C3), inclusive o nível de controle sem adição (C0) (Tabela 33).

Tabela 33. Quadro de médias das respostas de teor em sólidos totais (% m/m) analisada por EIVM dos quatro grupos experimentais relativos ao teor em uréia adicionada ao leite.

Grupo experimental	Concentração de uréia adicionada ao leite (% m/m)	Número de amostras	Média
C0	0	32	12,298d
C1	0,0723	32	12,334c
C2	0,1445	32	12,357b
C3	0,2891	32	12,438 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras diferentes na coluna das médias indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Observou-se que maiores teores em uréia adicionada ao leite aumentam os teores em ST do leite analisados por EIVM.

## 6 CONCLUSÕES

O perfil das amostras de leite cru refrigerado coletadas em 200 propriedades rurais do estado de Minas Gerais quanto ao teor em NT, NNP, NNP/NT, PB, PV, gordura, lactose, ST, SNG, CCS e contagem de microrganismos a 30°C/72 horas foi estabelecido e sumarizado por meio das tabelas 15 e 16. Entre os parâmetros analisados, o NNP foi o que apresentou maior variação, seguido do NNP/NT e da gordura. O que menos apresentou variação foram os SNG, seguidos da lactose e dos ST.

Observou-se que a CCS encontra-se associada à variação da média do teor em SNG e em lactose do leite, apresentando menores teores aquelas propriedades com maiores contagens de CCS. Tanques de leite cru refrigerado de propriedades com maiores contagens de CCS apresentaram menor teor em gordura. Quando o teor em proteína bruta do leite foi expresso em percentual absoluto no leite (% m/m), não houve diferença significativa entre as médias deste parâmetro em função da CCS do leite cru refrigerado das propriedades rurais amostradas, mas observou-se que propriedades com maiores CCS apresentaram maior participação da PB e da PV nos SNG (percentual relativo). A análise multivariada da associação entre os parâmetros de composição, de CCs e de contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas demonstrou antagonismo de resposta entre lactose e CCS, e associação positiva da CCs com a gordura e menos associados à CCS foram a PB e os SNG, entretanto apresentando associação positiva entre si;

As propriedades rurais com menor e maior produção média diária de leite apresentaram respectivamente as maiores e menores contagens de microrganismos a 30°C/72 horas, demonstrando antagonismo entre produção média diária e condição sanitária do leite. Maiores teores médios em NNP e NNP/NT do leite foram encontrados ao mesmo tempo em propriedades com maior (> 401 litros) e menor (0 a 100 litros) produção média diária de leite, e os menor teor médio foi encontrtrado em em propriedades com produção média diária de 101 a 200 litros, o que pode ser associado provavelmente com a maior disponibilidade de nitrogênio na dieta do rebanho nas propriedades com maior produção média diária de leite e déficit energético nas propriedades de menor produção média diária de leite. Não foram observadas associações entre produção média diária de leite da propriedade e CCS, SNG, lactose, ST, PB, gordura e PV. Em relação à produção média diária de leite da propriedade foi demonstrado por meio da análise multivariada forte antagonismo com a contagem de microrganismos, muito fraca associação com ST, PB e gordura e associação positiva com NNP;

A grande variação do teor em NNP do leite cru refrigerado de tanques de referigeração deve ser considerada quando do preparo de amostras de referência para calibração dos equipamentos de EIVM empregado na análise de leites de rebanhos nacionais, por ser uma fonte potencial de erro nas determinações de PB por EIVM, implicando diferenças entre resultados de teores em PB obtidos pelo método de Kjeldahl (método de referência) e por EIVM (método indireto).

Em relação ao cumprimento dos preceitos de qualidade estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51/2002 do MAPA, concluiu-se que a PB é o parâmetro que menos concorre para o não cumprimento daquela norma, enquanto os SNG e a contagem de microrganismos a 30°C/72 horas são os parâmetros em que se observam maiores percentuais de não cumprimento. A relação antagônica entre PB e SNG quanto ao não cumprimento dos padrões de qualidade normativos no Brasil leva à conclusão que baixos teores em lactose contribuem significativamente para o não cumprimento, o que indiretamente relaciona-se com a CCS, já que estes últimos parâmetros apresentam antagonismo: maiores CCS levariam a uma redução do teor em lactose do leite, que por sua vez levaria à redução do teor em SNG. Observou-se uma associação significativa entre produção média diária e atendimento ao mesmo tempo à referida Norma, dos parâmetros gordura, PB, CCS, SNG e contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas, concorrendo para um percentual maior de atendimento as propriedades com produção diária média superior a 200 litros, em comparação com aquelas com produção diária média igual ou inferior a 200 litros.

A quantificação do NNP permitiu a quantificação da PV das amostras de leite cru de tanques de refrigeração, cujos teores apresentaram uma relação linear em relação à PB, representada pela equação  $PV = 0,9671 \times PB - 0,0630$ , sendo os teores expressos em % m/m.

Na quantificação do teor em PB do leite cru, os métodos de quantificação MRK e EIVM apresentaram repetitividade de acordo com especificações da FIL e AOAC. Foram encontradas diferenças significativas entre os teores em PB de leite cru obtidos por análise pelo MRK e por EIVM segundo o protocolo de avaliação previsto pela norma International IDF Standard 128<sup>a</sup>:1999. Uma vez relacionadas ambas as respostas de PB por regressão linear, esta apresentou intercepto diferente de zero, inclinação diferente de 1 e média instrumental de PB (por EIVM) diferente daquele previsto pelo intervalo de confiança dos valores preditos para o método de referência (MRK) calculados a partir da equação de regressão, além de as

diferenças entre os métodos diferirem estatisticamente de zero. Concluiu-se que os teores em lactose e PB por EIVM apresentaram associação significativa com as diferenças entre os resultados dos métodos EIVM e MRK na quantificação do teor em PB do leite e por meio da análise multivariada a gordura demonstrou uma associação positiva com as diferenças. Conclui-se que as diferenças entre os métodos são influenciadas por resultados obtidos por EIVM, ou seja, apresentam justificativa na própria equação de regressão múltipla definida pelo equipamento a partir das análises das amostras de calibração de origem canadense, não em relação à calibração do equipamento, que fora executada de pleno acordo com as recomendações do fabricante do equipamento de EIVM. A literatura consultada cita exaustivamente a necessidade de se preparar amostras de referência de leite para calibração dos EIM com composição típica do leite do país ou até mesmo da região a que os analisadores por EIVM dão suporte analítico, para que seja incorporada à calibração dos EIM as relações típicas regionais de lactose/proteína, lactose/gordura e gordura/proteína e interferentes como citrato e NNP. Em função disto, perdas na acurácia dos EIM podem ocorrer em razão de os fatores de correção da regressão múltipla gerados pela calibração com amostras de composição tipicamente canadense não serem adequados à composição típica do leite brasileiro, seja em razão das raças ou cruzamentos predominantes ou mesmo das diferentes condições nutricionais impostas aos rebanhos e diferentes condições ambientais.

O congelamento do soro de precipitação do leite cru com solução de ácido tricloroacético a 12% m/m pode ser congelado a uma temperatura de -18° a -15°C por 90 dias, descongelado e analisado em seu teor em NNP, sem perda de acurácia em relação ao resultado que seria obtido a partir de análise de NNP no soro obtido no mesmo dia da precipitação.

A uréia adicionada ao leite cru proporciona um aumento significativo do teor em PB, ST e lactose e redução do teor em gordura quando estes são quantificados pelo método de EIVM. Os achados remontam à possibilidade indecorosa de se lançar mão da adição da uréia ao leite para auferir ganhos em sistemas de

pagamento por qualidade ou atendimento a dispositivos normativos, tais como a Instrução Normativa nº 51/2002. Devem ser realizados experimentos adicionais de avaliação da ação da uréia ao leite em outros parâmetros analíticos da qualidade do leite, tais como acidez, depressão do ponto de congelamento, resistência ao álcool, etc., estabelecendo-se associações para a constatação em caso de hipótese de fraude. Entretanto, em sistemas de pagamento de

qualidade, um grande número de amostras são analisadas em um curto período inviabilizando o emprego contínuo de testes morosos. Sugere-se portanto que a RBQL ou qualquer laboratório de análise de leite para fins de pagamento por qualidade ou análise fiscal em cumprimento à Instrução Normativa nº 51/2002 seja suprido com analisadores de uréia de maior capacidade analítica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. *NBR 6023: Informação e documentação – referências – elaboração*. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2002.

