



Comparação de metodologias para a determinação do pH e do ponto de congelamento do leite bovino cru sob diferentes características de conservação¹

Viviane Maia de Araújo², Laerte Dagher Cassoli², Aline Zampar², Augusto Cesar Lima da Silva², Carlos Tadeu dos Santos Dias³, Paulo Fernando Machado⁴

¹ Projeto financiado pelo CNPq.

² Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagem – ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil.

³ Departamento de Ciências Exatas – ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil.

⁴ Departamento de Zootecnia – ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil.

RESUMO - Objetivou-se comparar metodologias de referência com a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para análises do pH e do ponto de congelamento sob diferentes condições de conservação em amostras de leite bovino cru. Foram coletadas amostras de leite de tanques de expansão em 57 propriedades. Cada amostra foi subdividida em 45 frascos (40 mL), que foram distribuídos de acordo com a temperatura de armazenamento (-20; 7 e 25°C), a idade da amostra (0, 3, 6 e 9 dias) e os níveis de adição de água (0, 2, 4 e 6%). Foi adicionado bronopol a 44 frascos e um foi mantido sem adição do conservante para controle. O pH e o ponto de congelamento foram determinados pela metodologia de referência (potenciômetro e crioscópio eletrônico, respectivamente) e pela metodologia alternativa por meio do equipamento MilkoScan™ FT+. Os resultados obtidos em cada metodologia nas diferentes condições de conservação das amostras foram avaliados por análise de variância e comparação de médias. A análise de regressão linear foi realizada para avaliar as metodologias (referência e alternativa) quanto aos resultados do ponto de congelamento em função da idade da amostra. O bronopol não alterou as médias de pH, porém reduziu o ponto de congelamento. Foram calculados fatores de correção para eliminar esse efeito nos resultados do ponto de congelamento. As médias de pH em amostras com três dias, mantidas a -20 e 25°C foram mais baixas que as amostras a 7°C. A idade da amostra influenciou os resultados de pH quando as amostras foram submetidas a 25°C. O aumento da temperatura de armazenamento para 25°C reduziu as médias do ponto de congelamento em amostras sem adição de água e com nove dias de armazenagem. O aumento na idade da amostra a -20 e 7°C não tem efeito sobre médias do ponto de congelamento. Há forte correlação entre as metodologias em função da idade da amostra para o ponto de congelamento.

Palavras-chave: acidez no leite, crioscopia, leite de tanques

Comparison of methodologies for the determination of pH and freezing point in raw bovine milk under different conservation characteristics

ABSTRACT - The objective of this work was to compare reference methodologies to Fourier transform infrared spectroscopy for analysis of pH and freezing point (FP) under different storage conditions on samples of raw bovine milk. Milk samples were collected from bulk tank milk on 57 farms. Each sample was subdivided into 45 vials (40 mL) which were distributed according to storage temperature (-20°C, 7°C and 25°C), age of the sample (0, 3, 6 and 9 days) and levels of water addition (0, 2, 4 and 6%). Bronopol was added into 44 flasks and one was maintained without addition of preservative for control. Frozen point and pH were determined by the standard methods (thermistor cryoscope and potentiometer, respectively) and by the alternative methodology by using MilkoScan™ FT+. The results from each method, at different conditions of conservation of the samples, were evaluated by analysis of variance and comparison of means. The linear regression analysis was performed to evaluate the methodologies (reference and alternative) for results of the frozen point in function of the age of the sample. Bronopol did not alter pH means, but it reduced frozen point. Correction factors were calculated to eliminate this effect on the results of the frozen point. Means of pH in three-day samples, kept at -20°C and 25°C were lower than the samples at 7°C. The age of the samples affected the results of pH when they were submitted to 25°C. The increase of storage temperature to 25°C reduced means of frozen point in samples without addition of water and at nine days of storage. The increase in age of sample at -20°C and 7°C does not affect means of frozen point. There is a strong correlation among methodologies in function of age of the sample for frozen point.

