

AVALIAÇÃO DO TEOR DE GORDURA DE LEITE *IN NATURA* POR MEIO DO MÉTODO DO BUTIRÔMETRO E DO MÉTODO INFRAVERMELHO

Michele Fangmeier¹, Berenice Helfenstein², Eniz Conceição Oliveira³

Resumo: O Rio Grande do Sul é o segundo Estado brasileiro que mais produz leite, produto que possui composição físico-química variada e que atende às necessidades nutricionais de proteínas, vitaminas e lipídeos. A composição do leite sofre influência conforme a raça do animal, sua alimentação, clima da região, fase da lactação, entre outros fatores, sendo sua gordura facilmente assimilada pelo organismo humano, presente no leite em teor aproximado de 3,5 % a 6,0%. Este estudo realiza uma avaliação do teor de gordura de amostras de leite *in natura* do Vale do Taquari, por meio do método oficial do butirômetro de Gerber, para validação da curva de gordura do equipamento infravermelho (marca FOSS). Por meio de testes de linearidade e precisão obteve-se desvio aceitável entre os métodos, podendo assim concluir que o uso do equipamento infravermelho para análise do leite é viável.

Palavras-chave: Leite; Gordura; Butirômetro; Infravermelho.

INTRODUÇÃO

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgou que, em 2013, foram adquiridos 23,55 bilhões de litros de leite pela indústria láctea, que sofre de inspeção sanitária federal, estadual ou municipal. Desse volume, cerca de 68,8% foram industrializados. A produtividade média brasileira foi de 1.492 litros de leite/vaca/ano, um crescimento de 5,3% em relação a 2012 (MILKPOINT, 2014). No Brasil, Minas Gerais é o Estado que mais adquire leite, cerca de 27,6% do total nacional. Logo em seguida está o Rio Grande do Sul com 13,7%, o Paraná com 11,7%, Goiás com 11,1% e São Paulo com 10,3% de participação (IBGE, 2014). A região Sul apresentou a maior produtividade nacional, 2.674 litros/vaca/ano, tendo o Estado do Rio Grande do Sul registrado a maior produtividade média (2.900 litros/vaca/ano) (MILKPOINT, 2014). Entende-se por leite *in natura* de boa qualidade, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite deve ser transportado em carrossões isotérmicos e, no momento do seu recebimento na indústria, deve apresentar temperatura igual ou inferior a 7°C (BRASIL, 2011).

Um importante fator de variação nas características de composição do leite é a fase de lactação. Algumas pesquisas indicam que os valores de proteína, lipídeos e lactose aumentam no decorrer dessa fase (AGANGA et al., 2002; PRASAD; SENGAR, 2002). Outros fatores também

1 Centro Universitário UNIVATES, curso de Química Industrial - Lajeado/RS - Brasil. E-mail: michi_fangmeier@yahoo.com.br.

2 Centro Universitário UNIVATES, curso de Química Industrial - Lajeado/RS - Brasil. E-mail: berenice.helfenstein@languiru.com.br.

3 Centro Universitário UNIVATES. Doutora em Química e professora titular do Centro Universitário UNIVATES - Lajeado/RS - Brasil. E-mail: eniz@univates.br.

contribuem para produção e a composição físico-química do leite, como: individualidade, raça, alimentação, idade, temperatura ambiental, estação do ano, fatores fisiológicos (gestação, ciclo estral etc.) ou patológicos, como mastite (COSTA et al., 1992; WEISS et al., 2002; WALDNER et al.; 2005). A composição do leite é um fator fundamental que determina sua qualidade nutricional e adequação para processamento e consumo humano. De acordo com Oliveira (2009), o leite de vaca contém cerca de 87% de água, 3,9% de gordura, 3,2% de proteínas, 4,6% de lactose e 0,9% de minerais e vitaminas. Suas características físico-químicas são importantes para a determinação do valor nutritivo, o processamento industrial e a remuneração ao produtor.

