UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

***CAMPUS* UNIVERSITÁRIO DE SINOP**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Eficácia da Espectroscopia por Ultrassom e do Congelamento na Avaliação da Composição Química do Leite

Maura Frare Menegon

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Zootecnia.

Sinop, Mato Grosso

Dezembro de 2016

MAURA FRARE MENEGON

Eficácia da Espectroscopia por Ultrassom e do Congelamento na Avaliação da Composição Química do Leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. André Soares de Oliveira

Sinop, Mato Grosso

Dezembro de 2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

F839e Frare Menegon, Maura.
Eficácia da Espectroscopia de Ultrassom e do Congelamento na Avaliação da Composição Química do Leite. / Maura Frare Menegon. -- 2016
xi, 22 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: André Soares de Oliveira.
Co-orientadora: Claudineli Cássia Bueno da Rosa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Sinop, 2016.
Inclui bibliografia.

1. método analítico. 2. análise química. 3. correlação. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUACÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Avenida Alexandre Ferronato, 1200 - Reserva 35 - Distrito Industrial - Cep: -Sinop/MT
Tel : - Email : ppgzootecnia@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO : "Eficácia da espectroscopia de ultra-som e do congelamento na avaliação da composição química do leite"

AUTOR : Mestranda MAURA FRARE MENEGON

Dissertação defendida e aprovada em 16/12/2016.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador Doutor(a) André Soares de Oliveira
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Coorientador Doutor(a) Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Coorientador Doutor(a) CLAUDINELI CÁSSIA BUENO DA ROSA
Instituição : UFMT

Examinador Externo Doutor(a) Rafael Monteiro Araújo Teixeira
Instituição : Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Examinador Suplente Doutor(a) Eduardo Henrique Bevitori Kling de Moraes
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

SINOP,09/02/2017.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. André Soares de Oliveira pelos ensinamentos, confiança e exemplo profissional.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Claudineli Cássia Bueno da Rosa, obrigada por toda ajuda, amizade, por contribuir no meu crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira pelos conhecimentos adquiridos durante o mestrado e sua amizade.

À Universidade Federal de Mato Grosso/Campus Sinop, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (PRONEN 2011, Processo 483724).

Ao meu colega Lucas Olini que foi meu grande amigo e me ajudou muito durante todo o mestrado.

As minhas amigas e ajudantes, Fernanda Norberto, Leticia Menegazzo e Fernanda Rodrigues Souza, que não mediram esforços em me auxiliar. Obrigada meninas, vocês foram peças fundamentais nesse trabalho.

BIOGRAFIA

Maura Frare Menegon, brasileira, filha de Fatima Frare e Mauro João Menegon, natural de São José do Cedro, Santa Catarina, nascida em 26 de março de 1989.

Graduada em Zootecnia pela Universidade Federal de Mato Grosso, *campus* Sinop, em 2012.

Iniciou Mestrado em Zootecnia com ênfase em Nutrição e Produção de Ruminantes, na Universidade Federal de Mato Grosso, *campus* Sinop, em março de 2014.

RESUMO

MENEGON, Maura Frare. Dissertação de Mestrado (Zootecnia), Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, setembro de 2016, 21 f. **Eficácia da Espectroscopia de Ultrassom e do Congelamento na Avaliação da Composição Química do leite.** Orientador: Prof. Dr. André Soares de Oliveira. Coorientadores: Profa. Dra. Claudineli Cássia Bueno da Rosa e Profa. Dra. Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira.

Objetivou-se avaliar o método de espectroscopia por ultrassom e o efeito do congelamento do leite nas análises de gordura e proteína do leite de vaca. Cem amostras de leite de vaca foram analisadas imediatamente após a coleta em tanque de expansão de um rebanho leiteiro (in natura), congeladas a -20^{o}C por 30 dias e novamente analisados os teores de gordura e proteína. Todas as análises de gordura e proteína foram feitas em triplicata. As análises de gordura, denominadas método oficial, foram realizadas usando o método do butirômetro de Gerber. As análises de proteína bruta, denominadas método oficial, foram realizadas usando o método micro-Kjedahl. A análise por espectroscopia por ultrassom foi feita com o equipamento calibrado de fábrica para leite de vaca (Master Classic Complete, Akso Produtos Eletrônicos, São Leopoldo, RS, Brasil). Os efeitos do método (oficial versus espectroscopia por ultrassom) e do congelamento do leite foram analisados como delineamento inteiramente casualizado, com o efeito do método repetido no tempo (in natura ou congelado por 30 dias). Adicionalmente, foi ajustado regressão linear simples entre os valores obtidos com o método ultrassom e métodos oficiais. Observou-se efeito de interação ($P < 0.01$) entre o método analítico (oficial *versus* espectroscopia por ultrassom) e congelamento do leite sobre os teores de gordura e proteína bruta. A espectroscopia por ultrassom superestimou em 0,51 pontos percentuais ($P < 0.01$) o teor de gordura no leite *in natura* e em 0,36 pontos percentuais ($P < 0.01$) no leite submetido

ao congelamento. Porém, observou-se alto coeficiente de correlação (r = 0,82) entre teor de gordura obtido por espectroscopia por ultrassom com método oficial especificamente no leite *in natura*, indicando potencial de uso da espectroscopia por ultrassom mediante desenvolvimento de equações de calibração. O congelamento do leite por 30 dias não afetou ($P = 0.15$) o teor de gordura do leite obtido pelo método oficial (butirômetro de Gerber), mas reduziu o teor de gordura ($P < 0.01$) obtido com a espectroscopia por ultrassom. A espectroscopia por ultrassom subestimou em 0,29 pontos percentuais ($P < 0.01$) o teor de proteína no leite *in natura* e em 0,87 pontos percentuais ($P < 0.01$) no leite submetido ao congelamento. O congelamento do leite por 30 dias aumentou ($P < 0.01$) o teor de proteína do leite obtido pelo método oficial (Kjeldahl), mas reduziu o teor de proteína ($P < 0.01$) obtido com a espectroscopia por ultrassom. Os teores de gordura e proteína do leite obtidos pelo método de espectroscopia por ultrassom são divergentes daqueles obtidos por métodos oficiais, independente da amostra ser *in natura* ou submetida ao congelamento. Porém, o método de espectroscopia por ultrassom poderá ser usado para estimar os teores de gordura desde que se ajuste equações de calibração com um banco de dados abrangentes. Não se recomenda análises dos teores de proteína e gordura do leite submetido ao congelamento.

Palavras-chave: método analítico, análise química, correlação.

ABSTRACT

MENEGON, Maura Frare. Master thesis (Animal Science), Federal University of Mato Grosso, University Campus of Sinop, September 2016, 21 f. **Effectiveness of ultrasound Spectroscopy and freezing in the assessment of the chemical composition of the milk.** Adviser: Prof. Dr. André Soares de Oliveira.Co-adivisers: Profa. Dra. Claudineli Cássia Bueno da Rosa e Profa. Dra. Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira.

