

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**DETERMINAÇÃO DO PONTO DE CONGELAMENTO
MÉDIO**

DO LEITE DE VACA (RAÇA HOLANDESA) DA

Parecer **REGIÃO DE CAMPINAS E TAUBATÉ**

*Este exemplar corresponde a redação final de
Tese defendida por Luciane Vieira Garcia e
aprovada pela Comissão Julgadora em 29.04.79*

Salvo divergências
LUCIANE VIEIRA GARCIA n.º 165

Tese apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos
para a obtenção do Título de
Mestre em Tecnologia de
Alimentos

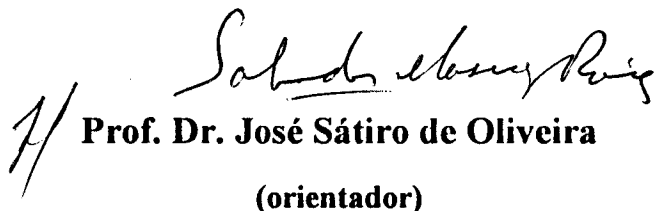
Orientador: Prof. Dr. José Sátiro de Oliveira



***À Deus
agradeço***

*À minha família
dedico*

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Sátiro de Oliveira
(orientador)


Prof. Dr. Salvador Massagué Roig


Profª Dra. Walkiria H. Viotto


Profª Dra. Maria Aparecida Azevedo Pereira

Campinas, 29 de 04 de 1994

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Sátiro de Oliveira, pela orientação e amizade.

À Profa. Dra. Maria Aparecida A.P. da Silva, pela atenção e orientação nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Walkiria H. Viotto e Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig, pelas sugestões e correção dos bonecos.

Ao Prof. Dr. Francisco Prata, pelas primeiras orientações nas análises estatísticas.

À Cláudia e Beth, do Laboratório de Leite da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela amizade.

À Mariko, Miriam, Raquel, Renata e Sandra pelo apoio e auxílio na realização deste trabalho.

À Fátima, do Microcentro, pelo auxílio na impressão deste trabalho.

À Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de campinas (CLC) e Cooperativa de Laticínios do Médio Vale do Paraíba (COMEVAP), pelas instalações do Laboratório de Análises Físico-Químicas.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, bem como aos funcionários da Secretaria do Departamento de Tecnologia de Alimentos, por todos os serviços prestados.

Ao CNPq, FAPESP e PAEP, pelo auxílio financeiro.

À todos aqueles que de uma maneira ou de outra, dificultaram a realização deste trabalho, agradeço por ter me feito mais forte e confiante.

*Se não houve frutos
Valeu pela sombra das folhas;
Se não houve folhas
Valeu pela beleza das flores;
Se não houve flores
Valeu pela intenção das sementes.*

Hangel

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Índice.....	iii
Índice de Tabelas	vii
Índice de Figuras.....	x
 Resumo.....	 xi
Summary.....	xii
 1.Introdução	 1
 2.Revisão Bibliográfica.	 2
2.1.O ponto de congelamento do leite.....	2
2.2.Fatores que influenciam o ponto de congelamento do leite	4
2.2.1.Raça	4
2.2.2.Alimentação.....	5
2.2.3.Lactação	7
2.2.4.Região	9
2.2.5.Armazenamento	10
2.3.Relação entre os pontos de congelamento expressos em graus Celsius e graus Hortvet.....	12
2.4.Legislação e Padrões	15
 3.Material e Métodos	 19
3.1.Amostragem	19
3.1.1.Pontos de Amostragem	19
3.1.1.1.Plataforma	19