Conforme Instrução Normativa nº 62 emitida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) de 29 de dezembro de 2011, o leite cru deve manter seu teor original de gordura, sendo aceitável no mínimo 3% (BRASIL, 2011). Porém, os teores de gordura geralmente variam entre 3,5 a 6,0%, estando a maioria na forma de triglicerídeos formados pela ligação de glicerol e ácidos graxos. Predominam os ácidos graxos de cadeia curta provenientes de unidades de ácido acético, derivadas da fermentação no rúmen. Os ácidos graxos de cadeia longa presentes no leite são principalmente ácidos insaturados, sendo predominantes o oleico, os linoleicos poli-insaturados e os ácidos linolênicos (WATTIAUX, 2014).

O método do butirômetro para análise de gordura é realizado conforme a Instrução Normativa nº 68, emitida pelo Mapa, de 2006 (BRASIL, 2006). Essa técnica é o método oficial e baseia-se na destruição do estado globular da gordura pelo ácido sulfúrico, dissolvendo as proteínas ligadas à gordura devido à liberação de calor, por sua vez, favorece a separação da gordura pelo extrator, que é o álcool amílico. Essa reação ocorre em vidraria própria, chamada butirômetro, que é basicamente um bulbo com uma haste comprida e graduada para os teores percentuais de gordura. A leitura pode gerar valores com precisão de 0,05%, porém, o resultado é expresso com somente uma casa decimal (BRASIL, 2006).

Já a espectroscopia no infravermelho mensura a absorção de diferentes frequências na região do infravermelho da amostra submetida à análise. Uma molécula é capaz de absorver a radiação infravermelha quando ela apresentar a mesma frequência de vibração dessa radiação (BOUIS, 1997). A medição dos espectros de emissão e absorção da radiação fornece informações sobre os grupos químicos presentes na amostra (AGNET; MOLLER, 1995). A análise do leite por infravermelho baseia-se na absorção da radiação por alguns de seus componentes, como a gordura, proteína e lactose (BIGGS et al., 1987). A gordura apresenta os grupos carbonilas (C=O) das ligações éster dos triglicerídeos e os grupos carbono-hidrogênio (C-H), que absorvem radiação no comprimento de onda de 5,7 μm e 3,5 μm , respectivamente. (IDF, 1996). Durante análise do leite, a amostra é homogeneizada com a finalidade de reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura. Em seguida, ela recebe irradiação pelo feixe de luz infravermelha em uma cubeta. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho, quantificada e transformada automaticamente em teores de componentes, tendo como referência a curva de calibração (FONSECA, 2005).

Este trabalho tem por objetivo avaliar o teor de gordura de amostras de leite *in natura* da região do Vale do Taquari por meio de dois métodos: butirômetro de Gerber e infravermelho, realizando estudo de correlação entre ambos, para validação da curva da gordura no equipamento de infravermelho. A gordura do leite é um parâmetro de composição com importância econômica, pois muitos laticínios já pagam seu produtor com base nesse aspecto. Entretanto, o método do butirômetro de Gerber, amplamente utilizado para análise de gordura de leite, é considerado demorado, trabalhoso, com custo elevado e perigoso, visto que são utilizados reagentes corrosivos. Portanto, existe a necessidade por parte das indústrias de implantar outros métodos de análise, com a mesma precisão, porém com maior agilidade, menos perigo e menor custo. O equipamento de infravermelho é uma possibilidade atrativa, pois, além da análise de gordura, pode-se desenvolver

curvas para outras análises, é ágil na determinação dos resultados e preciso. Portanto, este trabalho apresentará testes de validação que podem ser realizados entre ambos os métodos para confirmar a correlação entre os resultados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Métodos de análises utilizados

Para análise de gordura foram utilizados dois métodos distintos, com o objetivo de proceder o ajuste na curva de gordura do equipamento de infravermelho e sua consequente validação.

O método do butirômetro para análise de gordura foi realizado conforme a Instrução Normativa nº 68, de 2006 (BRASIL, 2006), em laboratório externo credenciado. Essa técnica é o método oficial e se baseia na destruição do estado globular da gordura pelo ácido sulfúrico, dissolvendo as proteínas ligadas à gordura devido à liberação de calor, o que, por sua vez, favorece a separação da gordura pelo extrator, que é o álcool amílico.

