

Avaliação do efeito do congelamento de amostras de leite na determinação do índice de refração do soro cúprico

Patrícia Sueli Rezende*, Geraldo Paulo Carmo, Eduardo Gonçalves Esteves

Laboratório Nacional Agropecuário do Estado de Minas Gerais – LANAGRO/MG

* clicpatricia@yahoo.com.br

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do congelamento de amostras de leite cru e de leite UHT integral na determinação do parâmetro de qualidade índice de refração do soro cúprico (IRSC). Foram empregadas 18 amostras de leite neste estudo (09 amostras de leite cru e 09 amostras de leite UHT integral). Foi determinado o valor do IRSC de todas as amostras antes do congelamento e após congelamento em diferentes tempos de congelamento (1, 5, 8, 15, 22, 29 e 57 dias). Observou-se redução do IRSC das amostras congeladas comparadas às determinações realizadas empregando-se as mesmas amostras frescas. Porém, a queda do valor de IRSC foi considerada aceitável, uma vez que, seu valor é menor que a incerteza expandida calculada para o método. Desta forma, o congelamento das amostras mostra-se uma alternativa adequada na preservação de amostras de leite quanto à determinação deste parâmetro.

Palavras-chave: leite, congelamento, índice de refração, soro cúprico

Evaluation of the effect of freezing milk samples on the refractive index for copper(II) serum determination: This work aimed to evaluate the effect of freezing of raw and whole UHT milk samples on the refractive index for copper(II) serum (RICS) determination. Eighteen samples were used in this study (9 raw and 9 whole UHT milk samples). RICS values were determined before and after freezing on different days (1, 5, 8, 15, 22, 29 and 57 days). The RICS values from frozen samples were lower than from fresh samples. However, the reduction in RICS was considered acceptable because this value was below to the expanded uncertainty of the method. Freezing milk is adequate to preserve samples for RICS determination.

Keywords: milk, freezing, refractive index, copper(II) serum

Recebido: 04 de Abril de 2014; aceito: 09 de Fevereiro de 2015; publicado: 24 de Março de 2015.

DOI: 10.14685/rebrapa.v6i1.142

INTRODUÇÃO

De acordo com dados da FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations) (FAO, 2014), o Brasil ocupou a quarta colocação como produtor mundial de leite bovino em 2012. Sendo o leite bovino um produto importante no mercado nacional, além de apresentar baixa durabilidade, o acréscimo de substâncias estranhas a ele é algumas vezes reportado por órgãos de fiscalização sanitária. Há relatos de adição de compostos com características conservantes para dissimular

problemas de qualidade microbiológica, inibidores de decomposição e, ainda, adição de água e solutos reconstituíntes de parâmetros de qualidade avaliados em análises periciais com o objetivo de obtenção de vantagem financeira. (VELOSO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2013; MOTTA *et al.*, 2014)

O Decreto Brasileiro nº 30.691 de 29 de março de 1952 (RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal) faz referência ao parâmetro índice de refração do soro cúprico (IRSC) como método

de precisão para identificação de leite fraudado. O método de ensaio 424/IV Leites – Determinação do grau refratométrico do soro cúprico a 20°C, descrito em Métodos físico-químicos para análise de alimentos, edição IV, Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005); baseia-se no princípio de que a adição de água ao leite dilui as substâncias dissolvidas em seu soro, reduzindo o índice de refração do mesmo. Conforme esse método, um valor de índice de refração (IR) abaixo de 37 °Zeiss do soro cúprico a 20 °C sugere adição de água ao leite.

Para identificação de adição de água ao leite são determinados os parâmetros densidade e ponto de congelamento do leite (BRASIL, 2006). Porém, o acréscimo de alguns solutos, tais como cloreto de sódio, ureia, maltodextrina e citrato de sódio, dentre outros, são capazes de corrigir os valores de densidade e índice crioscópico, impedindo a identificação da fraude. O acréscimo da determinação do IRSC aos parâmetros já executados nas ações periciais no âmbito fiscalizatório consiste de uma ferramenta eficiente na inibição das práticas de fraude, pois se mostra mais sensível à percepção da adição de água que os usualmente em vigência (densidade e índice crioscópico), visto que a adição de substâncias reconstituintes não conseguem recompor os três parâmetros ao mesmo tempo. Trata-se, portanto, de uma importante contribuição no combate deste tipo de fraude, que leva à redução do valor nutricional do leite, à inserção de substâncias potencialmente perigosas para a saúde (por exemplo, formaldeído, peróxido de hidrogênio) e prejuízo financeiro ao consumidor.