ABNT. *NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005.

ANVISA. *Curso Estatística aplicada a laboratórios*. Procedimento GGLAS 02/17025. Habilitação de laboratórios analíticos em saúde segundo os requisitos da ISO/IEC 17025. Brasília: ANVISA-REBLAS, 2005. 83 p.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; ROGERS, G. L.; McDOWELL, G. H.. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 35, p. 427-436, 1995.

AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 53, n. 1, p. 28-36, 1998.

BAKER, L. D.; FERGUSON, J. D.; CHALUPA, W. Responses in urea and true protein pf milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 78, n. 11, p. 2424-2434, 1995.

BARBANO, D. M.; CLARCK, J. L.; DUNHAM, C. E.; FLEMING, J. R. Kjeldahl method for determination of total nitrogen content of milk: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, n. 74, p. 849-859, 1990.

BARBANO, D. M.; CLARK, J. L. Infrared milk analysis – Challenges for the future. *Journal of Dairy Science*, n. 72, p. 1627-1636, 1989.

BARBANO, D. M.; LYNCH, J. M. Crude and protein nitrogen bases for protein measurement and their impact on current testing accuracy. *Journal of Dairy Science*, v. 75, v. 11, p. 3210-3217, 1992.

BARBANO, D. M.; RASMUSSEN, R. R.; LYNCH, J. M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 2, p. 369-388, 1991.

BARROS, L. Transtornos metabólicos que podem ser detectados por meio do leite. IN: CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2002, Gramado. Anais do curso sobre avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais (sangue, leite, urina) Porto Alegre: Biblioteca Setorial da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, 2002, p. 27-39.

BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; ANDERSON, C. R.; KIRK, J. H. Milk production and somatic cell count in Michigan dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v. 73, n. 10, p. 2794-2800, 1990.

- BAUMGARD, L. H.; CORL, B. L.; DWYER, D. A.; SAEBO, A.; BAUMAN D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 278, p. 179-184, 2000.
- BELLAMY, L. J. *The infrared spectra of complex molecules*. 3 ed. Londres: Halsted Press, 1975, v. 1, 433 p.
- BENTLEY. *Bentley 2000® operator's manual*. Chaska : Bentley Instruments, 1998. Chaska, 118 p.
- BENTLEY. *Somacount 300® operator's manual*. Chaska : Bentley Instruments, 1997. Chaska, 36 p.
- BIGGS, D. A. Instrumental infrared estimation of fat, protein and lactose in milk: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 61, n. 5. p. 1015-1034, 1978.
- BIGGS, D. A. Precision and accuracy of infrared milk analysis. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 55, p. 488-497, 1972.
- BIGGS, D. A.; JOHNSON, G.; SJAUNJA, L. O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infra-red absorption. *Bulletin of the IDF*, n. 208, p. 21-30, 1987.
- BIGGS, D.A. Milk analysis with the infrared milk analyzer. *Journal of Dairy Science*, v. 50, p. 799-803, 1967.
- BOLZONI, G.; MARCOLINI, A.; VARISCO G. Evaluation of the Bactoscan FC. 1. accuracy, comparison with the Bactoscan 8000 and somatic cell effect. *Milchwissenschaft*, v. 55, p. 67-70, 2000.
- BRADLEY Jr., R. L. Dairy Products. In: HORWITZ, W. (editor). *Official methods of analysis of AOAC International*. 17. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2000, cap. 33.
- BRASIL. Decreto n. 30691. 29 mar. 1952. Aprova o novo regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Rio de Janeiro, 7 de julho de 1952. Seção 1, p. 10785.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 37 de 18 abr. de 2002. Institui a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite, com o objetivo de realizar análises laboratoriais para fiscalização de amostras de leite cru, recolhidas em propriedades rurais e em estabelecimentos de laticínios. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 19 abr. 2002. Seção 1, p.3. (b).
- BRASIL. Instrução Normativa n. 51 de 18 set. 2002. Aprova os 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, 20 set. 2002. Seção 1, p.13. (a).
- BRASIL. Instrução Normativa nº 22 de 14 de abril de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília: 02 mai 2003. Seção 1, p.3.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 59 de 4 nov. de 2002. Aprova o Estatuto do Conselho Consultivo e o regimento da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite – RBQL, instituída por meio da Instrução Normativa nº 37/2002. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 06 nov. 2002. ©

BRASIL. Lei n. 1283. 18 dez. 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 1950. Seção 1, p. 18161.

BRAZIS, A. R. Methods for estimating colony forming units – Plate count method. In: HEESCHEN, W. (Coordenador). *Methods for assessing the bacteriological quality of raw milk from the farm*. Bulletin of the International Dairy Federation, n. 256, p-4-8, 1991.

BRUCKMAIER, R. M.; ROTHENANGER, E.; BLUM, J. W. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Veterinary Medicine Czech*, v. 49, p. 283-290, 2004.

BRUHN, J. C.; FRANKE, A. A. Regional differences in nitrogen fractions in California herd milks. *Journal of Dairy Science*, v. 62, p. 1326-1328, 1979.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J. de; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N. de; OLIVEIRA J. P. de; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Variações na composição centesimal do leite em função das contagens celular somática e bacteriana total no estado de Goiás. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P. de; SANTOS, M. V. (Org.). *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. p. 301-306.

BURCHARD, J. F.; BLOCK, E. Nutrição do gado leiteiro e composição do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1, 1998, Curitiba. *Anais*. Curitiba: Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, 1998, p. 16-19.

CANADIAN NATIONAL COMITEE. *Analytical procedures for milk analysis*. 2. ed. Canadá: The Analytical Committee of the National Liaison Group on Milk Products Quality, 1994, 113 p.

CARVALHO, L. de A.; NOVAES, L. P.; MARTINS, C. E.; ZOCCAL, R.; MOREIRA, P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LIMA, V. M. B. Mercados e comercialização. Embrapa Gado de Leite – Sistemas de Produção 2. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FoontesHTML/Leite/LeiteCerrado/mercados.html>. Acesso em 14 de junho de 2005.

CEE. Directiva 92/46/CEE do Conselho. Adota as normas sanitárias relativas à produção de leite cru, de leite tratado termicamente e de produtos à base de leite e à sua colocação no mercado. *Jornal Oficial*, Lisboa, 14 set. De 1992, nº 268, p. 1.

CERBULIS, J.; FARRELL, H. M. J. Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose and fat contents and distribution of protein fraction. *Journal of Dairy Science*, v. 58, n. 6, p. 817-827, 1975.

CHUI, Q. S. H. Estudo de homogeneidade de lote de material silício metálico candidato a material de referência. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 497-501, 2005.

DePETERS, E. J.; CANT, J. P. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 8, p. 2043-2070, 1992.

DePETERS, E. J.; FERGUSON, J. D.; BAKER, L. D. Nonprotein Nitrogen and protein distribution in the milk of cows. In: SYMPOSIUM ON PROTEIN DEFINITION, 1, 1993. *Proceedings of the symposium on protein definition*. Minneapolis: International Dairy Federation, 1993, p. 7-31.

DePETERS, E. J.; TAYLOR, FRANKE, A. A.; AGUIRRE, A. Effects of Feeding Whole Cottonseed on Composition of Milk. *Journal of Dairy Science*, v. 68, n. 4, p. 897-902, 1985.

DOLBY, R. M. Dye-binding methods for estimation of protein in milk. *Journal of Dairy Research*, v. 28, p. 43-55, 1961.