Objective to evaluate the ultrasonic spectroscopy method and the effect of freezing the milk fat and protein analyses of cow's milk. 100 samples of cow's milk were analyzed immediately after collecting in expansion tank of a dairy herd (fresh), frozen at-20oC for 30 days and again examined the levels of fat and protein. All the analyses of fat and protein were made in triplicate.The analyses of fat, known as official method, using the butirômetro method of Gerber. The analyses of crude protein, called official method, using the micro-Kjedahl method. Ultrasound spectroscopy analysis was made with the equipment calibrated at the factory to cow's milk (Master Classic Complete, Electronic Products By Akzo Was, São Leopoldo, RS, Brazil). The effects of method (official versus ultrasound spectroscopy) and freezing of milk were analyzed as a completely randomized design, with the effect of the repeated method in time (in natura or frozen for 30 days). Additionally, simple linear regression was adjusted between the values obtained with the Ultrasound method and official methods. Interaction effect was observed ($P < 0.01$) between the analytical method (official versus ultrasound spectroscopy) and freezing the milk about the levels of fat and protein. Ultrasound spectroscopy in 0.51 percentage points overestimated ($P < 0.01$) the fat content in fresh milk and on 0.36 percentage points ($P < 0.01$) in the milk to freezing. However, there was high correlation coefficient ($r = 0.82$) between fat obtained by ultrasound spectroscopy with official method specifically in fresh milk, indicating potential use of ultrasound spectroscopy through development of calibration equations.The freezing of the milk by 30 days did not affect ($P = 0.15$) the fat content of milk obtained by the official method (Gerber butirômetro), but reduced the fat content ($P < 0.01$) obtained with ultrasound spectroscopy. Ultrasound spectroscopy underestimated in 0.29 percentage points ($P < 0.01$) the protein content in fresh milk and 0.87 percentage points in the milk to freezing. The freezing of the milk by 30 days increased ($P < 0.01$) the protein content of milk obtained by the official method (Kjeldahl method), but reduced protein content ($P < 0.01$) obtained with ultrasound spectroscopy. The fat and protein

content of milk obtained by the method of ultrasound spectroscopy are divergent from those obtained by the official methods, independent of the sample be in natura or subjected to freezing. However, the method of ultrasound spectroscopy can be used to estimate the levels of fat since fit the calibration equations with a comprehensive database. It is not recommended to analysis of the levels of protein and fat from milk subjected to freezing.

Keywords: analytical method, chemical analysis, correlation.

SUMÁRIO

Introdução geral.....1

Referências.....5

Eficácia da espectroscopia por ultrassom e do congelamento na avaliação da composição química do leite.....7

Introdução.....9

Material e métodos.....12

Resultados e discussão.....13

Conclusões.....17

Referências.....18

Introdução Geral

O conhecimento da composição química do leite cru é fundamental nas políticas oficiais de controle da qualidade do produto, nos programas de pagamento ao produtor por qualidade, nos programas de melhoramento genético de rebanhos, na determinação das exigências nutricionais de vacas leiteiras e no monitoramento do estado nutricional e clínico dos animais. Normalmente, este monitoramento é realizado por laboratórios oficiais credenciados junto ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), e nos estabelecimentos beneficiadores de leite.

Com o monitoramento obrigatório do leite cru estabelecido pela Instrução Normativa Número 62 (IN 62, MAPA) e com maior necessidade de monitoramento nutricional dos animais, o número de amostras de leite bem como a frequência das análises tendem a aumentar, tornando imperativa a utilização de métodos analíticos que resultem em resultados seguros em curto espaço de tempo (Possano et al, 2007). Além disso, métodos de processamento e armazenamento das amostras devem ser estabelecidos para permitir maior comodidade e facilidade operacional, mas sem afetar a acurácia e precisão analítica.

Há vários métodos bem estabelecidos para as determinações físico-químicas dentre os quais aqueles adotados pela legislação vigente como sendo oficiais, como o método de Gerber para gordura e Kjeldalh para proteína (IDF, 1991; IDF, 1993; Brasil, 2003). Os métodos oficiais exigem tempo, mão de obra treinada e requerem reagentes caros e perigosos para sua execução. A Instrução Normativa Número 62 (MAPA) estabelece também, que tais métodos poderão ser substituídos por outros métodos de controle operacional, desde que sejam conhecidos seus desvios e correlações em relação aos respectivos métodos de referência. Assim, o desenvolvimento e avaliação de métodos

alternativos e acurados mais rápidos e de menor custo proporcionarão benefícios à cadeia produtiva do leite.

As técnicas de análise por infravermelho próximo para análise do leite foram aperfeiçoadas nos últimos 30 anos, permitindo-se analisar um número elevado de amostras com acurácia e precisão (IDF, 1999). Atualmente, representa o principal método usado nos laboratórios oficiais de controle da qualidade de leite no Brasil e no mundo (IDF, 1999). Porém, os elevados custos de aquisição dos equipamentos ainda limita sua adoção em diversos laboratórios, nos estabelecimentos beneficiadores e nas propriedades rurais.

O método de espectroscopia por ultrassom representa uma alternativa para determinação físico-química do leite, em razão do menor custo do equipamento em relação à técnica por infravermelho. A tecnologia ultrassônica foi desenvolvida a partir do princípio fundamental de que a matéria é capaz de absorver o som, atenuando-o ou alterando sua velocidade, permitindo-se estabelecer associação com composição física e química (Buckin et al., 2003; Dukhin et al. 2003; Ponsano et al., 2007). De acordo com Gunasekaran e Ay (1994), o uso da tecnica de ultrassom na indústria de alimentos se iniciou na década de 1960, em análises de teores de sólidos não gordurosos e gordura do leite.

A espectroscopia de ultrassom baseia-se no princípio físico de que o movimento de qualquer onda é afetado pelo meio por onde ela está se propagando (Pansano et al., 2007). Dessa forma, a propagação das ondas sonoras em um determinado meio fornece informações sobre ele pela análise da transmissão ou da reflexão dos sinais gerados (Pansano et al., 2007). Conforme descrito em Ponsano et al. (2007), essa técnica emprega ondas sonoras de alta frequência que imprimem forças intermoleculares aos materiais em teste. As oscilações de compressão ou descompressão das ondas

ultrassônicas causam oscilações no arranjo molecular da amostra, que responde com forças de atração ou repulsão intermoleculares (Ponsano et al., 2007).

Ainda conforme descrito em Ponsano et al. (2007), as amplitudes de deformação nas ondas ultrassônicas empregadas na determinação analítica nas amostras são extremamente pequenas, tornando a técnica não destrutiva, o que representa uma oportunidade para caracterização de produtos alimentícios de base líquida, incluindo amostras opacas como o leite (Buckin et al., 2003; Dukhin et al., 2003; Nelligan, 2003). Além de ser automática, a tecnologia não utiliza reagente e pode ser utilizada para qualquer tipo de leite fluido (Possano et al. 2007).