Uma vez que amostras de leite são perecíveis e nem sempre é possível analisar todos os parâmetros de qualidade necessários em um mesmo dia, e, no caso do leite cru, no mesmo dia da ordenha, buscar uma forma de conservá-las adequadamente se torna mandatório. Segundo Muir (1984), os efeitos do congelamento do leite têm sido estudados desde 1930, com o objetivo de alcançar um longo período de estocagem deste material assegurando que suas características sejam preservadas. O congelamento das amostras de leite é empregado eficazmente como forma de

conservação em muitos casos, por exemplo, para análise de formol e de CMP (caseínomacropéptido) (MAPA, 2006; MOTTA *et al.*, 2014) sem que haja alteração do resultado. Porém, é indispensável verificar previamente se a medida do parâmetro em avaliação pode ser afetada pelo congelamento da amostra.

Weese, Thayne e Butcher (1972) avaliaram a influência do congelamento de amostras de leite cru na determinação dos teores de gordura pelos métodos de Babcock e de Mojonnier, o teor de proteínas e de sólidos totais. Os autores também verificaram uma leve redução nos teores de gordura pelos métodos de Babcock e de Mojonnier e de sólidos totais obtidos a partir de amostras que sofreram congelamento comparando os resultados obtidos a partir das mesmas amostras frescas. A queda observada variou entre 0,5 e 1,0 % do valor medido, o que não foi considerado significativo, sendo, portanto, o congelamento das amostras de leite considerado adequado como forma de preservação dessas amostras por um tempo maior. Praticamente não houve alteração nos valores do teor de proteínas entre amostras frescas e congeladas.

Fransson e Lönnerdal (1983) estudaram o efeito do congelamento na distribuição mineral de leite humano e bovino. Os autores observaram que, em geral, o congelamento afetou muito pouco a distribuição de minerais em ambos os tipos de leite, não tendo sido observadas variações significativas nas concentrações totais dos elementos analisados (Ca, Cu, Fe, Mg e Zn), sendo, porém, observadas pequenas alterações para ferro, cobre, zinco e cálcio nas diferentes frações de ambos os leites.

Zhang *et al.* (2006) avaliaram o efeito da temperatura e do tempo de congelamento na composição do leite e do queijo de ovelha. As amostras de leite foram coletadas por 4 semanas consecutivas e descongeladas mensalmente a 22 °C, sendo este leite usado para fabricação de queijos. Os resultados obtidos por eles mostraram que o congelamento do leite de ovelha entre -15 °C a -25 °C por até 6 meses teve efeitos mínimos sobre a composição do leite e do queijo, em

relação aos seguintes parâmetros: concentração de sólidos totais do leite, ácidos graxos, proteína, caseína, nitrogênio não-proteico, proteína verdadeira e lactose.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do congelamento de amostras de leite cru e de leite UHT integral na determinação do parâmetro de qualidade índice de refração do soro cúprico (IRSC).

MATERIAIS E MÉTODOS

Soluções padrão e reagentes

Os reagentes químicos empregados neste trabalho foram de grau analítico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Sigma Aldrich, Alemanha). Todas as soluções foram preparadas usando água deionizada a partir de um sistema de purificação Milli-Q ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, Millipore Direct-Q 3, França).

Para preparar a solução de sulfato cúprico, 72,5000 g do reagente pentahidratado foram cuidadosamente pesados em balança analítica e dissolvidos em água Milli-Q até volume final de 1000,00 mL. Então, o índice de refração desta solução foi ajustado para $(36,00 \pm 0,04)^\circ\text{Zeiss}$ por adição de água ultrapura ou do reagente.

Instrumentação

As determinações de IRSC foram realizadas por meio de um refratômetro digital Anton Paar Abbemat-WR (Seelze, Alemanha) operando com uma lâmpada de sódio a 589,3 nm. A calibração de refratômetros do tipo Abbé, como este, é feita empregando-se água a 20 °C como solução de referência.