O outro método de análise foi por equipamento Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF), modelo MilkoScan™ FT2 *Milk application*, da marca FOSS, o qual possui uma curva pré-desenvolvida pelo fabricante, composta por 1.309 amostras de leite coletadas na Dinamarca, na França, na Alemanha, na Holanda, na Nova Zelândia e nos Estados Unidos. A calibração da curva do equipamento foi validada com 376 amostras de leite coletadas independentemente nas mesmas regiões. Porém, o fabricante indica que a curva para cada análise seja validada com o leite da região em que o equipamento será utilizado. A faixa de medição para gordura é de 0,01 à 13,5%, exatidão de 0,024% e repetibilidade de 0,004% no equipamento infravermelho.

2.2 Amostragem

Foram coletadas 105 amostras aleatórias de leite de vaca *in natura* na região do Vale do Taquari. Elas foram submetidas à análise de gordura no equipamento MilkoScan™ FT2 *Milk application*, na temperatura de 3°C à 9°C, de uma indústria laticínios da mesma região. Posteriormente, as mesmas amostras foram enviadas para laboratório externo credenciado para análise de gordura por meio do método do butirômetro. Portanto, as amostras foram analisadas por meio dois métodos dentro do tempo máximo de 24 horas. Os resultados obtidos no laboratório credenciado foram verificados por meio de laudos de análise oficiais.

Pela comparação entre os resultados obtidos pelos dois métodos distintos, calculou-se o desvio padrão, o qual foi utilizado para ajustar a curva do equipamento. Após ajuste, foram utilizadas 26 amostras aleatórias de leite *in natura* para verificar novamente o desvio existente entre ambos os métodos, necessitando novo ajuste. Por fim, foram utilizadas mais 10 amostras aleatórias de leite *in natura* para confirmação da correlação entre os métodos, após ajustes na curva.

2.3 Testes de validação

Os testes de validação foram realizados utilizando o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, da Resolução da Anvisa nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

Realizou-se o teste de linearidade, que é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de um intervalo especificado. Utilizaram-se amostras de leite *in natura* com diferentes concentrações de gordura, que variaram de 3% a 5%. Para confirmar a relação linear, foram gerados

gráficos para cada etapa da validação (1ª etapa, 2ª etapa, 3ª etapa) e determinado o coeficiente de correlação (R^2), que deve ser próximo de 1,00.

Realizaram-se três testes para avaliar a precisão, que é a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla da mesma amostra. A precisão intracorrida (repetibilidade) é a concordância entre os resultados em um curto tempo com o mesmo analista e o mesmo equipamento. O teste foi realizado por 10 determinações para três concentrações (baixa, média e alta).