Em estudos preliminares com número limitado de amostras têm indicado alta correlação dos valores de gordura e proteína obtidos pelo método ultrassom com os procedimentos oficiais para análise do leite cru, embora com divergências nas estimativas das médias (Ponsano et al., 2007; Venturoso et al., 2007). Assim, ainda é necessário investigar o potencial do uso do método de espectroscopia por ultrassom para analises dos teores de gordura e proteína do leite.

A análise do leite, seja por métodos oficiais ou alternativos, tem sido feita em amostras i*n natura* ou conservadas com conservante (exemplo Bronopol) e resfriada em curto período (menos de cinco dias). Todavia, em situações de experimentação animal ou nas propriedades rurais, a necessidade de analise imediata do leite *in natura* representa um inconveniente operacional. O congelamento das amostras para posterior análise pode facilitar os procedimentos experimentais e analíticos. Todavia, o congelamento do leite pode provocar a perda da estabilidade das micelas de caseína e a coalescência dos glóbulos de gordura (Walstra et al., 2006). Desta forma, pode afetar as análises principalmente por métodos físicos como a espectroscopia por ultrassom. Como nas análises por métodos químicos (Gerber e Kjeldalh) ocorre ação de ácidos

fortes nas amostras, nossa hipótese é que os efeitos do congelamento possam ser menos acentuados nestes métodos. Porém, os efeitos do congelamento do leite sobre a composição química do leite ainda são inconsistentes, sendo observados aumentos nos teores de gordura e proteína no leite de vaca (Weese et al., 1969) e ausência de efeito do congelamento em outros estudos com leite de cabra e ovelhas (Zhang et al., 2006; Curi and Bonassi, 2007; Oliveira et al., 2012), indicando que leite de vaca pode ser mais susceptível ao efeito do congelamento. Desta forma, ainda faz-se necessário investigar os efeitos do congelamento sobre as estimativas dos teores de gordura e proteína do leite de vacas.

A nossa hipótese é que o método de espectroscopia por ultrassom estime os teores de gordura e proteína do leite de vaca com acurácia e precisão e pode ser usado como alternativa aos métodos oficiais. Além disso, é hipótese também que o congelamento do leite não afeta as estimativas dos teores de gordura e proteína do leite obtidos por métodos químicos oficiais.

Objetivou-se avaliar o método de espectroscopia por ultrassom e o efeito do congelamento do leite na analises de gordura e proteína do leite.

O próximo capítulo foi elaborado conforme normas do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Referências

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p.1-24.

BUCKIN, V.; O'DRISCOLL, B.; SMYTH, C. **Ultrasonic spectroscopy for material analysis: recent advances.** ***Spectrosc. Eur.***, 2003,v.15, p.20–25.

CURI, R.A.; BONASSI, I.A. Elaboração de um queijo análogo ao Pecorino Romano produzido com leite de cabra e coalhada congelados. **Ciência e Agrotecnologia**, 2007, v.31, p.171-176.

DUKHIN, A.S.; GOETZ, P.J.; TRAVERS, B. Ultrasound for characterizing liquid based food products. 1 – acoustic spectroscopy. **Mount Kisco: Dispersion Technology**, 2003. 26f.

GUNASEKARAN, S.; AY, C. **Evaluating Milk coagulation with ultrasonics**. Chicago, 1994.Disponível em: http://144.92.76.98/Guna/evaluatingmilk94.>.Acessado em: 21 set. 2012

INTERNATIONAL **Dairy Federation**. Fat content in milk **–** butyrometric method. Standard 152. Bruxelas: IDF, 1991.

INTERNATIONAL **Dairy Federation**. Milk. Determination of the total nitrogen content. Bruxelas: IDF, 1993. Standard 20B.

INTERNATIONAL **Dairy Federation**. Milk. Determination and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and quality control in the dairy laboratory. Bruxelas: IDF, 1999.Standard 128A.

NELLIGAN, T.J. An introduction to ultrasonic material analysis. **Waltham: General Electric**, 2003. 3f.

OLIVEIRA, J. M. et al. Características físicoquímicas do leite de cabra pasteurizado e congelado, produzido em Campo Grande-MS. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, 2002, v. 16, n. 102/103, p. 107–111.

PONSANO, E.H.G.; PERRI, S.H.V.; MADUREIRA, F.C.P. et al. Correlação entre métodos tradicionais e espectroscopia de ultra-som na determinação de caracteristicas fisico-quimicas do leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2007,v.59, p.1052-1057.

VENTUROSO, R.C.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A.M. et al. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêiticas**.2007, v.43, n.4. p.607-613.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology. 2. ed. United States of America: TAYLOR & FRANCIS,** 2006. 763p.

WEESE, S.J.; BUTCHER, D.F.; and THOMAS, R.O. Effect of freezing and length of storage on milk properties. **Journal of Dairy Science**, 1969, v. 52, n.11, p.1724-1726.

ZHANG, R.H.; MUSTAFA, A.F.; NG-KWAI-HANG, et al; X. Effects of freezing on composition and fatty acid profiles of sheep milk and cheese. **Small Ruminant Research**, 2006, v.64, p.203-210.

Eficácia da espectroscopia por ultrassom e do congelamento na avaliação da composição química do leite

Resumo: Objetivou-se avaliar o método de espectroscopia por ultrassom e o efeito do congelamento do leite nas análises de gordura e proteína do leite de vaca. Cem amostras de leite de vaca foram analisadas imediatamente após a coleta em tanque de expansão (in natura), congeladas a -20^{o}C por 30 dias e novamente analisados os teores de gordura e proteína. Todas as análises de gordura e proteína foram feitas em triplicata. As análises de gordura, denominado método oficial, foram realizadas utilizando o método do butirômetro de Gerber. As análises de proteína bruta, denominado método oficial, foram realizadas utilizando o método micro-Kjedahl. A análise por espectroscopia por ultrassom foi feita com o equipamento calibrado de fábrica para leite de vaca (Master Classic Complete, Akso Produtos Eletrônicos, São Leopoldo, RS, Brasil). Os efeitos do método (oficial versus espectroscopia por ultrassom) e do congelamento do leite foram analisados como delineamento inteiramente casualizado, com o efeito do método repetido no tempo (in natura ou congelado). Adicionalmente, foi ajustado por regressão linear simples entre os valores obtidos com o método ultrassom e métodos oficiais. Observou-se efeito de interação ($P < 0.01$) entre o método analítico (oficial *versus* espectroscopia por ultrassom) e congelamento do leite sobre os teores de gordura e proteína bruta. A espectroscopia por ultrassom superestimou em 0,51 pontos percentuais ($P < 0.01$) o teor de gordura no leite *in natura* e em 0,36 pontos percentuais ($P < 0.01$) no leite submetido ao congelamento. Porém, observou-se alto coeficiente de correlação (r = 0,82) entre teor de gordura obtido por espectroscopia por ultrassom com