- DUNKLEY, W. L.; FRANKE A. A.; SMITH, L. M. Determining fat, protein, and lactose in milk from cows fed formaldehyde protected sunflower-soybean supplement. *Journal of Dairy Science*, v. 60, p. 45-52, 1976.
- DÜRR, João Walter. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P. de; SANTOS, M. V. (Org.). *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. p. 38-55.
- EASTRIDGE, M. L.; PALMQUIST, D. L. Effect of supplementing diets with fat on infrared analysis of milk fat. *Journal of Dairy Science*, v. 72, p. 2782-2787, 1989.
- EMMONS, D. B.; TULLOCH, D.; ERNSTROM, C. A. Product-yield pricing system. 1. Technological considerations in multiple-component pricing of milk. *Journal of Dairy Science*. V. 73, n. 7, p. 1712-1723, 1990a.
- EMMONS, D. B.; TULLOCH, D.; ERNSTROM, C. A.; MORISSET, M.; BARBANO, D. Product-yield pricing system. 2. Plant considerations in multiple-component pricing of milk. *Journal of Dairy Science*. V. 73, n. 7, p. 1724-1733, 1990b.
- ETHERIDGE, R. D.; PESTI, G. M.; FOSTER, E. H. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (LECO CNS 2000) on sample typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Animal Feed Science and Technology*, v. 73, n. 1, p. 21-28, 1998.
- FDA. Pasteurized Milk Ordinance. Revisão, 2003.
- FERNANDES, A. M.; OLIVEIRA, C. A. F.; TAVOLARO, P. Relationship between somatic cell counts and composition of milk from individual Holstein cows. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 2, p. 163-166, 2004.
- FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Londres: Thomson Science, 1998, 396p.
- GAUDILLÈRE, T. & GRAPPIN, R. *L'influence de l'acide citrique sur le dosage des protéines du lait par la méthode infra-rouge. Mémoire fin d'études*. Douai : SPILAB, 1982.
- GEHRINGER, G. Introduction. In: HEESCHEN, W. (Coordenador). Methods for assessing the bacteriological quality of raw milk from the farm. *Bulletin of the IDF*, n. 256, p. 3, 1991.
- GINN, Roy; PACKARD, Vernal. A study of control of infra-red instruments used in analysis of various components of raw milk. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v. 9, p. 8-13, 1989.
- GODKIN, A. Qualidade do leite ao redor do mundo: o papel da CCS. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2000, Curitiba. *Anais*. Curitiba: Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, 2000, p. 9-16.
- GOFF, H. D.; HILL, A. R. Chemistry and physics. In: HUY, Y. H. *Dairy science and technology handbook*. Nova Iorque: VCH Publishers, 1993. v. 1, p. 1-82.
- GOMES, J. C. *Análise de Alimentos*. 1. d. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 126 p.
- GOULDEN, J. D. S. Analysis of milk by infra-red absorption. *Journal of Dairy Research*, v. 31, n. 3, p. 273-284, 1964.
- GRAPPIN, R.; HORWITZ, W. determination of nitrogen content in milk by the Kjeldahl Method using copper sulfate: interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 71, n. 5, 893-897, 1988.

- GRAPPIN, R.; HORWITZ, W. Determination of nitrogen content in milk by the Kjeldahl method using copper sulfate: interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 71, n. 5, p. 893-897, 1988.
- GRAPPIN, R.; LEFIER, D. Protein definition for milk payment to farmers. In: SYMPOSIUM ON MILK PROTEIN DEFINITION, 2, 1994, Aarhus. *Milk protein definition and standardization*. Bruxelas: International Dairy Federation, 1994, p. 16-23.
- GRAPPIN, Rémy. Application of the true protein content for ex-farm milk payment and dairy cattle breeding programme in France. *Journal of Dairy Science*, 1991, v. 74 (suplemento 1), p. 119.
- GRAPPIN, Rémy. Bases and experiences of expressing the protein content of milk – France. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 11, p. 3221-3227, 1992
- GRAPPIN, Rémy; RIBADEAU-DUMAS, Bruno. Analytical methods for milk proteins. In: FOX, P. F. (Editor). *Advanced dairy chemistry. Volume 1: proteins*. 2. ed. Essex: Elsevier Science Publishers Ltd., 1992. v. 1. p. 1-62.
- GUILLOU, H. ; PELISSIER, J. P. ; GRAPPIN, R. Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Le Lait*, v. 66, p. 143-175, 1986.
- HAENLEIN, G. F. W.; SCHULTZ, L. H.; ZIKAKIS, J. P. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. *Journal of Dairy Science*, v. 56, n. 8, p. 1017-1024, 1973.
- HANDBOOK of chemistry and physics on CD ROM. LIDE, D. R. (Ed.). Versão 0.9 2002. Boca Raton: CRC Press, 2002.
- HANSEN, P. W. Urea determination in milk using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Milchwissenschaft*, v. 53, n. 5, p. 45-49, 1998.
- HARDING, F. Bases and experiences of expressing the protein content of milk – England and Wales. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 11, p. 3218-3220, 1992.
- HILL, B.M. Methods for estimating colony forming units – Plate loop method. *Bulletin of the IDF*, n. 256, p-9-12, 1991a.
- HILL, B.M. Microscopic (or direct) methods for estimation of bacteria – Direct microscopic count method. *Bulletin of the IDF*, n. 256, p-17-20, 1991b.
- HILL, B.M. Microscopic (or direct) methods for estimation of bacteria – Direct epifluorescent filter technique. *Bulletin of the IDF*, n. 256, p-20-24, 1991c.
- HILLERTON, J. E. A situação da qualidade do leite na União Européia. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE, 2, 2000, Curitiba. *Anais*. Curitiba: Biblioteca do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, 2000, p. 72-77.
- IBARRA, Aldo A. Sistema do pagamento do leite por qualidade. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P. de; SANTOS, M. V. (Org.). *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. p. 72-86.
- IDF. *International IDF Standard 021B:1987*: Milk, cream and evaporated milk – determination of total solids content. Bruxelas, 1987, 2 f.
- IDF. *International IDF Standard 100B:1991*: Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C. Bruxelas, 1991 (a), 3 f.
- IDF. *International IDF Standard 128A:1999*: Milk – definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis. Application to calibration procedure and quality control in the dairy laboratory. Bruxelas, 1999, 12 f.

- IDF. *International IDF Standard 141C:2000*: Whole milk – determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Bruxelas, 2000, 15 f.
- IDF. *International IDF Standard 148A:1995*: Milk – Enumeration of somatic cell. Bruxelas, 1995 (a), 8 f.
- IDF. *International IDF Standard 1D:1996*: Milk – determination of fat content. Bruxelas, 1996, 8 f.
- IDF. *International IDF Standard 20B:1993*: Milk – determination of nitrogen content. Bruxelas, 1993, 12 f.
- IDF. *International IDF Standard 20C:2001*: Milk – determination of nitrogen content. Bruxelas, 2001, 12 f.
- IDF. *International IDF Standard 50C:1995*: Milk and milk products – guidance on sampling. Bruxelas, 1995 (b), 19 p.
- IDF. *International IDF Standard 98A:1985*: Milk – determination of protein content. Amido Black dye-binding method (routine method). Bruxelas, 1985 (a), 4 f.
- IDF. Payment for milk on the basis of quality. *Bulletin of the IDF*. N. 192, 1985 (b), p. 1-9.
- IDF. Payment systems for ex-farm milk. *Bulletin of the IDF*. N. 262, 1991 (b), p. 4-14.
- IDF. Payment systems for ex-farm milk. *Bulletin of the IDF*. N. 379, 2002, p. 2-55.
- IDF. *Publications*. Disponível em < d P://www.fil-idf.org> . Acesso em 18 jan. de 2006.
- INGALLS, W. Somatic cells: function and relationship to milk quality. *Milkproduction.com*, 07 de dezembro de 2001. Disponível em < [d P://www.milkproduction.com/Library/Articles/Somatic\\_Cells\\_Function\\_and\\_Relationship\\_to\\_Milk\\_Quality.htm](http://www.milkproduction.com/Library/Articles/Somatic_Cells_Function_and_Relationship_to_Milk_Quality.htm)>. Acesso em 14 jan 2006.
- INSTITUTO ANTÔNIO HOUAISS. *Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa*. Rio de Janeiro: Editora Objetiva Ltda., 2001. 1 CD-ROM.
- ISO. *ISO 3534: Statistics – Vocabulary and symbols – Part 1: Probability and general statistical terms*. Genebra, 1993, 39 f.
- ISO. *ISO 3534: Statistics – Vocabulary and symbols – Part 2: Statistical quality control*. Genebra, 1993, 53 f.
- IWAIDA, M.; KAWAGUSHI, Y.; TSUGO, T. Ultraviolet spectrophotometric determination of protein content in milk. *Journal of Dairy Science*, v. 50, n. 8, 1967.
- JENSEN, R. G. Invited review: The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 2, p. 295-350, 2002.
- JONES, G. M.; BAILEY Jr., T. L.. Understanding the Basics of Mastitis. Virginia Polytechnic Institute and State University. Publicação 404-233. Disponível em <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-233/404-233.pdf>. Acesso em 17 jan 2006.
- JUAREZ, M.; MARTINEZ-CASTRO, I.; RAMOS, M.; MARTIN-ALVAREZ, P. J. Composition of milk in Spain. 2. Ash, sodium, potassium and nitrogen fractions. *Milchwissenschaft*, v. 34, n. 3, p. 149-151, 1979.