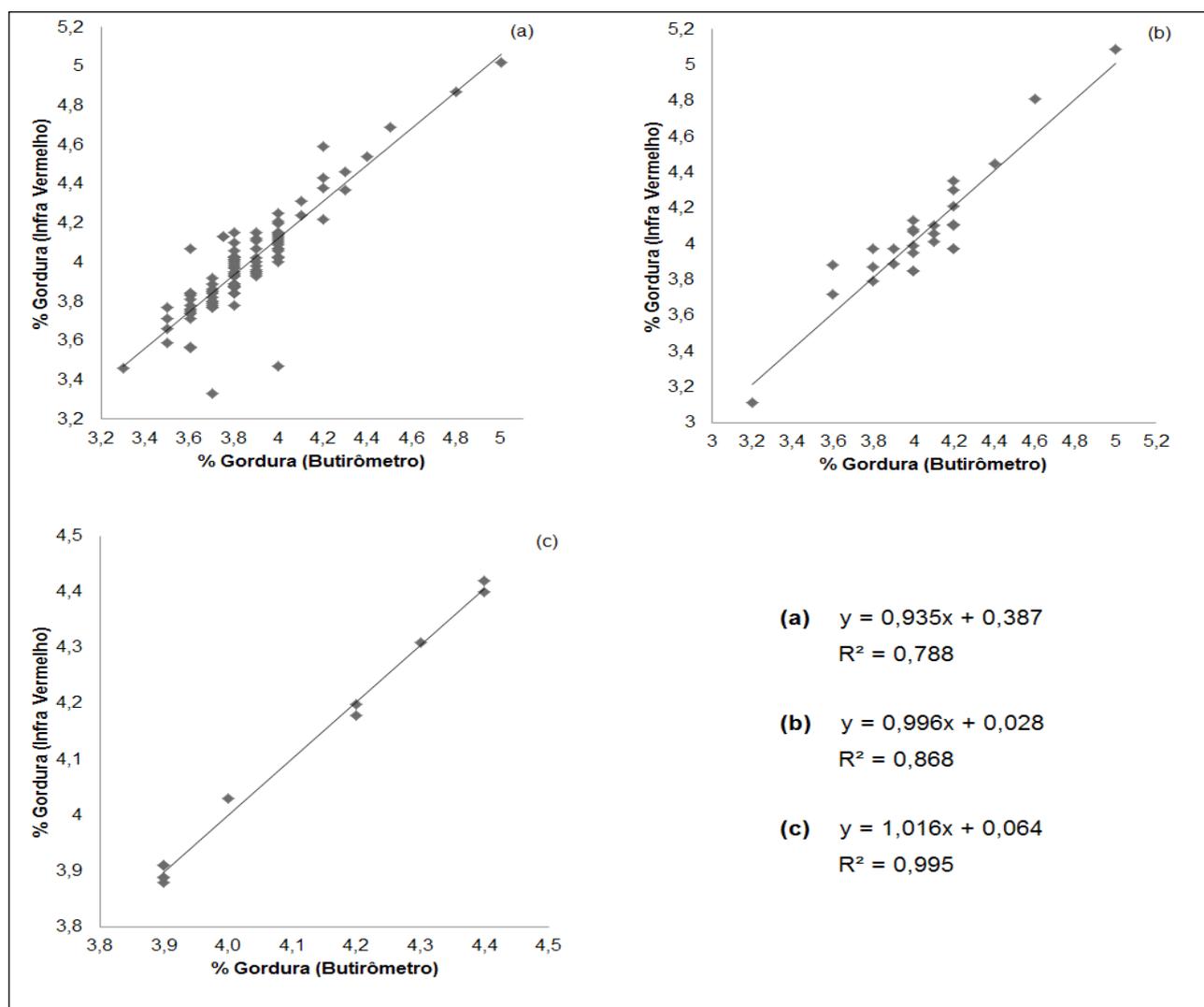
A precisão intercorrida (intermediária) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, porém com três diferentes analistas em dois dias diferentes. Já a precisão interlaboratorial (reprodutibilidade) é a concordância entre os resultados de laboratórios diferentes, expressa por meio do desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Linearidade

A correlação entre o sinal medido e a concentração do analito foi expressa por meio de curva analítica. Os coeficientes da curva analítica foram obtidos pelo método de regressão linear, o qual gerou a equação $y = ax + b$, em que y é a resposta analítica, x é concentração, a é coeficiente angular e b é o coeficiente linear. Além dos coeficientes de regressão (a e b), obteve-se o coeficiente de correlação (R^2), que é um dos parâmetros que avalia a qualidade da curva analítica, pois quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão das amostras e a incerteza dos coeficientes de regressão calculados (RIBANI et al., 2004). A Figura 1 apresenta as curvas de calibração.

Figura 1 - Curva de calibração da gordura para leite *in natura*, nas etapas de validação



Legenda: (a) Primeira etapa de validação; (b) Segunda etapa de validação; (c) Terceira etapa de validação.
Fonte: Os autores (2015)

Conforme a Figura 1, a curva de gordura apresentou boa linearidade na terceira etapa de validação (etapa c), após os ajustes realizados no equipamento de infravermelho, pois seu coeficiente de correlação foi de 0,9947. Oliveira (2011) realizou a validação do mesmo equipamento (porém da marca CombiScope) para a avaliação do teor de ureia no leite cru e quando comparado com a metodologia enzimática, o equipamento infravermelho possui coeficiente de correlação de 0,89, inferior ao observado neste trabalho.