método oficial especificamente no leite *in natura*, indicando potencial de uso da espectroscopia por ultrassom mediante desenvolvimento de equações de calibração. O congelamento do leite por 30 dias não afetou ($P = 0.15$) o teor de gordura do leite obtido pelo método oficial (butirômetro de Gerber), mas reduziu o teor de gordura ($P < 0.01$) obtido com a espectroscopia por ultrassom. A espectroscopia por ultrassom subestimou em 0,29 pontos percentuais ($P < 0.01$) o teor de proteína no leite *in natura* e em 0,87 pontos percentuais ($P < 0.01$) no leite submetido ao congelamento. O congelamento do leite por 30 dias aumentou ($P < 0.01$) o teor de proteína do leite obtido pelo método oficial (Kjeldahl), mas reduziu o teor de proteína ($P < 0.01$) obtido com a espectroscopia por ultrassom. Os teores de gordura e proteína do leite obtidos pelo método de espectroscopia por ultrassom são divergentes daqueles obtidos por métodos oficiais, independente da amostra ser *in natura* ou submetida ao congelamento. Porém, o método de espectroscopia por ultrassom poderá ser usado para estimar os teores de gordura desde que se ajustem equações de calibração com um banco de dados abrangentes. Não se recomenda análises dos teores de proteína e gordura do leite submetido ao congelamento.

Palavras-chave: método analítico, análise química, correlação.

Introdução

O conhecimento da composição química do leite cru é fundamental nas políticas oficiais de controle da qualidade do produto, nos programas de pagamento ao produtor por qualidade, nos programas de melhoramento genético de rebanhos, na determinação das exigências nutricionais de vacas leiteiras e no monitoramento do estado nutricional e clínico dos animais. Normalmente, este monitoramento é realizado por laboratórios oficiais credenciados junto ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), e nos estabelecimentos beneficiadores de leite.

Há vários métodos bem estabelecidos para as determinações físico-químicas dentre os quais aqueles adotados pela legislação vigente como sendo oficiais, como o método de Gerber para gordura e Kjeldalh para proteína (IDF, 1991; IDF, 1993; Brasil, 2003). Os métodos oficiais exigem tempo, mão de obra treinada e requerem reagentes caros e perigosos para sua execução. A IN 62 estabelece, também, que tais métodos poderão ser substituídos por outros métodos de controle operacional, desde que sejam conhecidos seus desvios e correlações em relação aos respectivos métodos de referência. Assim, o desenvolvimento e avaliação de métodos alternativos e acurados mais rápidos e de menor custo proporcionarão benefícios à cadeia produtiva.

As técnicas de análise por infravermelho próximo para análise do leite foram aperfeiçoadas nos últimos 30 anos, permitindo-se hoje analisar número elevado de amostras com acurácia e precisão (IDF, 1999). Atualmente, representa o principal método usado nos laboratórios oficiais de controle da qualidade de leite no Brasil e no

mundo. Porém, os elevados custos de aquisição dos equipamentos ainda limita sua adoção em diversos laboratórios, nos estabelecimentos beneficiadores e nas propriedades rurais.

O método de espectroscopia por ultrassom representa uma alternativa para determinação físico-química do leite, em razão do menor custo do equipamento em relação à técnica por infravermelho. A tecnologia ultrassônica foi desenvolvida a partir do princípio fundamental de que a matéria é capaz de absorver o som, atenuando-o ou alterando sua velocidade, permitindo-se estabelecer associação com composição física e química (Buckin et al., 2003; Dukhin et al. 2003; Ponsano et al., 2007). Em estudos preliminares com numero limitado de amostras têm indicado alta correlação dos valores de gordura e proteína obtidos pelo método ultrassom com os procedimentos oficiais para análise do leite cru, embora com divergências nas estimativas das médias (Ponsano et al., 2007; Venturoso et al., 2007). Assim, ainda é necessário investigar potencial do uso do método de espectroscopia por ultrassom para analises dos teores de gordura e proteína do leite.

As análises do leite, sejam por métodos oficiais ou alternativos, tem sido feitas em amostras i*n natura* ou conservadas com conservante (exemplo Bronopol) e resfriada em curto período (menos de cinco dias). Todavia, em situações de experimentação animal ou nas propriedades rurais, a necessidade de análise imediata do leite *in natura* representa um inconveniente operacional. O congelamento das amostras para posterior analise pode facilitar os procedimentos experimentais e analíticos. Entanto, o congelamento do leite pode provocar a perda da estabilidade das micelas de caseína e a coalescência dos glóbulos de gordura (Walstra et al., 2006). Desta forma, pode afetar as análises principalmente por métodos físicos como a espectroscopia por ultrassom. Como nas análises por métodos químicos (Gerber e Kjeldalh) ocorre ação de ácidos

fortes nas amostras, nossa hipótese é que os efeitos do congelamento podem ser menos acentuados nestes métodos. Porém, os efeitos do congelamento sobre a composição química do leite ainda são inconsistentes, sendo observados aumento nos teores de gordura e proteína no leite de vaca (Weese et al., 1969) e ausência de efeito do congelamento em outros estudos com leite de cabra e ovelhas (Zhang et al., 2006; Curi and Bonassi, 2007; Oliveira et al., 2012), indicando que leite de vaca pode ser mais susceptível ao efeito do congelamento. Desta forma, ainda faz-se necessário investigar os efeitos do congelamento sobre as estimativas dos teores de gordura e proteína do leite de vacas.

A nossa hipótese é que método de espectroscopia por ultrassom estima os teores de gordura e proteína do leite de vaca com acurácia e precisão, podendo ser usado como alternativa ao métodos oficiais. Além disso, o congelamento do leite não afeta as estimativas dos teores de gordura e proteína do leite obtidos por métodos químicos oficiais.

Objetivou-se avaliar o método de espectroscopia por ultrassom e o efeito do congelamento do leite na analises de gordura e proteína do leite.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pecuária de Leite da Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, MT. Entre Julho e Agosto de 2015 coletou-se 100 amostras de 200 ml de leite cru/cada, logo após a primeira ordenha do dia, em um taque de resfriamento na Fazenda Dona Herminia localizada em Sinop-MT.

Imediatamente antes das coletas o leite armazenado no tanque foi submetido à agitação por 5 minutos. Após a coleta, as amostras foram mantidas em caixa isotérmica e transportadas imediatamente até o Laboratório de Pesquisa em Pecuária de Leite (em

30 minutos), para análise imediata dos teores de gordura e proteína pelos métodos oficiais e espectroscopia por ultrassom, e posterior congelamento (-20^{o}C) durante 30 dias. Após período de 30 dias, as amostras foram descongeladas em banho-maria (25^{o}C) por duas horas, de maneira a manter a temperatura do leite próxima aquela obtida com o leite *in natura* (20-25^{o}C).