Foram utilizados também: centrífuga de alta velocidade e refrigerada Thermo Fisher Scientific Modelo Sorvall Evolution RC (Asheville, EUA), centrífuga Gerber Instruments (Illnau-Effretikon, Suíça), homogeneizador portátil de alto desempenho Polytron, Modelo PT 1200E (Lucerne, Suíça), titulador automático Metrohm (Herisau, Suíça), agitador magnético Nova Ética Modelo 119 (São Paulo, Brasil), banho de água com

circulação Marconi MA 470 (Piracicaba, Brasil).

Procedimentos Analíticos

Foram empregadas 09 (nove) amostras de leite cru e 09 (nove) amostras de leite UHT integral para avaliação do efeito do congelamento na medida do IRSC. Primeiramente, essas amostras foram homogeneizadas entre 5 e 10 minutos em agitador magnético.

As amostras de leite cru e de leite UHT foram analisadas respectivamente no mesmo dia da coleta e de abertura das embalagens. Em seguida, o conteúdo restante das amostras foi dividido em porções que foram congeladas em frascos plásticos estéreis com capacidade de 40 mL por 1, 5, 8, 15, 22, 29 e 57 dias. Todo o procedimento foi realizado em duplicata. No dia correspondente, cada par de frascos de cada uma das amostras foi descongelado em banho a 25 °C, homogeneizado cuidadosamente com mixer manual portátil de alta performance.

As amostras foram preparadas segundo o método otimizado de determinação do IRSC em relação ao método original proposto por IAL (2005). Foram pipetados 20,00 mL ($\pm 0,03$ mL) da amostra de leite e transferidos para um béquer de 100 mL. Em seguida, foram dispensados 5,000 mL da solução cúprica com auxílio de uma bureta automática sobre a amostra de leite sob agitação. A mistura foi transferida para um frasco de centrífuga e centrifugada a 4575 RCF por 10 minutos. A camada de gordura superficial foi removida com sucção por vácuo para liberar a fase aquosa, tomando cuidado para não misturar a gordura com a fase aquosa. Por fim, retirou-se uma alíquota do sobrenadante de cada frasco e levou-a ao refratômetro para determinação do IRSC.

Adicionalmente foi avaliada a eficiência de diferentes formas de homogeneização das amostras após descongelamento. Para a execução desses testes, foram empregadas 06 amostras de leite cru, tendo sido determinados os valores de IRSC das amostras frescas e após 01 dia de congelamento. Na homogeneização

das amostras descongeladas, foram empregados agitador magnético, agitador vórtex e homogeneizador portátil.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Avaliação do efeito do congelamento das amostras de leite na determinação de IRSC

A Tabela 1 apresenta a estatística descritiva dos valores de IRSC de todas as amostras de leite analisadas em função do tempo de congelamento, assim como a comparação de médias.

As Figuras 1 e 2 mostram graficamente as variações das medidas nas amostras de leite cru e leite UHT integral, respectivamente. Observou-se que o congelamento foi capaz de provocar uma queda de $\sim 0,20$ °Zeiss do dia 0 (amostra fresca) para o dia 1, diferença que torna o IRSC da amostra fresca estatisticamente diferente ($P < 0,05$) do IRSC das amostras congeladas.

Os valores de IRSC destas últimas, por sua vez, mostraram-se estatisticamente equivalentes ($P > 0,05$) para todos os tempos de congelamento testados, cuja variação máxima, neste grupo, não excedeu $0,11$ °Zeiss. Considerando todos os tratamentos, a diferença máxima foi de $0,30$ °Zeiss.

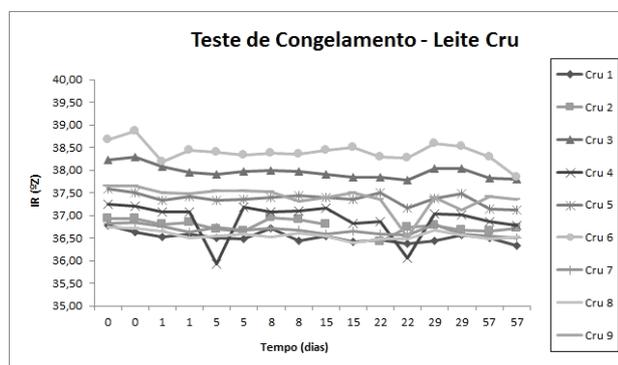


Figura 1- Variação dos valores de IRSC obtidos para amostras de leite cru congeladas.