3.2 Precisão intracorrida (repetibilidade)

A repetibilidade refere-se ao uso do método analítico dentro do mesmo laboratório em um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004). Pode ser verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando três

concentrações (baixa, média e alta) (BRASIL, 2003; ICH, 2005). A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos no teste de repetibilidade com três diferentes concentrações.

Tabela 1 - Teste de repetibilidade por meio de dez determinações em três diferentes concentrações

Amostras	Resultados de gordura (%)		
1	3,01	4,23	4,99
2	3,02	4,22	5,00
3	3,01	4,23	5,00
4	3,01	4,23	5,00
5	3,01	4,23	5,00
6	3,02	4,22	4,99
7	3,01	4,23	5,00
8	3,01	4,23	5,00
9	3,02	4,23	5,00
10	3,01	4,23	5,00
Desvio padrão	0,00	0,00	0,00

Fonte: Elaborado pelos autores (2015).

Conforme a Tabela 1, foram realizadas 10 determinações de uma mesma amostra, contemplando diferentes concentrações de gordura. Obteve-se desvio padrão de 0,00%, o que demonstra que o equipamento é estável e possui ótima repetibilidade, atendendo à legislação vigente e às necessidades do controle de qualidade das empresas. Por meio da análise estatística dos dados, Oliveira (2011) obteve boa precisão na repetibilidade do equipamento para medição de teor de ureia, assim como para o teor de gordura, em que a média dos resultados foi de 3,54% de gordura e desvio padrão de 0,01%.

3.3 Precisão intercorrida (intermediária)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas e/ou equipamentos diferentes. O objetivo deste parâmetro de validação foi verificar se no mesmo laboratório o método fornecia os mesmos resultados (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004). Os analistas A, B e C receberam duas amostras de concentração 4,40% e 3,20% de gordura, as quais foram analisadas em dias distintos. A Tabela 2 expõe os resultados encontrados para o teste de precisão intercorrida, realizado em dois dias distintos.

Tabela 2 - Teste de precisão intercorrida entre os analistas A, B e C, nos dias 1 e 2

Analistas	Resultados de gordura (%)	
	Dia 1	Dia 2
Analista A	4,40	3,20
Analista B	4,40	3,20
Analista C	4,40	3,20
Desvio padrão	0,00	0,00

Fonte: Elaborado pelos autores (2015)

Conforme a Tabela 2, os analistas A, B e C encontraram o mesmo teor de gordura para cada amostra, apresentando, assim, 0,00% de desvio padrão. Esses resultados comprovam que, além de o equipamento possuir ótima repetibilidade, também não sofre influência dos diferentes analistas, assim como os analistas possuem capacitação técnica necessária para operar o equipamento, não gerando nenhum desvio durante as análises. Oliveira (2011) realizou a mesma avaliação com dois diferentes analistas, variando o período do dia (manhã e noite) e também obteve excelentes resultados.

3.4 Precisão interlaboratorial (reprodutibilidade)

A reprodutibilidade consiste na concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes (BRASIL, 2003). Para calcular o desvio padrão, utilizou-se o resultado da análise do laboratório externo credenciado, menos o resultado do equipamento infravermelho. Na 1ª etapa de validação foram avaliadas 105 amostras de leite *in natura*, que geraram o desvio padrão de -0,10, o qual foi utilizado para fazer ajuste no equipamento. Na 2ª etapa de validação foram utilizadas 26 amostras de leite *in natura*, que geraram o desvio padrão de 0,08, que, somado ao desvio ajustado no equipamento, gerou novo ajuste de -0,02. Para confirmação da validação, foram utilizadas 10 amostras de leite *in natura*, que apresentaram desvio padrão de 0,02, o que foi considerado aceitável (TABELA 3).