Todas as análises de gordura e proteína foram feitas em triplicata. As análises de gordura, denominado método oficial, foram realizadas usando o método do butirômetro de Gerber (IDF, 1991). As análises de proteína bruta, denominado método oficial, foram realizadas usando o método micro-Kjedahl (IDF, 1993) adotando-se o fator de conversão de nitrogênio em proteína bruta de 6,38. A análise por espectroscopia por ultrassom foi feita com o equipamento calibrado de fábrica para leite de vaca (Master Classic Complete, Akso Produtos Eletrônicos, São Leopoldo, RS, Brasil).

Os efeitos do método (oficial versus espectroscopia por ultrassom) e do congelamento do leite foram analisados como delineamento inteiramente casualizado, com o efeito do método repetido no tempo (in natura ou congelado), conforme seguinte modelo geral:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + M_j + C_i \times M_j + e_{ij},$$

em que: Y_{ij} = observação na amostra submetida in natura ou congelada, analisada por métodos oficiais e por ultrassom; μ = média geral; C_i = efeito do congelamento (1 = leite in natura e 2 = leite congelado); M_i = efeito do método dentro de cada condição do leite (1 = oficial e 2 = ultrassom); $C_i \times M_j$ = efeito de interação do congelamento e método de analise; e_{ij} = variação aleatório residual (0; σ^2). Foi adotado nível de 5% de probabilidade para o erro tipo I. Adicionalmente, foi ajustado de regressão linear simples entre os valores obtidos da técnica de ultrassom com os valores obtidos pelos

métodos oficiais, para verificar o grau de correlação e potencial de uso de equações de calibração.

Resultados e discussão

A estatística descritiva dos teores de proteína bruta e gordura do leite *in natura* ou submetido ao congelamento por 30 dias, obtidos por métodos oficiais ou por espectroscopia de ultrassom está apresentada na Tabela 1.

Observou-se efeito de interação ($P < 0.01$) entre o método analítico (oficial *versus* espectroscopia por ultrassom) e congelamento do leite sobre os teores de gordura e proteína bruta. Assim, os efeitos de método e congelamento foram desmembrados (Figuras 1 e 2). A espectroscopia por ultrassom superestimou em 0,51 pontos percentuais ($P < 0.01$) o teor de gordura no leite *in natura* e em 0,36 pontos percentuais ($P < 0.01$) no leite submetido ao congelamento (Figura 1 A). Além disso, os teores de gordura obtido por espectroscopia por ultrassom apresentaram maior coeficiente de variação que aqueles obtidos pelo método oficial (Tabela 1), principalmente com leite *in natura*, indicando menor precisão analítica da espectroscopia por ultrassom.

Nossos achados corroboram com os de Ponsano et al. (2007) e Venturoso et al. (2007) sobre divergências nas estimativas do teores de gordura do leite de vaca obtido com espectroscopia por ultrassom e o método oficial (Gerber). Todavia, estes pesquisadores observaram que a espectroscopia por ultrassom subestimou os teores de gordura enquanto que nós observamos superestimativa. Como a espectroscopia por ultrassom baseia-se na avaliação do comportamento das ondas sonoras de alta frequência ao se propagarem através de uma amostra, e sua posterior calibração com os parâmetros do leite obtidos por métodos oficiais, divergências quanto às equações de

calibração usadas nos equipamentos de ultrassom podem explicar essas diferenças. Porém, observou-se alto coeficiente de correlação (r = 0,82) entre teor de gordura obtido por espectroscopia por ultrassom com método oficial especificamente no leite *in natura* (Figura 3), indicando potencial de uso da espectroscopia por ultrassom mediante desenvolvimento de equações de calibração com banco de dados mais abrangentes.

O congelamento do leite por 30 dias não afetou ($P = 0.15$) o teor de gordura do leite obtido pelo método oficial (butirômetro de Gerber), mas reduziu o teor de gordura ($P < 0.01$) obtido com a espectroscopia por ultrassom (Figura 1 B). O congelamento do leite pode provocar a coalescência dos glóbulos de gordura devido a formação de cristais de gelo e liberação das membranas fosfolipídicas dos glóbulos de gordura que previnem sua agregação (Walstra et al., 2006). Como a espectroscopia por ultrassom é um método físico baseado na avaliação do comportamento da propagação (reflexão, refração ou difração) das ondas sonoras de alta frequência na amostra (Milles et al., 1990), nossa hipótese é que o aumento da coalescência dos glóbulos de gordura com o congelamento provocou alteração no comportamento da ondas ultrassônicas na amostra e, consequentemente, na estimativa do teor de gordura do leite.

Por outro lado, a ausência de efeito de congelamento sobre os teores de gordura obtido com o método oficial pode estar associada ao fundamento analítico. O método de butirômetro de Gerber envolve uma reação de hidrólise ácida com ácido sulfúrico juntamente com álcool amílico, o que permite separar proteínas e carboidratos ligados aos glóbulos de gordura (IDF, 1991). Desta forma, nossa hipótese é que a hidrólise ácida e a separação dos glóbulos de gordura atenuam os efeitos do congelamento sobre a coalescência dos glóbulos de gordura, permitindo-se obter estimativas do teor de gordura do leite submetido ao congelamento semelhante ao leite *in natura*. Porém, diferente ao observado com leite *in natura*, o coeficiente de correlação (r = 0,49) entre

teor de gordura obtido por espectroscopia por ultrassom com método oficial no leite congelado foi baixo (Figura 3), indicando limitações para o desenvolvimento de equações de calibração para espectroscopia por ultrassom com leite submetido ao congelamento.

A espectroscopia por ultrassom subestimou em 0,29 pontos percentuais ($P < 0.01$) o teor de proteína bruta no leite *in natura* e em 0,87 pontos percentuais ($P < 0.01$) no leite submetido ao congelamento (Figura 1 B). Todavia, os teores de proteína bruta obtidos por espectroscopia por ultrassom apresentou menor coeficiente de variação do que por método oficial (Tabela 1) com leite *in natura.* Nossos achados também corroboram com os de Ponsano et al. (2007) e Venturoso et al. (2007) sobre divergências nas estimativas do teores de proteína bruta do leite de vaca obtidos com espectroscopia por ultrassom e o método oficial (Kjeldahl). Entanto, estes pesquisadores observaram que a espectroscopia por ultrassom superestimou os teores de proteína enquanto que nós observamos subestimativa. Semelhante às razões anteriormente apresentadas para gordura do leite, como a espectroscopia por ultrassom baseia-se na avaliação do comportamento das ondas sonoras de alta frequência ao se propagarem através de uma amostra, e sua posterior calibração com os parâmetros do leite obtidos por métodos oficiais, divergências quanto às equações de calibração usadas nos equipamentos de ultrassom podem explicar essas diferenças.