- JURJANZ, S.; COLIN-SCHOELLEN, O.; GARDEUR, J. N.; LAURENT, F. Alteration of milk fat by variation in the source and amount of starch in a total mixed diet fed to dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 11, p. 2924-2933, 1998.
- KARATZAS, C. N.; TURNER, J. D. Toward altering milk composition by genetic manipulation: current status and challenges. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 9, p. 2225-2229, 1997.
- KARMAN, A. H.; VAN BOEKEL, A. J. S. Kjeldahl factor for milk and milk products. *The Netherlands Milk and Dairy Journal*, v. 40, p. 315-336, 1986.
- KEHRLI JR., M. E. ; SHUSTER, D. E. Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in Health of the Bovine Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, v. 77, n. 2, p. 619-627, 1994.
- KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, v. 48, p. 167-188, 1981.
- KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU A.; LYNCH J.; BARBANO D. M.; SEARS, P; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. *Journal of Dairy Science*, v. 81, n. 5, p. 1205-1213, 1998.
- KUZYK M.; DIMOS, A.; PALMER, M. V. Evaluation of a direct method for the determination of true protein content in milk by Kjeldahl analysis. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 49, p. 86-89.
- LANHER, B. S. Evaluation of Aegys MI 600 Fourier transform infrared milk analyzer for analysis of fat, protein, lactose, and solids non fat: a compilation of eight independent studies. *Journal of the Association of AOAC International*, v. 79, n. p. 1388-1399, 1996.
- LANNA, Dante P. D.; MEDEIROS, S. R. Manipulação da composição do leite e do metabolismo de nutrientes usando isômeros do ácido d P éico conjugado (ALC). In.: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2000, Curitiba: Anais. Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, 2000, p. 78-84.
- LEFIER, D.; GRAPPIN, R.; ROCHET, S. Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. *Journal of AOAC International*, v. 79, n. 3, p. 711-717, 1996.
- LONGMAN Dictionary of Contemporary English. New Edition on CD-ROM. Nova Iorque: Pearson Education Ltd., 2005, 1 CD-ROM.
- LUNDÉN, A.; SJAUNJA L. -O, PHILIPSSON, J.; ERIKSSON, J. -Å. Effects of changing milk protein definition – an animal breeding perspective. In: SYMPOSIUM ON PROTEIN DEFINITION, 2, Aarhus. *Milk protein definition and standardization*. Bruxelas: International Dairy Federation, 1994, p. 24-27.
- MA, Y.; RYAN C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M. A.; BOOR, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, v. 83, v. 2, 264-274, 2000.
- MAPA. *Quadros-síntese: ranking dos produtos das exportações – NCM*. Disponível em < d P://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/ MAPA/BALANCA\_COMERCIAL/BALANCA\_COMERCIAL\_NOVA/01%20A%2008%20-%20RANKING%20-%20PRODUTOS%20NCM.XLS> . Acesso em 18 jan. de 2006.

- McGILL UNIVERSITY. *Mastitis in Dairy Cows*. Faculty of Agricultural and Environmental Sciences – MacDonald Campus of McGill University, Department of Animal Science, disponível em <<http://animsci.agrenv.mcgill.ca/courses/450/topics/13.pdf>>. Acesso em 12 jan. de 2006.
- MEIRELLES, Almir José. *Planejamento, qualidade e globalização na indústria de laticínios – 1997 – 2000. Um olhar incompleto*. 5. ed. São Paulo: Cultura Editores Associados, 2004, 118 p.
- MEYER, P. M. *Fatores não nutricionais que afetam as concentrações de nitrogênio uréico no leite*. 2003. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba.
- MILLS, Bernice L.; VAN DE VOORT, F. R. Evaluations of CH stretch measurement for estimation of fat in aqueous fat emulsions using infrared spectroscopy. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 65, n. 6, p. 1357-1360, 1982.
- MONARDES, H. Programa de pagamento de leite por qualidade em Québec, Canadá. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1, 1998, Curitiba. *Anais*. Curitiba: Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, 1998, p. 40-43.
- MONARDES, H. Reflexões sobre a qualidade do leite. In: DÜRR, J. W.; CARVALHO, M. P. de; SANTOS, M. V. (Org.). *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. p. 11-37.
- MOXLEY, J. E.; KENNEDY, B. W.; DOWNEY, B. R.; BOWMAN, J. S. T. Survey of milking hygiene practices and their relationships to somatic cell counts and milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 61, n. 3, p. 1637-1644, 1978.
- MUNRO, G. L.; GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 03/84, p. 7-16, 1984.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. ed. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company, 2005, 1124 p. 1 CD-ROM.
- NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Variability of test-day milk production and composition and relation of somatic cells count with yield and compositional changes of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 2, p. 361-366, 1984.
- NG-KWAI-HANG, K. F.; HAYES, J. F.; MOXLEY, J. E.; MONARDES, H. G. Percentages of protein and nonprotein nitrogen with varying fat and somatic cells in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v. 68, n. 5, p. 1257-1262, 1985.
- NICKERSON, S. C. Milk production: factors affecting milk composition. In: HARDING, F. *Milk Quality*. 1 ed. Londres: Blackie Academic & Professional, 1995, p. 3-23.
- NINANE, V.; de REU, K.; OGER, R.; REYBROECK, W.; GUYOT, A. Évaluation du Bactoscan FC pour la numération des bactéries du lait cru. *Le Lait*, v. 80, p. 527-538, 2000.
- NORMAN, H. D.; MILLER, R. H.; WRIGHT, J. R.; WIGGANS, G. R. Herd and state means for somatic cell count from dairy herd improvement. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 12, p. 2782-2788, 2000.
- OLIVIERI, J. C. *Programas interlaboratoriais*. São Paulo: JColivieri Consultoria em Qualidade e Confiabilidade Metrológica para Laboratórios, 2005. 119 p.