Key Words: bulk tank milk, freezing point, milk acidity

Introdução

O pH e o ponto de congelamento do leite cru são dois critérios utilizados no controle de qualidade das indústrias (Glaeser, 2003). O primeiro verifica a acidez no leite, e, ainda, pode ser um importante indicador de amostras mal conservadas (FOSS, 2000). O segundo é usado para detectar a adição fraudulenta de água ao leite (Henno et al., 2008) ou por ineficiência na operação dos sistemas de ordenha (Rasmussen et al., 2002).

A metodologia de referência para determinação do pH envolve o uso de aparelhos potenciométricos (Instituto Adolfo Lutz, 2008), enquanto que a metodologia de avaliação do ponto de congelamento envolve crioscópios eletrônicos (IDF, 2002). Estas metodologias limitam o atendimento da demanda por elevado número de análises, uma vez que os aparelhos possuem reduzida capacidade analítica (Oliveira et al., 2006). Por isso, os laboratórios têm buscado novas metodologias por meio de equipamentos mais rápidos e precisos. Uma delas é a espectroscopia de infravermelho (Bertrand, 1996; Gonzalo et al., 2004; Sánchez et al., 2005). Esta metodologia ganhou novo impulso, com o surgimento dos equipamentos interferométricos e a utilização da operação matemática conhecida como Transformada de Fourier (Araújo, 2007). O equipamento MilkoScanTM FT+ baseia-se na espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF), no entanto, para que possa ser utilizada com confiabilidade, precisa ser validada nas condições locais (Barbano & Clark, 1989).

Parte desta validação envolve estudos do impacto do uso de conservantes das amostras. Como estratégias de conservação tem-se utilizado, principalmente, a adição de conservantes químicos associados ao resfriamento da amostra. Estudos têm sido conduzidos para análise desses efeitos, porém a maioria contempla somente os parâmetros de composição e de CCS (Bertrand, 1996; Sánchez et al., 2005). Existem poucos trabalhos na literatura que investigam os efeitos da conservação das amostras sobre os resultados de pH e ponto de congelamento (Oliveira et al., 2006; Sánchez et al., 2007).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar os efeitos de adição do bronopol, da temperatura de armazenamento e da idade da amostra sobre o pH e o ponto de congelamento analisados pelas metodologias de referência e alternativa (IVTF) em amostras de leite bovino cru.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de leite cru de tanques de resfriamento de 57 propriedades localizadas na região sudeste. O leite de cada propriedade foi agitado e em

seguida transferido para um galão limpo e seco com 3.000 mL de capacidade. Todas as amostras foram encaminhadas para o laboratório da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

A amostra de leite de cada propriedade foi subdividida e transferida para 45 frascos, com 40 mL de capacidade, e distribuídas num arranjo fatorial ($3 \times 4 \times 4$) com três temperaturas de armazenamento, em quatro períodos de análise e quatro níveis de adição de água. Em todos os frascos foi adicionado o conservante químico bronopol (Microtabs[®]) na concentração de 0,02 mg por cada mL de leite, com exceção de um frasco, que foi mantido sem o conservante para controle.

As temperaturas de armazenamento testadas foram: congelamento a -20°C (C), resfriamento a 7°C (R) e temperatura ambiente a 25°C (A). Para o tempo decorrido entre a coleta e a análise (idade da amostra) foram testadas quatro situações: zero (D0), três (D3), seis (D6) e nove (D9) dias. E ainda, foram avaliados quatro níveis de adição de água: zero (0%), dois (2%), quatro (4%) e seis (6%). As amostras consideradas como controle foram mantidas a temperatura de 7°C , com idade da amostra igual a três dias e sem adição de água.