Diferente ao observado para o teor de gordura (leite *in natura*, Figura 3), o coeficiente de correlação entre teor de proteína bruta obtido por espectroscopia por ultrassom com método oficial (Kjeldahl) foi baixo no leite *in natura* (r = 0,40) e no leite submetido ao congelamento (r = - 0,26) (Figura 4), indicando limitações para o desenvolvimento de equações de calibração para a espectroscopia por ultrassom para estimativa do teor de proteína do leite.

Diferente ao observado com o teor de gordura obtido pelo método oficial, o congelamento do leite por 30 dias aumentou ($P < 0.01$) o teor de proteína do leite obtido pelo método oficial (Kjeldahl), mas reduziu o teor de proteína ($P < 0.01$) obtido com a espectroscopia por ultrassom (Figura 1 B). O congelamento do leite pode provocar desestabilização da estrutura molecular da caseína, causando perdas de estabilidade e precipitação (Desai et al., 1961). Todavia, como o método de Kjeldahl baseia-se na obtenção dos teores de nitrogênio total da amostra (fontes proteicas e não proteicas) após digestão ácida, destilação alcalina e titulação ácida (IDF, 1993), o aumento no teor de nitrogênio total não deveria ser esperado com o congelamento. Desta forma, as razões para o aumento no teor e de proteína bruta do leite com o congelamento ainda necessitam ser investigadas. Por outro lado, a precipitação das proteínas causada pelo congelamento pode ter afetado o comportamento da propagação (reflexão, refração ou difração) das ondas sonoras de alta frequência na amostra de leite (Milles et al., 1990), e consequentemente alterado a estimativa do teor de proteína do leite.

Conclusões

Os teores de gordura e proteína do leite obtidos pelo método de espectroscopia por ultrassom são divergentes daqueles obtidos por métodos oficiais, independente da amostra ser *in natura* ou submetida ao congelamento. O congelamento do leite não afeta os teores de gordura do leite obtidos pelo método oficial (Gerber), mas reduz quando obtidos pelo método de espectroscopia por ultrassom. O congelamento do leite afeta os teores de proteína do leite obtidos pelo método oficial (Kjeldahl) ou por espectroscopia de ultrassom. O método de espectroscopia por ultrassom estimou os teores de gordura do leite *in natura* com alta correlação positiva com método oficial (Gerber) e assim, pode ser usado para estimar os teores de gordura desde que se ajustem equações de

calibração com um banco de dados abrangentes. Não se recomenda análises dos teores de proteína e gordura do leite submetido ao congelamento.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso pela concessão da bolsa de mestrado (009/2013) e concessão de recursos para execução do trabalho (PRONEN 2011, Processo 483724). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa (Prof. Andre Soares de Oliveira, Processo 305826/2013-1).

Referências

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p.1-24.

BUCKIN, V.; O'DRISCOLL, B.; SMYTH, C. **Ultrasonic spectroscopy for material analysis: recent advances.** ***Spectrosc. Eur.***, 2003, v.15, p.20–25.

CURI, R.A.; BONASSI, I.A. Elaboração de um queijo análogo ao Pecorino Romano produzido com leite de cabra e coalhada congelados. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.171-176, 2007.

DUKHIN, A.S.; GOETZ, P.J.; TRAVERS, B. Ultrasound for characterizing liquid based food products. 1 – acoustic spectroscopy. **Mount Kisco: Dispersion Technology**, 2003. 26f.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. 2.ed. São Paulo: Lemos, 2001. 175p

INTERNATIONAL **Dairy Federation**. Fat content in milk **–** butyrometric method. Bruxelas: IDF, 1991. Standard 152.

INTERNATIONAL **Dairy Federation**. Milk. Determination of the total nitrogen content. Bruxelas: IDF, 1993. Standard 20B.

INTERNATIONAL **Dairy Federation**. Milk. Determination and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis application to calibration procedure and quality control in the dairy laboratory. Bruxelas: IDF, 1999.

Standard 128A.

OLIVEIRA, J. M. et al. Características físicoquímicas do leite de cabra pasteurizado e congelado, produzido em Campo Grande-MS. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, 2002, v. 16, n. 102/103, p. 107–111.

PONSANO, E.H.G.; PERRI, S.H.V.; MADUREIRA, F.C.P. et al. Correlação entre métodos tradicionais e espectroscopia de ultra-som na determinação de caracteristicas fisico-quimicas do leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2007, v.59, p.1052-1057.

VENTUROSO, R.C.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A.M. et al. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 2007, v.43, n.4. p.607-613.

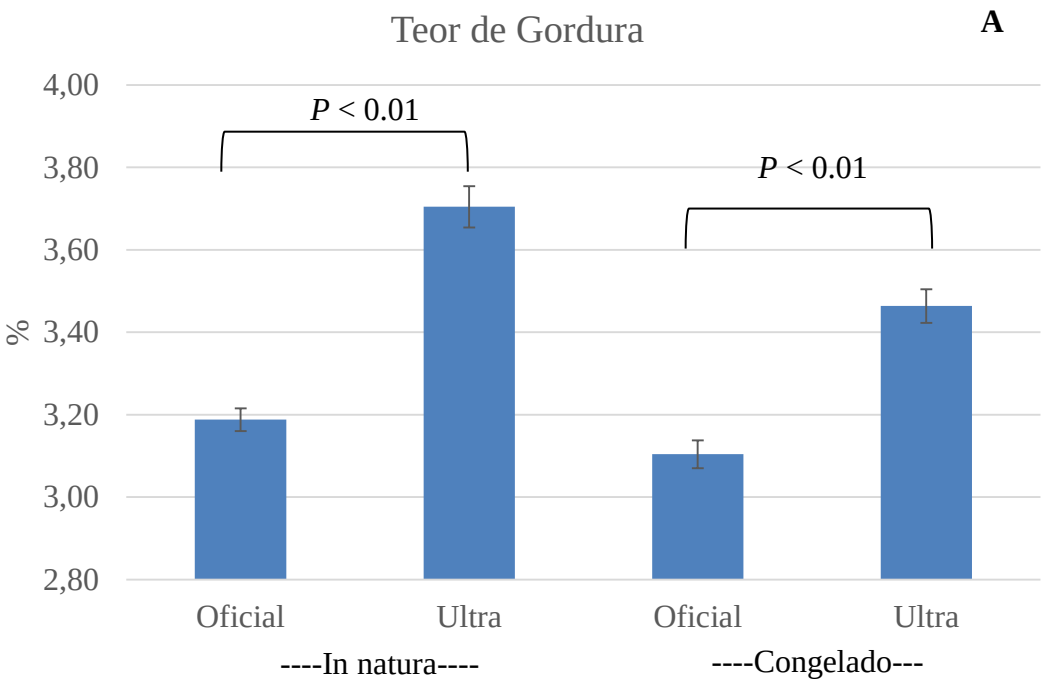
WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**. 2. ed. United States of America: TAYLOR & FRANCIS, 2006. 763p.