- OTT, S. L.; WELLS, S. J.; SMITH, M. A. Bulk tank somatic cell counts of U.S. milk supply, 1997. In: ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 38, 1999, Arlington. *Proceedings of the 38<sup>th</sup>. Annual Meeting of the National Mastitis Council*. Madison: National Mastitis Council, Inc., 1999, p. 154-156.
- PALMQUIST, D. L. ; DENISE BEAULIEU, A.; BARBANO, D. M. Feed and animal factors influencing milk fat composition – ADSA Foundation Symposium : Milk fat synthesis and modification. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 6, p. 1753-1771, 1993.
- PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. *Journal of Dairy Science*, v. 63, n. 1, p. 1-14, 1979.
- PAQUIN, P.; LACROIX, C. Seasonal and regional variations of different milk protein fractions: a survey of Québec milk. In: SYMPOSIUM ON PROTEIN DEFINITION, 1, Minneapolis, 1993. *Proceedings of the symposium on protein definition*, Bruxelles: International Dairy Federation, 1993, p. 32-39.
- PHILPOT, W. N. Programas de qualidade do leite no mundo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1, 1998, Curitiba. *Anais*. Curitiba: Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, 1998, p. 1-6.
- POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K. F. Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency. *Journal of Dairy Science*, v. 71, p. 1711-1719, 1988a.
- POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K. F. Effects of somatic cell count and milk composition on the coagulation properties of milk. *Journal of Dairy Science*, v. 71, p. 1740-1746, 1988b.
- PORTUGAL, J. A. B.. Influência de resíduos de antibióticos sobre a qualidade do leite para a manufatura dos produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. (Editores). *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. 1. d. Juiz de Fora: Templo – Gráfica e Editora Ltda, 2003, p. 151-158.
- PRADO, P. I.; LEWINSOHN, T. M.; CARMO, R. L.; HOGAN, D. J. Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciências ambientais. *Ambiente e Sociedade*, v. 10, p. 69-83, 2002.
- REFSDAL, A. O.; BÆVRE, L.; BRUFLOT, R. Urea concentration in bulk milk as an indicator of the protein supply at the herd level. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 26, n. 2, p. 153-163, 1985.
- RÉMILLARD, Nathalie ; ROBIN, Olivier ; MARTEL, Richard ; PAQUIN, Paul. Influence of homogenization efficiency on milk fat content determination by infrared analysis. *International Dairy Journal*, v. 3, n. 3, p. 197-208, 1993.
- RENNER, E. Analysis of true protein in milk and protein determination in milk products. *South African Journal of Dairy Technology*, v. 14, p. 141-144, 1982.
- REXROAD, P. R.; CATHEY, R. D. Pollution-reduced Kjeldahl method for crude protein. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 59, n. 6, p. 1213-1217, 1976.
- RIBADEAU-DUMAS, B. ; GRAPPIN, R. Milk protein analysis. *Le Lait*, v. 69, p. 357-416, 1989.
- RIEL, R. Composición y estructura fisico-química de d leche. In: AMITO, J. *Ciência y tecnología de d leche*. Zaragoza: Editorial Ascribia S.A., 1991, p. 1-54.

- ROBERTSON, N. H.; DIXON, A. ; NOWERS, J. H.; BRINK, D. P. S. The influence of lipolysis, pH and homogenization on infra-red readings for fat, protein and lactose. *South African Journal of Dairy Technology*, v. 13, p. 3-7, 1981.
- ROBERTSON, N. H.; ELFRIEDE, V. der W. Non-protein nitrogen content of milk as influenced by various factors. *South African Journal of Dairy Technology*, v. 22, p. 1-8, 1990.
- RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; HERMIDA, M. Total bacterial count in raw milk using the bactoscan 8000. *Journal of AOAC International*, v. 76, p. 838-841, 1993.
- ROWLAND, S. J. The determination of the nitrogen distribution in milk. *Journal of Dairy Research*, v. 9, p. 42-46, 1938.
- SAEMAN, A. I.; VERDI, R. J.; GALTON, D. M.; BARBANO, D. M. Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v. 71, n. 2, p. 505-512, 1988.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2002. 265 p.
- SANTOS, M. V.; MA Y.; BARBANO, D. M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 8, p. 2491-2503, 2003.
- SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2000, Curitiba. *Anais*. Curitiba: Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, 2000, p. 21-26.
- SILVA, D. J. Dosagem do nitrogênio total pelo método Kjeldahl. In: SILVA, D. J. *Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)*. 2. ed. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1990. p. 24 – 38.
- SILVA, P. H. F.; PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA Jr.; L. C. G. *Físico-química de leite e derivados*. Métodos Analíticos. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora, 1997. 190p.
- SKOOG, D., A.; HOLLER, J. F., NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. Porto Alegre: Editora Bookman, 2002, 700 p.
- SLAGHUIS, B. A. Methods for estimating colony forming units – Roll tube method. *Bulletin of the IDF*, n. 256, p-12-13, 1991.
- SLOTH, K. H. M. N; FRIGGENS, N. C.; LØVENDAHL, P.; ANDERSEN, P. H.; JENSEN, J.; INGVARTSEN, K. L. Potential for improving description of bovine udder health status by combined analysis of milk parameters. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 4, p. 1221-1232, 2003
- SOMMERFELDT, J. L.; BAER, R. J. variability of milk components in 1705 herds. *Journal of Food Protection*, v. 49, p.729, 1986.
- STEGEMAN, Gene A.; BAER, Robert J.; SCHINGOETHE, David J.; CASPER, David P. Influence of milk fat higher in unsaturated fatty acids on the accuracy of milk fat analysis by the mid-infrared spectroscopic method. *Journal of Food Protection*, v. 54, n. 11, p. 890-893, 1991.
- SUARD, Carolle L.; MOUREL, Rose-Marie; DIDENOT, Dominique; FEINBERG, Max H. *Mechanisms involved in Kjeldahl microwave digestion of amino acids*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 45, p. 1202-1208, 1997.
- SUHREN, G. & HEESCHEN, W. Methods for estimating colony forming units – Electronic counting of microcolonies. *Bulletin of the IDF*, n. 256, p-14-16, 1991.

- SUHREN, G., REICHMUTH, J.; HEESCHEN, W. Microscopic (or direct) methods for estimation of bacteria – Bactoscan technique. *Bulletin of the IDF*, n. 256, p-24-30, 1991.
- SUHREN, G.; WALTE, H. –G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. *Bulletin of the IDF*, n. 358, p-36-48, 2000.
- SWAISGOOD, H. E. Chemical of the caseins. In: FOX, P. F. (Editor). *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1 – proteins*. Essex: Elsevier Science Publishers Ltd., 1992, v. 1, p. 63-110.
- VALFRÈ, F.; MORETTI, V. M. Characteristics, quality and control of animal products for human consumption. In: BOYAZOGLU, J.; RENAUD, J. (Editores). *The livestock production sector in Eastern Europe as affected by current changes*. Wageningen, Holanda: EAAP Publication, n. 57, p. 144-148, 1997.
- VAN BOEKEL, M. A. J. S. & RIBADEAU-DUMAS, B. Addendum to the evaluation of the Kjeldahl factor for conversion of the nitrogen content of milk and milk products to protein content. *The Netherlands Milk and Dairy Journal*, v. 41, p. 281-284, 1987.
- VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT, A. Proteins. In: NOLLET, Leo M. L. *Handbook of food analysis. Physical characterization and nutrient analysis*. 1. d. Nova Iorque: Marcel Dekker, Inc., 1996. v. 1. p. 277-309.
- VAN DE VOORT, Frederick R. Evaluation of Milkoscan 104 infrared milk analyzer. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 63, n. 5, p. 973-980, 1980.
- VAN DE VOORT, Frederick R.; SEDMAN, Jacqueline; EMO, Gary; ASHRAF, A. Ismail. Assessment of Fourier transform infrared analysis of milk. *Journal of AOAC International*, v. 75, n. 5, p. 780-785, 1992.
- VAN DE VOORT; F. R.; KERMASHA, S.; SMITH, J. P.; MILLS, B. L.; NG-KWAI-HANG, K. F. A study of the stability of record of performance milk samples for infrared milk analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 70, n. 8, p. 1515-1523, 1987.
- VAN REUSEL, A.; KLIJN, C. J. Automated methods for routine analysis of raw milk – the dye-binding method for determination of the protein content of milk. *Bulletin of the IDF*, Bruxelles, n. 208, p. 17-20, 1987.
- VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. *Milk and milk products. Technology, chemistry and microbiology*. 1. ed. London: Chapman & Hall, 1994, 451 p. 1a. ed.
- VEAL, D. A.; DEERE, D.; FERRARI, B.; PIPER, J.; ATTFIELD, P. V. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*, v. 243, n. 1-2, p. 191-210, 2000.
- VELOSO, Ana Cristina A. et al. Metodologia de doseamento das proteínas do leite. *Boletim de Biotecnologia*, Lisboa, n. 69, p. 17-30, 2001.
- VERDI, R. J.; BARBANO, D. M. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. *Journal of Dairy Science*; v. 74, n. 7, p. 2077-2081, 1991.
- VERDI, R. J.; BARBANO, D. M.; DELAVALLE, M. E.; SENYK, G. F. Variability in true protein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. *Journal of Dairy Science*, v. 70, n. 2, p. 230-242; 1987.
- WAITE, R.; SMITH, G. M. Measurement of the protein content of milk from mastitic quarters by the Amido Black method. *Journal of Dairy Research*, v. 39, n. 2, p. 195-201, 1972.
- WALSTRA, P. Payment of milk according to protein content in The Netherlands. *Journal of Dairy Science*. v. 75, n. 11, p. 3228-3230, 1992.