Por meio da análise de variância demonstrou-se haver diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$) e procedendo-se a uma análise mais criteriosa por meio do teste de Tukey, identificou-se que a diferença existente era entre o tempo de congelamento de 0 dias e os demais tempos, estes últimos todos estatisticamente equivalentes ($P > 0,05$) (Figura 4). Considerando que o leite cru é perecível e que em procedimentos de inspeção, as amostras usualmente são coletadas a uma distância considerável dos laboratórios, o congelamento se mostra necessário.

Para se proceder à análise de variância (Tabela 2) e à comparação de médias os dados foram retornados à distribuição normal por meio da Transformação de Johnson, avaliando-se também a sua homocedasticidade pelo Teste de Bonferroni (Figura 3).

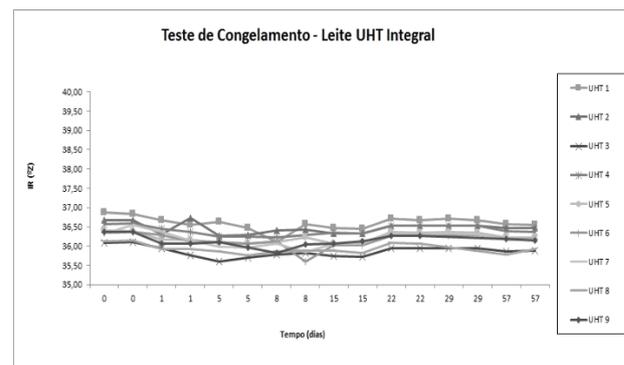


Figura 2- Variação dos valores de IRSC obtidos para amostras de leite UHT integral congeladas.

Neste caso, deve-se, na avaliação da conformidade do leite amostrado e estando a amostra congelada, levar em consideração a Tendência (*bias*, T_d) proporcionada pelo congelamento, cujo valor em uma abordagem conservadora, é de $-0,32$ °Zeiss (menos que 1 % do valor do IRSC mínimo esperado).

O valor final obtido (V_f) é o resultado da equação $V_f = V_o + C$, sendo $C = -T_d$, onde V_o é o valor obtido na amostra congelada, T_d é a tendência e C é a Correção. Um primeiro procedimento alternativo é estabelecer o valor limite de violação do índice de refração do leite

cru brasileiro empregando-se somente amostras congeladas.

Tabela 1 – Análise descritiva do efeito do congelamento na determinação do IRSC de amostras de leite fluido (cru e UHT integral).

Tempo de congelamento (dias)	IR Médio*	DP	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
0	36,918 ^a	0,725	36,10	36,38	36,71	37,30	38,78
1	36,716 ^b	0,693	35,85	36,20	36,57	37,15	38,32
5	36,603 ^b	0,742	35,66	36,06	36,52	36,86	38,37
8	36,646 ^b	0,752	35,80	35,95	36,49	37,16	38,37
15	36,635 ^b	0,736	35,74	36,07	36,46	37,08	38,47
22	36,658 ^b	0,595	35,95	36,30	36,51	36,75	38,28
29	36,655 ^b	0,657	35,98	36,32	36,61	36,69	38,11
57	36,622 ^b	0,614	35,86	36,18	36,49	36,90	38,06

* Letras iguais na mesma coluna indicam médias estatisticamente equivalentes ($P > 0,05$). Legenda: IR – índice de refração; DP = desvio padrão; Q1 = 1º quartil; Q3 = 3º quartil.

Tabela 2 – Tabela ANOVA para comparação de médias dos valores de IRSC em função do tempo de congelamento (dias) das amostras de leite fluido.

Fonte	Graus de liberdade	SQ	SM	F	P
Amostra	17	129,7403	7,6318	128,14	0,000
Tempo de Congelamento (dias)	6	4,6793	0,7799	13,09	0,000
Erro	102	6,0750	0,0596		
Total	125	140,4947			
S = 0,244047		R-Sq = 95,68 %		R-Sq(adj) = 94,70 %	

* SQ – Soma dos Quadrados; SM = Soma das Médias; F = F calculado; P = coeficiente de correlação de Pearson.