WEESE, S.J.; BUTCHER, D.F.; and THOMAS, R.O. Effect of freezing and length of storage on milk properties. **Journal of Dairy Science**, 1969, v. 52, n.11, p.1724-1726.

ZHANG, R.H.; MUSTAFA, A.F.; NG-KWAI-HANG, K.F.; ZHAO, X. Effects of freezing on composition and fatty acid profiles of sheep milk and cheese. **Small Ruminant Research**, 2006, v.64, p.203-210.

Tabela 1 – Estatística descritiva dos teores de proteína bruta e gordura do leite *in natura* ou submetido ao congelamento por 30 dias, obtidos por métodos oficiais ou por espectroscopia de ultrassom (ultra) (n = 100)

Item	*In natura*		Congelado	
	Oficial	Ultra	Oficial	Ultra
Gordura, %				
Média	3,19	3,70	3,10	3,46
Mediana	3,13	3,03	3,07	3,43
Mínimo	2,67	2,65	2,27	2,58
Máximo	3,73	4,15	3,73	4,36
Desvio padrão	0,27	0,50	0,34	0,41
Coeficiente de variação (%)	8,62	13,53	10,84	11,85
Proteína bruta, %				
Média	3,13	2,84	3,46	2,59
Mediana	3,17	2,82	3,48	2,54
Mínimo	2,72	2,65	2,75	2,43
Máximo	3,69	3,70	3,72	3,16
Desvio padrão	0,30	0,15	0,18	0,16
Coeficiente de variação (%)	9,54	5,31	5,23	6,35


Teor de Gordura
A
4,00
3,80
3,60
3,40
3,20
3,00
2,80
%
P < 0.01
P < 0.01
Oficial
Ultra
Oficial
Ultra
----In natura----
----Congelado---

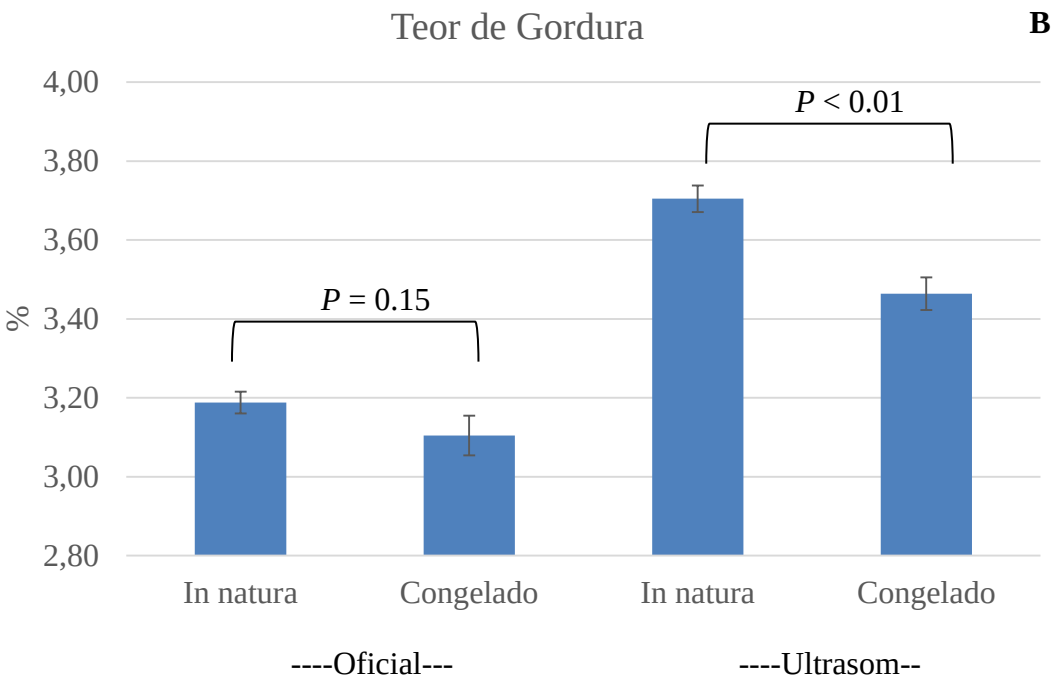
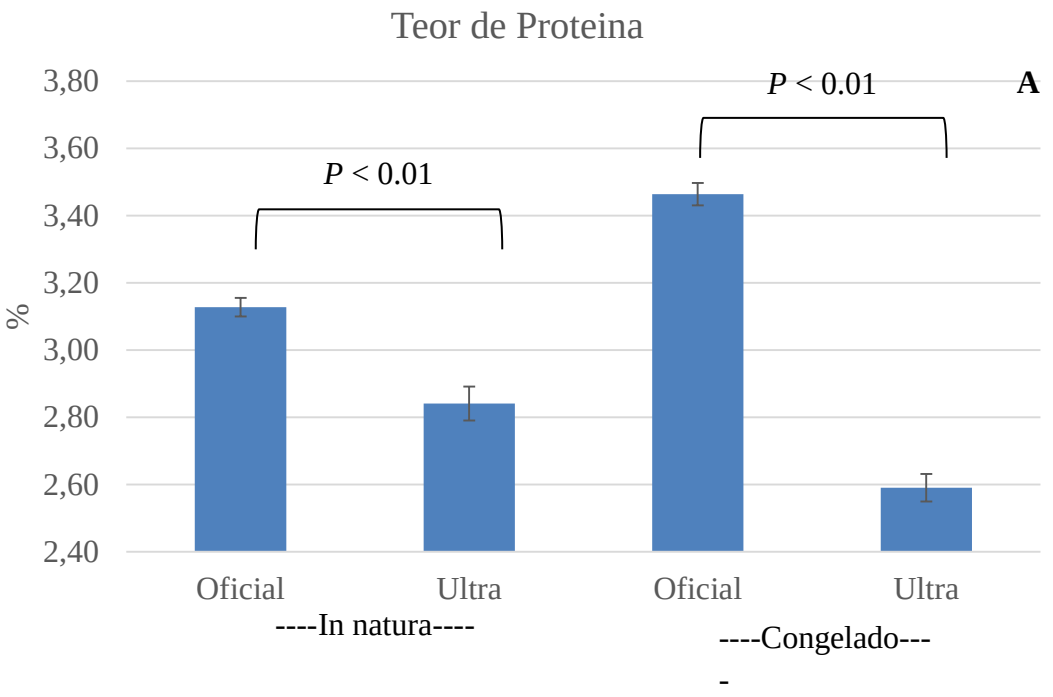


Figura 1 - Efeito do método (oficial ou por espectroscopia de ultrassom, A) e do congelamento do leite (B) sobre os teores de gordura do leite de vaca. Valores médios e erro padrão da média.