WATTIAUX, M. Dairy Essentials. Madison: Babcock Institute for International Dairy Research and Development. Disponível em <<http://www.babcock.wisc.edu/downloads>

/de/01 a 35.en.pdf>. Acesso em 15 jan. 2006.

WILLARD, H. H.; MERRITT JR., L. L.; DEAN, J. A. *Instrumental Methods of Analysis*. Nova Iorque: D. Van Nostrand Company, 1974, 860 p.

ZURBORG, C. E. Impact of method of expressing protein content of milk – processor viewpoint from Swiss Valley farms. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 11, p. 3235, 1992.

## 8 ANEXOS

Tabela 1 (Anexo). Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro gordura (% m/m) analisada por EIVM.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P	F crítico
Entre frascos	19	0,0015400	0,0000811	1,47	0,198	2,155
Dentre frascos (erro)	20	0,0011000	0,0000550			
Total	39	0,0026400				

Fcalculado < Fcrítico = 2,155 indica que não há diferença significativa entre frascos e dentre frascos ( $P < 0,05$ ) com nível de significância  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 2 (Anexo). Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro proteína (% m/m) analisada por EIVM.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P	F crítico
Entre frascos	19	0,0004600	0,0000242	0,69	0,787	2,155
Dentre frascos (erro)	20	0,0007000	0,0000350			
Total	39	0,0011600				

Fcalculado < Fcrítico = 2,155 indica que não há diferença significativa entre frascos e dentre frascos ( $P < 0,05$ ) com nível de significância  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 3 (Anexo). Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro lactose (% m/m) analisada por EIVM.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P	F crítico
Entre frascos	19	0,0005600	0,0000295	1,47	0,198	2,155
Dentre frascos (erro)	20	0,0004000	0,0000200			
Total	39	0,0009600				

Fcalculado < Fcrítico = 2,155 indica que não há diferença significativa entre frascos e dentre frascos ( $P < 0,05$ ) com nível de significância  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 4 (Anexo). Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro sólidos totais (% m/m) analisada por EIVM.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P	F crítico
Entre frascos	19	0,002540	0,000134	1,16	0,370	2,155
Dentre frascos (erro)	20	0,002300	0,000115			
Total	39	0,004840				

Fcalculado < Fcrítico = 2,155 indica que não há diferença significativa entre frascos e dentre frascos ( $P < 0,05$ ) com nível de significância  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 5 (Anexo). Análise de variância do teste de homogeneidade para o parâmetro contagem de células somáticas (células/mL) normalizado por logaritmo decimal, analisada por citometria de fluxo.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P	F crítico
Entre frascos	19	0,0017779	0,0000936	1,88	0,084	2,155
Dentre frascos (erro)	20	0,0009933	0,0000497			
Total	39	0,0027712				

Fcalculado < Fcrítico = 2,155 indica que não há diferença significativa entre frascos e dentre frascos ( $P < 0,05$ ) com nível de significância  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 6 (Anexo). Estudo de dispersão de freqüência em tabela de contingência ( $\chi^2$ ) para os parâmetros de qualidade SNG, PB, CCS e contagem de microrganismos mesofílicos a 30°C/72 horas, quanto ao atendimento dos preceitos da Instrução Normativa n° 51/2002.

Produção diária média	SNG		CCS		PB		CBT		TOTAL	
	Atende	Não atende								
1 a 100 litros	f.o.	47	10	47	10	49	8	41	16	57
	f.e.	46,06	10,94	46,06	10,94	51,24	5,76	44,91	12,09	
101 a 200 litros	f.o.	46	13	47	12	54	5	41	18	59
	f.e.	47,68	11,32	47,68	11,32	53,04	5,96	46,48	12,52	
201 a 600 litros	f.o.	43	9	43	9	47	5	46	6	52
	f.e.	42,02	9,98	42,02	9,98	46,75	5,25	40,97	11,03	
> 600 litros	f.o.	24	6	23	7	28	2	28	2	30
	f.e.	24,24	5,76	24,24	5,76	26,97	3,03	23,64	6,36	
TOTAL		160	38	160	38	178	20	156	42	198
$\chi^2$		0,539		0,601		1,547		9,12*		

Nota:  $\chi^2$  crítico de 7,82 para 3 gl do estudo e nível de significância do erro tipo I igual a 0,05.

(\*) Valor obtido por correção de Yates (Sampaio, 2002).

Tabela 7 (Anexo). Análise de variância da regressão entre os dados de % m/m de PB analisada pelo método Kjeldahl e a % m/m de PV obtida a partir do NNP analisado por Kjeldahl.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	199	5,4435			
Regressão	1	5,2686	5,2686	5964,40	0,000
Erro	198	0,1749	0,0009		

Nível de significância  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 8 (Anexo). Análise de variância da regressão da associação entre o teor em PB (%m/m) quantificado por MRK e EIVM das 200 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de Minas Gerais.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	199	5,6330			
Regressão	1	3,9924	3,9924	481,84*	0,000
Residual	198	1,6406	0,0083		
Falta de ajuste	97	0,8829	0,0091	1,21**	0,168
Erro puro	101	0,7577	0,0075		

\*Fcrítico  $_{1 e 101 gl} = 3,94$ ; \*\*Fcrítico  $_{2 e 97 gl} = 3,09$ . Nível de significância de  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 9 (Anexo). Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com 1.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	10	0,428346	0,0428346	11,49	0,000
Método	1	0,006278	0,006278	1,68	0,223
Erro (resíduo)	10	0,037265	0,0037265		
Total	21	0,471889			

Nível de significância do experimento de  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 10 (Anexo). Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 2.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	41	3,07484	0,0749960	18,57	0,000
Método	1	0,08848	0,0884779	21,91	0,000
Erro (resíduo)	41	0,16558	0,0040385		
Total	83	3,32889			

Nível de significância do experimento de  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 11 (Anexo). Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 3.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	18	0,436127	0,0242293	22,94	0,000
Método	1	0,030090	0,0300896	28,49	0,000
Erro (resíduo)	18	0,019010	0,0010561		
Total	37	0,485227			

Nível de significância do experimento de  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 12 (Anexo). Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 4.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	63	3,21538	0,051038	17,76	0,000
Método	1	0,12363	0,123632	43,01	0,000
Erro (resíduo)	63	0,18108	0,002874		
Total	127	3,52010			

Nível de significância do experimento de  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 13 (Anexo).. Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 5..

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	33	2,03871	0,0617790	42,29	0,000
Método	1	0,04729	0,0472861	32,37	0,000
Erro (resíduo)	33	0,04820	0,0014607		
Total	67	2,13420			

Nível de significância do experimento de  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 14 (Anexo). Análise de variância da comparação entre os resultados de teores em PB (% m/m) obtidos pelos métodos de referência de Kjeldahl e EIVM, a partir das amostras submetidas à análise por EIVM com calibração 6..

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	29	0,97449	0,033603	13,82	0,000
Método	1	0,12012	0,120119	49,39	0,000
Erro (resíduo)	29	0,07053	0,002432		
Total	59	1,16514			

Nível de significância do experimento de  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabela 15 (Anexo). Avaliação da associação entre as diferenças dos métodos de quantificação da PB por MRK e EIVM categorizados em 3 classes e os componentes principais do leite, também categorizados em teor em três classes, por meio da distribuição qui-quadrado.