Cada amostra foi analisada quanto ao pH e ponto de congelamento, primeiramente pela metodologia de referência e em seguida pela metodologia alternativa (IVTF). As análises foram realizadas em réplicas. O ponto de congelamento pela metodologia de referência foi determinado utilizando-se o crioscópio eletrônico MK 540 FLEX (ITR[®], Brasil). Este equipamento possui um sistema de resfriamento através do transdutor elétrico que determina o ponto de congelamento do leite com leitura direta no painel. As análises de pH pela metodologia de referência foram realizadas por meio do titulador potenciométrico automático digital Q-799 (QUIMIS[®], Brasil) especialmente adaptado ao eletrodo de vidro, que permitiu a leitura direta no dispositivo digital. Pela metodologia alternativa, ambos os parâmetros foram determinados por espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF), utilizando-se o equipamento MilkoScanTM FT+ (FOSS, Denmark). Durante o experimento, os equipamentos foram calibrados de acordo com especificações internacionais (IDF, 2002). Os resultados do ponto de congelamento fornecidos pela metodologia de referência foram convertidos para escala Celsius ($^{\circ}\text{C}$), por meio da equação: $C^{\circ} = 0,96418^{\circ}\text{H} - 0,00085$.

Para análise dos efeitos da adição do bronopol, os dados de pH e do ponto de congelamento foram analisados por comparação de médias usando o PROC GLM (SAS, 1999). Para os resultados do ponto de congelamento foram

calculados fatores de correção para eliminação do efeito da adição do bronopol, e, para verificar a confiabilidade dessas estimativas, foram calculados os intervalos de confiança com probabilidade de 0,95. A análise da variância foi realizada considerando-se os efeitos de temperatura, idade da amostra, adição de água e suas interações. No desdobramento da análise estatística foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade nas interações (temperatura × idade da amostra) para o pH e nas interações (adição de água × temperatura × idade da amostra) para o ponto de congelamento. Foi realizada a análise de regressão linear para os resultados do ponto de congelamento, obtidos pelas duas metodologias, considerando o efeito idade da amostra, utilizando o PROC REG (SAS, 1999).

Resultados e Discussão

Independentemente da metodologia analítica utilizada, não houve efeito significativo da adição de bronopol sobre os resultados de pH. No entanto, o bronopol reduziu os valores do ponto de congelamento, tanto quando avaliado pela metodologia convencional como pela alternativa (Tabela 1). Resultados semelhantes foram constatados por Oliveira et al. (2006) quando avaliaram o efeito da adição desse conservante sobre o ponto de congelamento em leite bovino. Segundo Shipe (1959), essa redução pode ser explicada por alterações na osmolaridade do leite atribuídas ao aumento dos constituintes hidrossolúveis das amostras. Essa mesma justificativa foi utilizada por Sánchez et al. (2007). Segundo esses autores, cada pastilha de bronopol comercial contém 0,30 mg de natamicina, que possui atividade *in vitro* contra leveduras e fungos filamentosos,

e isso pode contribuir para o aumento dos constituintes hidrossolúveis, com a redução dos valores de ponto de congelamento.

Foram calculados fatores de correção para corrigir os efeitos da adição do conservante sobre o ponto de congelamento (Tabela 2). O fator de correção para o método de referência (FCR) foi de 0,013°C e para o método alternativo (FCA), de 0,011°C. Para avaliação da confiabilidade dos fatores de correção, foram calculados os intervalos de confiança com probabilidade de 95%. Considerando a confiabilidade estimada, ambos os fatores podem ser utilizados para correção dos resultados do ponto de congelamento em amostras conservadas com bronopol (Microtabs®).

Os efeitos da temperatura de armazenamento, idade da amostra e suas interações foram significativos sobre os resultados do pH e do ponto de congelamento (Tabela 3).

A partir do efeito significativo das interações, observadas na análise da variância, realizou-se o desdobramento da interação dupla (temperatura × idade da amostra) para variável pH (Tabela 4) e, posteriormente, realizou-se o desdobramento da interação tripla (adição de água × temperatura de armazenamento × idade da amostra) para o ponto de congelamento (Tabela 5).