Tabela 3 - Teste de precisão interlaboratorial para cada etapa da validação do equipamento infravermelho

Validação	Número de amostras	Desvio Padrão (*)	Ajuste realizado no Equipamento
1ª etapa	105	-0,10	-0,10
2ª etapa	26	0,08	-0,02
3ª etapa	10	0,02	-0,02

*Desvio padrão = resultado de laboratório externo credenciado – resultado do equipamento infravermelho.

Fonte: Elaborado pelos autores (2015)

Pelos resultados observados na Tabela 3 é possível afirmar que a validação do equipamento infravermelho é simples, pois em apenas três etapas foi possível alcançar desvio padrão aceitável e inferior ao desvio do método do butirômetro (0,05%). O número de amostras utilizadas nesse processo de validação também não é significativamente alto, podendo a implantação do processo

de validação por infravermelho ser realizada durante a rotina de um laboratório, sem acarretar aumento no volume de trabalho.

4 CONCLUSÕES

Verificou-se com este estudo que é necessário seguir as orientações do fabricante do equipamento de infravermelho e adequar a curva da análise de gordura com amostras de leite da região em que ele será utilizado, pois, como avaliado na pesquisa, a composição do leite bovino varia significativamente conforme a região, o clima, a raça do animal, a alimentação, entre outros fatores. Portanto, após ajustes na curva da análise de gordura, observou-se que o equipamento de infravermelho da marca FOSS apresenta boa correlação com os resultados das análises do método oficial do butirômetro, pois os testes de linearidade e precisão apresentaram desvio aceitável.

REFERÊNCIAS

AGANGA, A. A.; AMARTEIFIO, J. O.; NKILE, N. **Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk.** *Journal of Composition and Analysis*, v.15, n.5, p.533-543, 2002.

AGNET, Y.; MOLLER, L. **La interferometria por transformada de Fourier. Um nuevo concepto em el analisis de leche y productos lacteos.** *Revista Española de Lechería*, v.63, p.14-15, 1995.

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

BRASIL. ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006.** Oficializa Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para controle de leite e produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 14 dez de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011.** Aprovar o 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, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa.

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

COSTA, F. M. A. et al. **Variação do teor de gordura no leite bovino cru.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.27, n.5, p.763-769, 1992.

FOSS. **Manual FOSS Application Note 252d.**

FONSECA, C. S. P. **Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais.**

2005. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária. Brasília: IBGE. 2014.** Disponível em: <http://ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201401_publ_completa.pdf>. (Acesso em: 10 dez. 2014).

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2 (R1).** Disponível em:<<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. (Acesso em: 11 jul. 2015).

IDF. Whole milk. **Determination of milkfat, protein and lactose content.** Guide for the operation of mid-infrared instruments. Brussels: IDF, 1996. (International Dairy Federation Standards 141B).

MILKPOINT. **IBGE: produção total aumentou 6% em 2013.** 2014. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/ibge-producao-total-aumentou-6-em-2013-92662n.aspx>>. (Acessado em 13 jan. 2015).

OLIVEIRA, M. C. P. P. **Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (fourier transform infrared):validação da análise do teor de uréia e de outros parâmetros de qualidade do leite.** Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, MG. 2011.

PRASAD, H.; SENGAR, O. P. S. **Milk yield and composition of the Barbarigota breed and its cross with Jamunapari, Beetal and Black Bengal.** Small Ruminant Research, v.45, p.79-83, 2002.

RIBANI, M. et al. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

WALDNER, D.N. et al. **Managing milk composition: normal sources of variation.**

WATTIAUX, M. A. **Composição do Leite e seu Valor Nutricional.** Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira International University of Wisconsin-Madison. 2014. Disponível em: <<http://www.universidadedoleite.com.br/artigo-composicao-do-leite-e-seu-valor-nutricional>>. (Acessado em 10 dez. 2014).

WEISS, D. et al. **Variable milking intervals and milk composition.** Milchwissenschaft, v.57, n.5, p. 246-249, 2002.