		Parâmetros composicionais do leite																				
		Valores de teor em gordura				Valores de teor em lactose				Valores de teor em NNP				Valores de teor em PB por EIVM				Valores de teor em PB por MRK				
		Altos	Baixos	Médios	Total	Altos	Baixos	Médios	Total	Altos	Baixos	Médios	Total	Altos	Baixos	Médios	Total	Altos	Baixos	Médios	Total	
Categorização das diferenças entre os métodos de análise de PB	Valores altos da diferença entre métodos	fo	26	13	29	68	11	22	35	68	24	21	23	68	14	38	16	68	27	19	22	68
		fe	20,40	19,04	28,56		20,74	19,04	28,22		21,42	23,80	22,78		21,42	25,50	21,08		20,40	22,44	25,16	
		CQQ	1,5373	1,9161	0,0068	*	4,5741	0,4602	1,6289	*	0,3108	0,3294	0,0021	*	2,5700	6,1270	1,2240	*	2,1353	0,5273	0,3969	*
	Valores baixos das diferenças entre métodos	fo	19	25	22	66	29	12	25	66	19	26	21	66	33	14	19	66	17	24	25	66
		fe	19,80	18,48	27,72		20,13	18,48	27,39		20,79	23,10	22,11		20,79	24,75	20,46		19,80	21,78	24,42	
		CQQ	0,0323	2,3003	1,1803	*	3,9084	2,2722	0,2085	*	0,1541	0,3641	0,0557	*	7,1710	4,6690	0,1040	*	0,3960	0,2263	0,0138	*
	Valores médios das diferenças entre métodos	fo	15	18	33	66	21	22	23	66	20	23	23	66	16	23	27	66	16	23	27	66
		fe	19,80	18,48	27,72		20,13	18,48	27,39		20,79	23,10	22,11		20,79	24,75	20,46		19,80	21,78	24,42	
		CQQ	1,1636	0,0125	1,0057	*	0,0376	0,6705	0,7036	*	0,0300	0,0004	0,0358	*	1,1040	0,1240	2,0900	*	0,7293	0,0683	0,2726	*
	Total		60	56	84	200	61	56	83	200	63	70	67	200	63	75	62	200	60	66	74	200
	$\chi^2_{\text{calc}}$		9,155				14,464				1,282				25,184				4,766			

Nota: O  $\chi^2_{\text{crítico}}$  para 4 graus de liberdade e probabilidade do erro tipo 1 de 0,05 é igual a 9,49 e para erro tipo 1 de 0,01 é igual a 13,28.

Tabelas 16 a 20. Análise de componentes principais da análise multivariada da associação de teores em gordura, ST e lactose por EIVM com as diferenças entre os métodos MRK e EIVM na quantificação da PB em leite cru de 200 amostras de tanques de refrigeração de Minas Gerais.

#### Análise de componentes principais

*Dados padronizados*

##### Matriz de correlação/Coefficientes

	Dif PB KJ - IV	G IV (%)	LAC IV (%)	ST IV (%)
Dif PB KJ - IV	1,00			
G IV (%)	0,21	1,00		
LAC IV (%)	-0,30	-0,16	1,00	
ST IV (%)	0,01	0,83	0,15	1,00

##### Matriz de correlação/Probabilidades

	Dif PB KJ - IV	G IV (%)	LAC IV (%)	ST IV (%)
Dif PB KJ - IV				
G IV (%)	0,0030			
LAC IV (%)	<0,0001	0,0206		
ST IV (%)	0,9124	<0,0001	0,0395	

##### Autovetores

Variáveis	e1	e2	e3
Dif PB KJ - IV	0,21	-0,64	0,74
G IV (%)	0,71	1,7E-03	-0,12
LAC IV (%)	-0,10	0,71	0,67
ST IV (%)	0,67	0,30	-0,01

##### Autovalores

Lambda	Valor	Proporção	Prop Acum
1	1,87	0,47	0,47
2	1,33	0,33	0,80
3	0,69	0,17	0,97
4	0,11	0,03	1,00

##### Correlação com as variáveis originais

Variáveis	CP 1	CP 2	CP 3
Dif PB KJ - IV	0,29	-0,74	0,61
G IV (%)	0,97	2,0E-03	-0,10
LAC IV (%)	-0,13	0,82	0,55
ST IV (%)	0,91	0,35	-0,01

e = eixo; CP1, CP2 e CP3 = componentes principais 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabelas 21 a 25 (Anexo). Análise de componentes principais da análise multivariada da associação de diferenças entre os métodos MRK e EIVM na quantificação de PB com os dois métodos, a partir de dados obtidos de 200 amostras de leites de tanques de refrigeração de Minas Gerais.

#### Análise de componentes principais

*Dados padronizados*

##### Matriz de correlação/Coefficientes

	Dif PB KJ - IV	PB KJ (%)	PB IV (%)
Dif PB KJ - IV	1,00		
PB KJ (%)	0,25	1,00	
PB IV (%)	-0,31	0,84	1,00

##### Matriz de correlação/Probabilidades

	Dif PB KJ - IV	PB KJ (%)	PB IV (%)
Dif PB KJ - IV			
PB KJ (%)	0,0003		
PB IV (%)	<0,0001	<0,0001	

##### Autovetores

Variables	e1	e2	e3
Dif PB KJ - IV	-0,05	0,93	0,37
PB KJ (%)	0,70	0,30	-0,65
PB IV (%)	0,72	-0,22	0,66

##### Autovalores

Lambda	Valor	Proporção	Prop Acum
1	1,84	0,61	0,61
2	1,16	0,39	1,00
3	1,2E-06	4,0E-07	1,00

##### Correlação com as variáveis originais

Variables	CP 1	CP 2	CP 3
Dif PB KJ - IV	-0,07	1,00	4,1E-04
PB KJ (%)	0,95	0,32	-7,1E-04
PB IV (%)	0,97	-0,24	7,3E-04

e = eixo; CP1, CP2 e CP3 = componentes principais 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 26 (Anexo). Avaliação da associação entre as diferenças dos métodos de quantificação da PB por MRK e EIVM categorizados em 3 classes e as calibrações realizadas do EIM..

Calibração realizada		Categorização das diferenças entre os métodos de análise de PB			
		Diferenças positivas	Diferenças próximas de zero	Diferenças negativas	Total
01	fo	5	4	2	11
	fe	3,74	3,63	3,63	
	CQQ	0,4240	0,0380	0,7320	
02	fo	3	30	9	42
	fe	14,28	13,86	13,86	
	CQQ	8,9100	18,7950	1,7040	
03	fo	7	0	12	19
	fe	6,46	6,27	6,27	
	CQQ	0,0450	6,2700	5,2370	
04	fo	32	7	25	64
	fe	21,76	21,12	21,12	
	CQQ	4,8190	9,4400	0,7130	
05	fo	0	24	10	34
	fe	11,56	11,22	11,22	
	CQQ	11,5600	14,5570	0,1330	
06	fo	21	1	8	30
	fe	10,20	9,90	9,90	
	CQQ	11,4350	8,0010	0,3650	
Total		68	66	66	200
$\chi^2_{\text{calc}}$		103,177			

Nota: O  $\chi^2_{\text{crítico}}$  para 10 graus de liberdade e probabilidade do erro tipo 1 de 0,05 é igual a 18,31 e para erro tipo 1 de 0,001 é igual a 29,59.

Tabelas 27 a 31 (Anexo). Análise de componentes principais da análise multivariada da associação de teores em gordura e SNG por EIVM e NNP por MRK com as diferenças entre os métodos MRK e EIVM na quantificação da PB em leite cru de 200 amostras de tanques de refrigeração de Minas Gerais.

### Análises de componentes principais

*Dados padronizados*

#### Matriz de correlação/coeficientes

	NNP (%)	G IV (%)	SNG (%)	Dif PB KJ - IV
NNP (%)	1,00			
G IV (%)	0,07	1,00		
SNG (%)	0,05	-0,18	1,00	
Dif PB KJ - IV	0,15	0,21	-0,33	1,00

#### Matriz de correlação/Probabilidades

	NNP (%)	G IV (%)	SNG (%)	Dif PB KJ - IV
NNP (%)				
G IV (%)	0,3416			
SNG (%)	0,4575	0,0121		
Dif PB KJ - IV	0,0359	0,0030	<0,0001	

#### Autovalores

Lambda	Valor	Proporção	Prop Acum
1	1,50	0,38	0,38
2	1,04	0,26	0,64
3	0,84	0,21	0,85
4	0,62	0,15	1,00

#### Autovetores

Variables	e1	e2	e3
NNP (%)	0,19	0,90	-0,16
G IV (%)	0,49	0,04	0,87
SNG (%)	-0,57	0,42	0,32
Dif PB KJ - IV	0,63	0,07	-0,34

#### Correlação com as variáveis originais

Variables	CP 1	CP 2	CP 3
NNP (%)	0,24	0,92	-0,15
G IV (%)	0,60	0,04	0,80
SNG (%)	-0,70	0,43	0,29
Dif PB KJ - IV	0,78	0,07	-0,31

e = eixo; CP1, CP2 e CP3 = componentes principais 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 32. Análise de variância das amostras de soro tricloroacético submetidas e não submetidas a congelamento por 90 dias.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Total	31	0,0008003			
Amostras	15	0,0007899	0,0000527	87,70	0,000
Tratamento	1	0,0000014	0,0000014	2,33	0,148
Erro	15	0,0000090	0,0000006		

Nível de significância do experimento de  $\alpha$  igual a 0,05.