As médias de pH em amostras com três dias, mantidas congeladas e em temperatura ambiente foram mais baixas que as médias das amostras controle mantidas resfriadas (Tabela 4). Com seis e nove dias, houve diferenças entre as três temperaturas estudadas (Tabela 4). A idade da amostra influenciou os resultados de pH apenas quando as amostras foram submetidas à temperatura ambiente (Tabela 4). Isso sugere que amostras de leite para análises do pH necessitam

Tabela 1 - Valores médios para o pH e ponto de congelamento do leite com e sem a adição do bronopol e segundo a metodologia analítica

Metodologia analítica	Adição do bronopol	pH	Ponto de congelamento (°C)
Referência ^{1, 2}	Não	6,70 ± 0,041A	-0,519 ± 0,009A
	Sim	6,70 ± 0,050A	-0,532 ± 0,011B
Alternativa ³	Não	6,66 ± 0,058a	-0,521 ± 0,009a
	Sim	6,67 ± 0,034a	-0,532 ± 0,009b

Médias seguidas por letras maiúsculas/minúsculas e iguais na mesma coluna não diferem (P>0,05) entre si pelo teste Tukey, dentro da metodologia de referência e alternativa, respectivamente.

¹ Titulador potenciométrico Q-799(QUIMIS®) (pH).

² Crioscópio eletrônico MK540(ITR®) (ponto de congelamento).

³ MilkoScanTMFT+ (FOSS®).

Tabela 2 - Fatores de correção e intervalos de confiança para diferentes metodologias na determinação do ponto de congelamento do leite

Metodologia analítica	Número	Ponto de congelamento (°C) ¹	IC95% ⁴
Referência ²	56	0,013 ± 0,003	0,012 − 0,014
Alternativa ³	56	0,011 ± 0,003	0,010 − 0,011

¹ Média e desvio-padrão da diferença calculada a partir dos valores de ponto de congelamento com e sem adição do conservante bronopol (Microtabs®).

² Crioscópio eletrônico (MK540 – ITR®).

³ MilkoScanTMFT+ (FOSS).

⁴ Intervalo de confiança em nível de 95%.

Tabela 3 - Análise da variância para o pH e ponto de congelamento (°C), de acordo com os efeitos temperatura de armazenamento, idade da amostra, adição de água e suas interações

Causa da variação	GL	pH	Ponto de congelamento
Fazenda	56	<0,0001***	<0,0001***
Método (M)	1	<0,0001***	NS
Adição de água (A)	3	0,0005*	<0,0001***
Temperatura de armazenamento (T)	2	<0,0001***	<0,0001***
Idade da amostra (IDA)	3	<0,0001***	<0,0001***
A × T	6	NS	NS
A × IDA	9	NS	NS
T × IDA	5	<0,0001***	NS
A × T × IDA	15	NS	0,0046*
A × T × IDA × M	15	NS	NS

NSP>0,05; *P≤0,05; ***P≤0,001.

Tabela 4 - Comparação de médias do pH do leite sob diferentes temperaturas e períodos de análise das amostras

Temperatura ¹	Idade da amostra ²			
	0	3	6	9
-20°C		6,637aB	6,631aB	6,647aB
7°C	6,687aA	6,664aA	6,657aA	6,666aA
25°C	6,693aA	6,626bB	6,570cC	6,541dC

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05) se considerada a idade da amostra.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05) se considerada a temperatura de conservação da amostra.

¹ (-20°C), (7°C), (25°C) e o período de análise.

² (0, 3, 6 e 9 dias).

de resfriamento, mesmo que estejam conservadas com o bronopol, pois as médias com três, seis e nove dias apresentaram-se mais baixas que as observadas em amostras consideradas como controle. Possivelmente, com o aumento na idade da amostra, houve crescimento microbiano que ocasionou a fermentação da lactose, com produção de ácido láctico, o que resultou em abaixamento do pH

(Santos & Fonseca, 2007). Segundo Cassoli et al. (2010), a refrigeração constante no processo de transporte e conservação das amostras se faz necessária, pois somente o conservante químico não é suficiente para cessar o crescimento bacteriano.