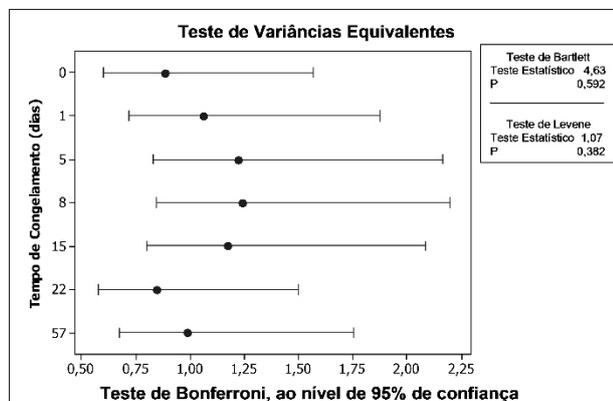


Figura 3- Teste de Bonferroni para comparação das variâncias das medidas de

IRSC das amostras de leite cru e leite UHT integral avaliadas no teste de influência do congelamento.

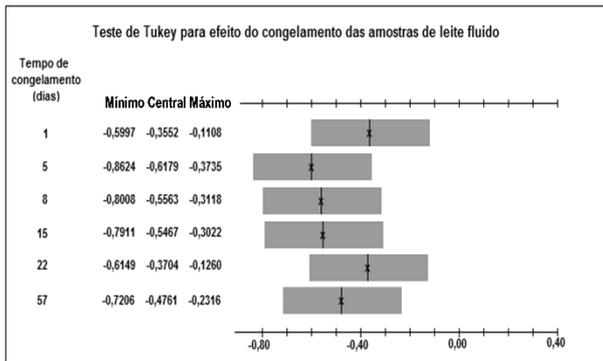


Figura 4- Teste de Tukey aplicado aos Tempos de Congelamento de 1 a 57 dias evidenciando equivalência estatística entre eles.

Este valor limite deve ser estabelecido de forma que o valor da Tendência seja absorvido automaticamente na definição do mesmo.

Um segundo procedimento é considerar o valor limite de violação do leite sem congelamento, mas incorporar a Correção no cálculo da incerteza expandida do método quando se tratar de amostra congelada, onde o valor de U, sem incorporação, é de 0,38 °Zeiss ($k = 3,30$).

Os dados obtidos neste estudo são, portanto, coerentes com dados obtidos por outros trabalhos (WEESE, THAYNE e BUTCHER,

1972; FRANSSON e LÖNNERDAL, 1983; MUIR, 1984; ZHANG *et al.*, 2006) quanto ao efeito do congelamento na determinação de parâmetros de qualidade do leite bovino cru.

Em todos os casos citados, verifica-se variação na medida do parâmetro em avaliação das amostras frescas e congeladas, porém, na maioria das vezes, pode ser considerada pouco significativa.

Avaliação da eficiência de diferentes modos de homogeneização das amostras descongeladas de leite

Os valores de IRSC para 06 amostras de leite cru obtidos a partir do preparo das amostras frescas e após descongelamento empregando três diferentes formas de homogeneização (agitação magnética, agitação por vórtex e agitação com mixer portátil de alto desempenho) foram tratados estatisticamente e são exibidos na Tabela 3. Pode-se verificar pela Tabela 4 e pela Figura 5 que as três diferentes formas de homogeneização das amostras descongeladas de leite apresentaram eficiências similares, sendo consideradas estatisticamente equivalentes, ao nível de 95 % de confiança.

Tabela 3 – Análise descritiva do efeito da homogeneização após descongelamento na determinação do IRSC de amostras de leite cru.

Forma de Homogeneização	IR Médio	DP	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Fresca	38,134	0,564	37,645	37,683	37,948	38,618	39,120
Agit. Magn.	38,189	0,601	37,590	37,703	38,030	38,696	39,225
Mixer	38,125	0,573	37,535	37,625	38,010	38,608	39,095
Vórtex	38,098	0,608	37,480	37,589	37,958	38,608	39,140

IR – índice de refração; DP = desvio padrão; Q1 = 1º quartil; Q3 = 3º quartil.

Tabela 4 – Tabela ANOVA para comparação dos dados obtidos no teste de homogeneização de amostras de leite cru após descongelamento.