Tabelas 33 a 37 (Anexo). Análise de componentes principais da análise multivariada da associação de teores em gordura, lactose e SNG por EIVM e PB por MRK com CCS de 200 amostras de tanques de refrigeração de Minas Gerais.

### Análises de componentes principais

*Dados padronizados*

#### Matriz de correlação/coeficientes

	CCS MG	LAC IV (%)	SNG (%)	G IV (%)	PB KJ (%)
CCS MG	1,00				
LAC IV (%)	-0,20	1,00			
SNG (%)	-0,29	0,53	1,00		
G IV (%)	0,26	-0,16	-0,18	1,00	
PB KJ (%)	0,04	-0,17	0,55	0,27	1,00

#### Matriz de correlação/Probabilidades

	CCS MG	LAC IV (%)	SNG (%)	G IV (%)	PB KJ (%)
CCS MG					
LAC IV (%)	0,0045				
SNG (%)	<0,0001	<0,0001			
G IV (%)	0,0002	0,0206	0,0121		
PB KJ (%)	0,6005	0,0172	<0,0001	0,0001	

#### Autovalores

Lambda	Valor	Proporção	Prop Acum
1	1,86	0,37	0,37
2	1,47	0,29	0,67
3	0,86	0,17	0,84
4	0,70	0,14	0,98
5	0,10	0,02	1,00

#### Autovetores

Variáveis	e1	e2	e3
CCS MG	-0,42	0,23	0,58
LAC IV (%)	0,52	-0,20	0,69
SNG (%)	0,65	0,31	0,07
G IV (%)	-0,30	0,51	0,34
PB KJ (%)	0,20	0,74	-0,26

#### Correlação com as variáveis originais

Variáveis	CP 1	CP 2	CP 3
CCS MG	-0,57	0,28	0,54
LAC IV (%)	0,70	-0,24	0,64
SNG (%)	0,89	0,37	0,06
G IV (%)	-0,40	0,62	0,32
PB KJ (%)	0,28	0,90	-0,24

e = eixo; CP1, CP2 e CP3 = componentes principais 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabelas 38 a 42 (Anexo). Análise de componentes principais da análise multivariada da associação produção média diária de leite, teores em gordura e ST por EIVM, CCS, PB por MRK e contagem indireta de microrganismos a 30°C/72 horas de 200 amostras de leites de tanques de refrigeração de Minas Gerais.

### Análises de componentes principais

*Dados padronizados*

#### Matriz de correlação/coeficientes

	G IV (%)	Produção	CCS MG	CBT MG	ST IV (%)	PB KJ (%)
G IV (%)	1,00					
Produção	-0,01	1,00				
CCS MG	0,26	0,06	1,00			
CBT MG	-0,07	-0,21	-0,06	1,00		
ST IV (%)	0,83	-0,06	0,08	0,01	1,00	
PB KJ (%)	0,28	-0,05	0,04	0,11	0,57	1,00

#### Matriz de correlação/Probabilidades

	G IV (%)	Produção	CCS MG	CBT MG	ST IV (%)	PB KJ (%)
G IV (%)						
Produção	0,8850					
CCS MG	0,0002	0,3960				
CBT MG	0,3027	0,0035	0,4039			
ST IV (%)	<0,0001	0,3762	0,2727	0,8940		
PB KJ (%)	0,0001	0,4506	0,5798	0,1241	<0,0001	

#### Autovalores

Lambda	Valor	Proporção	Prop	Acum
1	2,19	0,37		0,37
2	1,28	0,21		0,58
3	0,95	0,16		0,74
4	0,82	0,14		0,88
5	0,66	0,11		0,98
6	0,09	0,02		1,00

#### Autovetores

Variáveis	e1	e2	e3
G IV (%)	0,59	-0,16	0,08
Produção	-0,05	-0,60	-0,35
CCS MG	0,18	-0,37	0,84
CBT MG	0,01	0,65	0,28
ST IV (%)	0,64	0,04	-0,16
PB KJ (%)	0,45	0,23	-0,26

#### Correlação com as variáveis originais

Variáveis	CP 1	CP 2	CP 3
G IV (%)	0,88	-0,18	0,07
Produção	-0,08	-0,68	-0,34
CCS MG	0,27	-0,42	0,82
CBT MG	0,01	0,74	0,27
ST IV (%)	0,95	0,04	-0,16
PB KJ (%)	0,67	0,26	-0,25

e = eixo; CP1, CP2 e CP3 = componentes principais 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabelas 43 a 47 (Anexo). Análise de componentes principais da análise multivariada da associação produção média diária de leite, teores em gordura por EIVM, PB por MRK e NNP de 200 amostras de leites de tanques de refrigeração de Minas Gerais.

### Análise de componentes principais

*Dados padronizados*

#### Matriz de correlação/Coefficientes

	Produção	PB KJ (%)	NNP (%)	G IV (%)
Produção	1,00			
PB KJ (%)	-0,05	1,00		
NNP (%)	0,20	0,21	1,00	
G IV (%)	-0,01	0,28	0,07	1,00

#### Matriz de correlação/Probabilidades

	Produção	PB KJ (%)	NNP (%)	G IV (%)
Produção				
PB KJ (%)	0,4506			
NNP (%)	0,0040	0,0027		
G IV (%)	0,8850	0,0001	0,3410	

#### Autovetores

Variáveis	e1	e2	e3
Produção	0,17	0,76	0,51
PB KJ (%)	0,64	-0,28	-0,28
NNP (%)	0,53	0,47	-0,49
G IV (%)	0,54	-0,36	0,65

#### Autovalores

Lambda	Valor	Proporção	Prop Acum
1	1,39	0,35	0,35
2	1,15	0,29	0,64
3	0,82	0,21	0,84
4	0,64	0,16	1,00

#### Correlação com as variáveis originais

Variáveis	CP 1	CP 2	CP 3
Produção	0,20	0,81	0,46
PB KJ (%)	0,75	-0,30	-0,26
NNP (%)	0,62	0,50	-0,44
G IV (%)	0,63	-0,39	0,59

e = eixo; CP1, CP2 e CP3 = componentes principais 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 48 (Anexo). Análise de variância da resposta PB com as duas fontes de variação constituídas pelo grupo experimental de concentração de uréia adicionada e pelas amostras.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	31	1,89757	0,0612121	2298,94	0,000
Conc. uréia	3	0,25706	0,0856850	3218,07	0,000
Erro	93	0,00248	0,0000266		
Total	127	2,15711			

Nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

Tabela 49 (Anexo). Análise de variância da resposta teor em gordura no leite (% m/m) com os fatores grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	31	47,5359	1,53342	2681,83	0,000
Conc. uréia	3	0,0276	0,00921	16,11	0,000
Erro	93	0,0532	0,00057		
Total	127	47,6167			

Nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

Tabela 50. Análise de variância da resposta teor em lactose (% m/m) com os fatores grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	31	0,779143	0,0251337	861,14	0,000
Conc. uréia	3	0,005752	0,0019173	65,69	0,000
Erro	93	0,002714	0,0000292		
Total	127	0,787610			

Nível de significância  $\alpha$  de 0,05.

Tabela 51. Análise de variância da resposta teor em sólidos totais (% m/m) com os fatores grupo experimental de concentração de uréia adicionada e amostras.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	P
Amostra	31	30,0396	0,969018	2490,44	0,000
Conc. uréia	3	0,3364	0,112145	288,22	0,000
Erro	93	0,0362	0,000389		
Total	127	30,4122			

Nível de significância  $\alpha = 0,05$ .