Quando comparadas as médias do ponto de congelamento considerando o efeito da temperatura de armazenamento, observou-se que amostras mantidas congeladas e em temperatura ambiente não diferiram das amostras resfriadas (controle), com exceção daquelas sem adição de água e com idade da amostra de nove dias, quando houve efeito de redução na média do ponto de congelamento com o aumento da temperatura para 25 °C (Tabela 5). No entanto, as médias do ponto de congelamento diferiram entre amostras congeladas e em temperatura ambiente, quando apresentaram 0 e 6% de adição de água, no período de análise de seis dias; 2 e 4% de adição de água, no período de análise de nove dias.

Tabela 5 - Comparação de médias do ponto de congelamento (°C) do leite sob diferentes condições de conservação das amostras

Adição de água (%)	Idade da amostra (dias)	-20 °C ¹	7 °C ¹	25 °C ¹
0	0		-0,532aA	-0,533aA
	3	-0,535aA	-0,535aA	-0,537abA
	6	-0,530aA	-0,533aAB	-0,536abB
	9	-0,533aA	-0,536aA	-0,542bB
2	0		-0,518aA	-0,519aA
	3	-0,521aA	-0,521aA	-0,523abA
	6	-0,517aA	-0,518aA	-0,523abA
	9	-0,519aA	-0,522aAB	-0,527bB
4	0		-0,506aA	-0,508aA
	3	-0,509aA	-0,511aA	-0,510aA
	6	-0,505aA	-0,506aA	-0,509aA
	9	-0,508aA	-0,511aAB	-0,516bB
6	0		-0,490aA	-0,492aA
	3	-0,489aA	-0,495aA	-0,493aA
	6	-0,485aA	-0,490aAB	-0,495aB
	9	-0,491aA	-0,491aA	-0,494aA

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) ao ser considerada a idade da amostra.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05) ao ser considerada a temperatura de conservação da amostra.

¹ Congelado (-20 °C); Resfriado (7 °C); Ambiente (25 °C).

Isso mostra que devem ser evitadas condições extremas para temperatura de armazenamento, pois podem comprometer a integridade das amostras e consequentemente os resultados para o ponto de congelamento; o mesmo foi constatado por Demott & Burch (1966).

Quando se compararam as médias do ponto de congelamento considerando o efeito do período de análise, amostras com 25°C e 4% de adição de água apresentaram médias semelhantes nos períodos de zero, três e seis dias, que por sua vez diferiram da média no período de nove dias (Tabela 5). Entretanto, para 0 e 2% de adição de água, as médias foram semelhantes para os períodos de três e seis dias, e diferiram para zero e nove dias. Esses resultados

comprovam que amostras não devem ser conservadas à temperatura ambiente, mesmo que adicionadas de bronopol, para análises a partir de nove dias de armazenamento.

Para todas as idades estudadas, os coeficientes de determinação obtidos foram elevados, indicando forte correlação entre os resultados do ponto de congelamento para as duas metodologias. Os coeficientes de regressão foram significativos ($P < 0,001$) e a acurácia do equipamento MilkoScan™ FT+, expressa pelo desvio-padrão residual ($S(y,x)$), apresentou valores dentro das especificações técnicas fornecidas pelo fabricante, que sugere um limite máximo de 0,004°C (Figura 1).