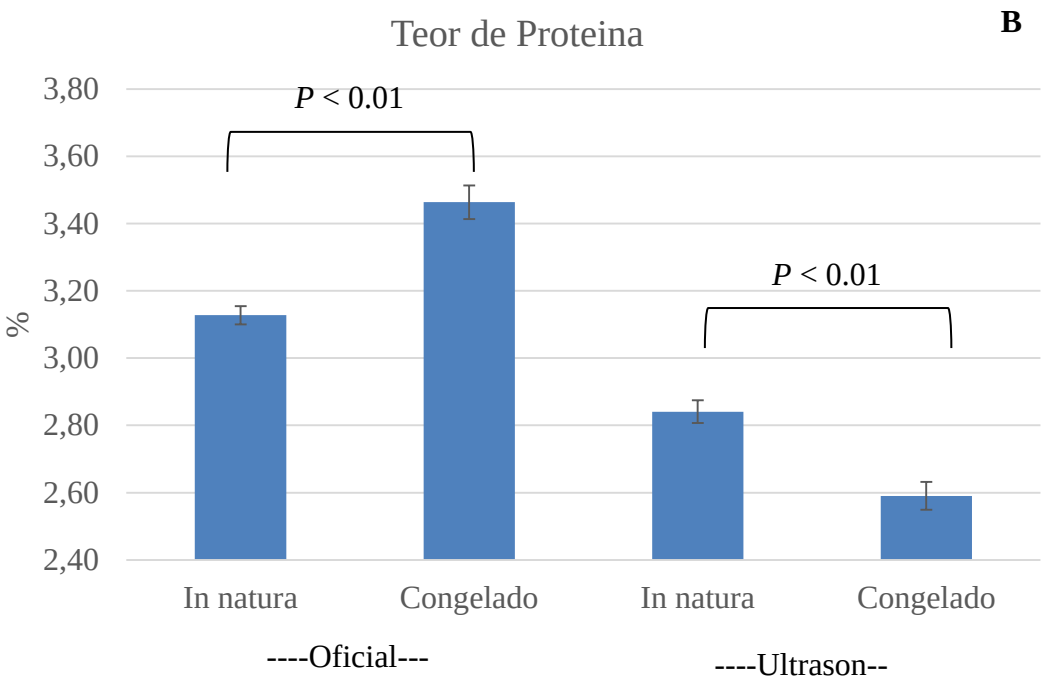


Figura 2 - Efeito do método (oficial ou por espectroscopia de ultrassom, A) e do congelamento do leite (B) sobre os teores de proteína do leite de vaca. Valores médios e erro padrão da média.

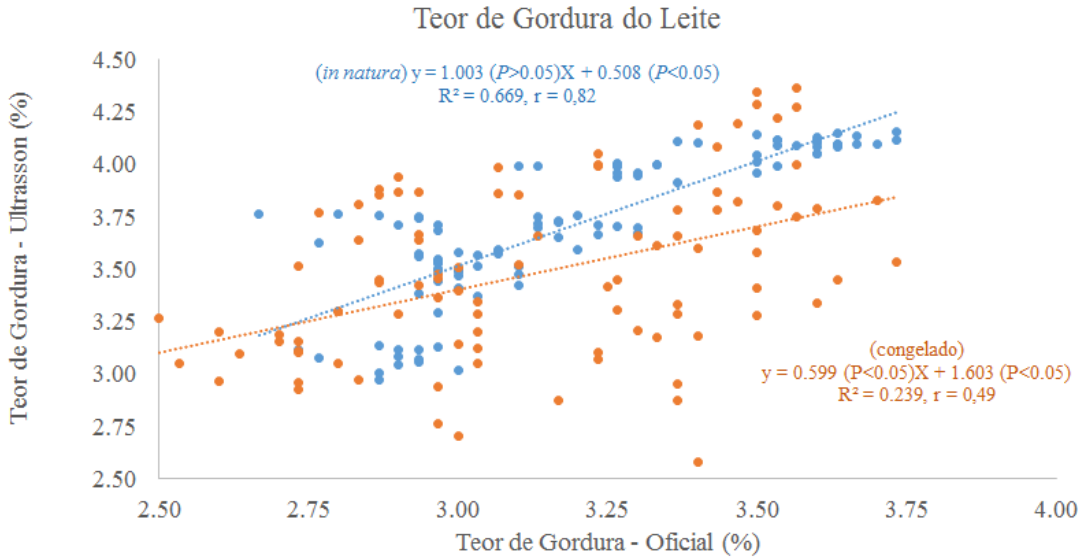


Figura 3 – Relação entre o teor de gordura do leite obtido por espectroscopia de ultrassom e por método oficial (Gerber) em amostras de leite *in natura* ou submetidas ao congelamento.

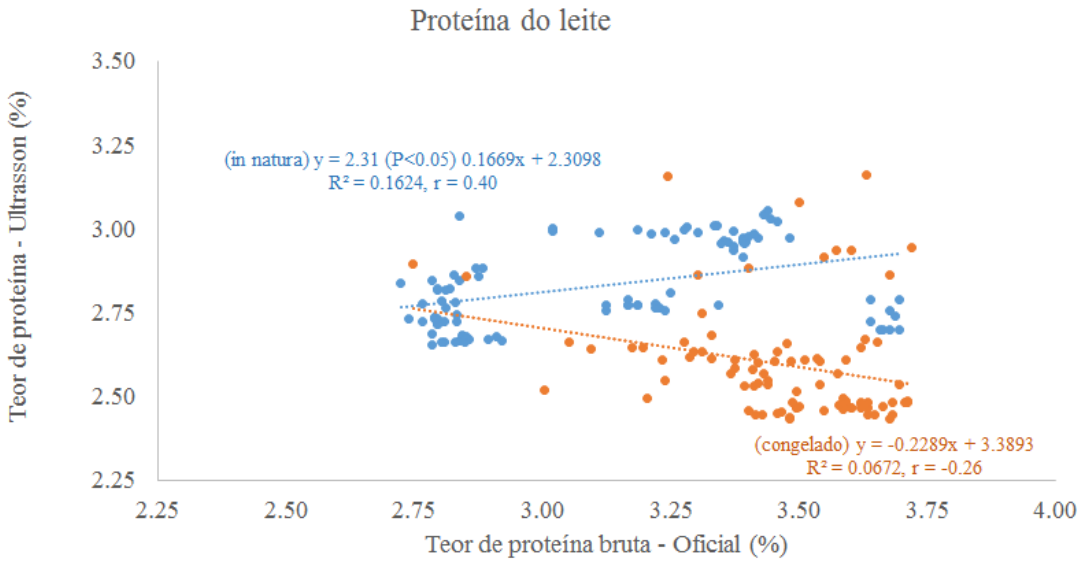


Figura 4 – Relação entre o teor de proteína bruta do leite obtido por espectroscopia de ultrassom e por método oficial (Kjeldahl) em amostras de leite *in natura* ou submetidas ao congelamento.