Fonte	Graus de liberdade	SQ	SM	F	P
Amostra	5	20,8769	4,1754	75,68	0,000
Forma de Homogeneização	3	0,3609	0,1203	2,18	0,133

Erro	15	0,8276	0,0552
Total	23	22,0654	

S = 0,234889 R-Sq = 96,25 % R-Sq(adj) = 94,25 %

SQ – Soma dos Quadrados; SM = Soma das Médias; F = F calculado; P = coeficiente de correlação de Pearson.

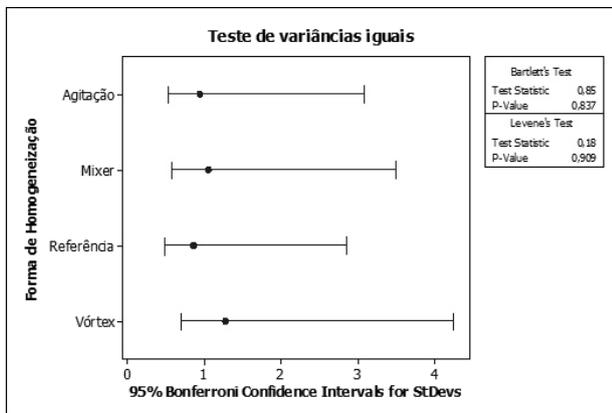


Figura 5- Teste de Bonferroni para comparação das variâncias das medidas de IRSC das amostras de leite cru avaliadas no teste de homogeneização das amostras após descongelamento.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que as amostras de leite podem ser congeladas e analisadas posteriormente, havendo, porém, uma pequena perda de exatidão nas medidas de IRSC, que pode ser mitigada por meio do emprego de um valor de Correção, que é, em termos relativos, inferior a 1 % do valor de medição e inferior também à incerteza expandida calculada para o método, portanto, permanecendo dentro do intervalo de confiança do método.

Diferentes formas de homogeneização da amostra após seu descongelamento mostraram-se equivalentes em seus propósitos, ressaltando-se que a homogeneização cuidadosa do conteúdo amostral é necessária para minimizar a variação de medições entre réplicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e ao LANAGRO/MG – Laboratório Nacional

Agropecuário de Minas Gerais, em Pedro Leopoldo, pela concessão de uso da infraestrutura.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério de Estados dos Negócios da Agricultura. Decreto n° 30.691 de 29 de março de 1952. **Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**, Publicado no Diário Oficial da União de 07 de julho de 1952, seção 1, página 1.

BRASIL, MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 68 de 14 de dezembro de 2006. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários**, Publicado no Diário Oficial da União de 14 de dezembro de 2006, seção 1, página 8.

FAO – Food and Agriculture Organisation of the United Nations – Statistics Division (FAOSTAT). Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 10 mar. 2014.

FRANSSON, G-B.; LÖNNERDAL, B. Effect of freezing on distribution of trace elements and minerals in human and cow's milk. **Nutrition Research**, v. 3, p. 845–853, 1983.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Manual Técnico 37 – Qualidade do Leite e Derivados: Processos, processamento tecnológico e índices**. 4ª ed., Brasília (Brasil): Ministério da Saúde, 2005.

MOTTA, T.M.C.; HOFF, R.B.; BARRETO, F.; ANDRADE, R.B.S.; LORENZINI, D.M.; MENEGHINI, L.Z.; PIZZOLATO, T.M. Detection and confirmation of milk adulteration with cheese whey using proteomic-like sample preparation and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis. **Talanta**, v. 120, p. 498–505, 2014.

MUIR, D.D. Reviews of the progress of dairy science: frozen concentrated milk. **Journal of Dairy Science**, v. 51, p. 649–664, 1984.

RODRIGUES, E.; CASTAGNA, A.A.; DIAS, M.T.; ARONOVICH, M. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, **Programa Rio Rural**, Niterói, Brasil, 2013.

VELOSO, A.C.A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 609–615, 2002.

WEESE, S. J.; THAYNE, W. V.; BUTCHER, D. F. Effect of freezing rate and thawing rate on milk properties. **Journal of Dairy Science**, v. 56, p. 168–170, 1972.

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**, v. 64, p. 203–210, 2006.