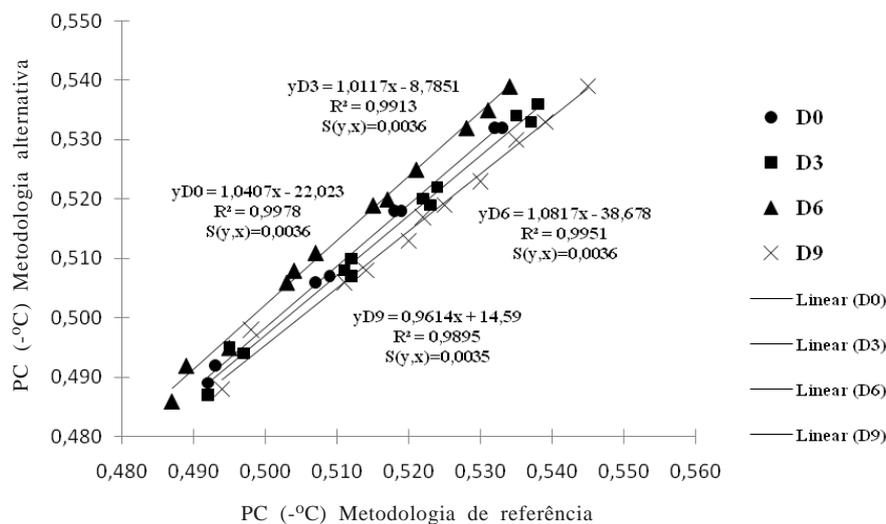


Figura 1 - Coeficientes de regressão, intercepto e coeficientes de determinação para as análises de regressão do ponto de congelamento em função da idade de amostra.

Conclusões

A adição do conservante químico bronopol em amostras de leite cru não altera os valores de pH, e reduz o ponto de congelamento, no entanto, fatores de correção permitem seu uso para conservação. Portanto, amostras de leite para análises do ponto de congelamento e pH podem ser conservadas com bronopol, a 7°C, e analisadas até nove dias após sua coleta.

Referências

ARAÚJO, T.P. **Emprego de espectroscopia no infravermelho e métodos quimiométricos para a análise de tetraciclina em leite bovino.** 2007. 96f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BARBANO, D.M.; CLARK, J.L. Instrumental methods for measuring components of Milk. **Journal Dairy Science**, v.72, n.6, p.1627-1636, 1989.

BERTRAND, J.A. Influence of shipping container, preservative and breed on analysis of milk components of shipped samples. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.1, p.145-148, 1996.

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

DEMOTT, B.J.; BURCH, T.A. Influence of storage upon the freezing point of milk. **Journal of Dairy Science**, v.49, n.3, p.317-318, 1966.

FOSS [2000]. **pH measurement.** Disponível em: <<http://www.foss.dk/extras/searchresults.aspx?search=ph%20measurement>> Acesso em: 10 nov. 2008.

GONZALO, C.; BOIXO, J.C.; CARRIEDO, J.A. et al. Evaluation of rapid somatic cell counters under different analytical conditions in ovine milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.11, p.3623-3628, 2004.

GLAESER, H. Control of the water content of dairy products – definition of limits, consideration of process variation, official

- use autocontrol data. **Food Chemistry**, v.82, p.121-124, 2003.
- HENNO, M.; OTS, M.; JÓUDU, I. et al. Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. **International Dairy Journal**, v.18, p.210-215, 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ [2008]. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Intituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br/index.html>> Acesso em: 15 dez. 2008.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. **Milk. Determination of freezing point**. Thermistor cryoscope method (reference method). 108:2002/ISO 5764. Brussels: IDF International, 2002. 12p.
- OLIVEIRA, W.P.S.; OLIVEIRA, A.N.; MESQUITA, A.J. et al. Avaliação da metodologia de infravermelho para determinação índice crioscópico do leite cru. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, [2006]. (CD-ROM).
- RASMUSSEN, M.D.; BJERRINNG, M.; JUSTESEN, P. et al. Milk quality on Danish farms with automatic milking systems. **Journal Dairy Science**, v.85, n.11, p.2869-2878, 2002.
- SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C. et al. Influence of storage and preservation on Fossomatic cell count and composition of goat milk. **Journal Dairy Science**, v.88, n.9, p.3095-3100, 2005.
- SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C. et al. Evaluation of the Milkoscan FT 6000 milk analyzer for determining the freezing point of goat's milk under different analytical conditions. **Journal Dairy Science**, v.90, n.7, p.3153-3161, 2007.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1.ed. Barueri: MANOLE, 2007. 314p.
- SHIPE, W.F. The freezing point of milk. A review. **Jornal Dairy Science**, v. 42, n.11, p.1745-1761, 1959.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **SAS/STAT: user's guide**, version 9.1. Cary: 1999. 448p.