3.1.1.2.Fazendas.....	19
3.1.1.2.1.Tanque de resfriamento.....	19
3.1.1.2.2.Latões.....	20
3.1.1.2.3.Animais.....	20
3.1.2.Acondicionamento das amostras	20
3.2.Crioscopia de gado holandes.....	21
3.2.1.Comparação dos pontos de congelamento entre amostras coletadas na fazenda e na plataforma, de rebanhos na região de Campinas.....	21
3.2.2.Pontos de congelamento do leite de rebanhos na região de Taubaté.....	21
3.2.3.Avaliação dos pontos de congelamento do leite coletado das fazendas A, C e F, da região de Campinas.....	22
3.3.Soluções Padrão	22
3.3.1.Preparo das Soluções Padrão	22
3.3.2.Soluções Padrão Comerciais	23
3.3.3.Avaliação das soluções padrão	23
3.3.3.1.Determinação dos pontos de congelamento de soluções padrão comerciais	23
3.3.3.2.Determinação dos pontos de congelamento das soluções de sacarose 7 e 10%.....	24
3.3.3.3.Determinação dos pontos de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%	24
3.3.3.4.Determinação dos pontos de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85% por diferentes analistas	25
3.3.3.5.Estudo de armazenamento das soluções padrão de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%.....	25

3.3.3.6.Comparação das soluções padrão de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%, analisadas através de crioscopia manual e eletrônica.....	25
3.3.3.7.Determinação da curva de aguagem	26
3.4.Determinação do Ponto de Congelamento do leite	26
3.4.1.Crioscopia Eletrônica.....	26
3.4.2.Crioscopia Manual.....	27
3.5.Análise estatística	27
4.Resultados e Discussão	28
4.1.Avaliação das Soluções Padrão.....	28
4.1.1.Determinação dos pontos de congelamento das soluções padrão comerciais	28
4.1.2.Determinação dos pontos de congelamento de soluções de sacarose 7 e 10%.....	30
4.1.3.Avaliação das soluções de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%	31
4.1.3.1.Determinação do ponto de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%, por diferentes analistas.....	31
4.1.3.2.Estudo de armazenamento das soluções padrão de biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%.....	33
4.1.3.3.Comparação das soluções padrão de biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%, analisadas através de crioscopia manual e eletrônica	35
4.1.4.Determinação da curva de aguagem do leite.....	37
4.2.Crioscopia de gado holandês.....	39
4.2.1.Comparação dos pontos de congelamento entre amostras coletadas nas fazendas e plataforma, de rebanhos da região de Campinas	39

4.2.2.Pontos de congelamento de rebanhos da região de Taubaté.....	42
4.2.3.Comparação dos pontos de congelamento das amostras coletadas em Campinas e Taubaté	45
4.2.4.Comparação dos pontos de congelamento entre amostras das ordenhas da manhã, tarde e leite de mistura das fazendas A,C e F, da região de Campinas, durante o inverno e o verão	47
4.2.5.Comparação dos pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, das fazendas A, C e F, da região de Campinas durante o inverno e verão.....	52
5.Conclusões	62
6.Referências Bibliográficas	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Pontos de congelamento de soluções padrão comerciais, para a calibração do crioscópio eletrônico, determinados através de crioscopia manual, e expressos em °C	29
Tabela 4.2. Pontos de congelamento das soluções de sacarose a 7 e 10%, através de crioscopia manual e expressos em °C	30
Tabela 4.3. Pontos de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%, realizado por diferentes analistas, através de crioscopia manual e expressos em °C	32
Tabela 4.4. Pontos de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%, analisadas através de crioscopia manual e eletrônica, e expressos em °C	36
Tabela 4.5. Pontos de congelamento de amostras de leite coletadas nas fazendas e plataforma da região de Campinas, analisados através de crioscopia eletrônica	40
Tabela 4.6. Médias e desvios padrão dos pontos de congelamento do leite dos seis rebanhos da região de Campinas, analisadas através de crioscopia eletrônica	41
Tabela 4.7. Pontos de congelamento do leite da manhã, tarde e mistura coletadas em fazendas de Taubaté, e analisadas através de crioscopia eletrônica	43

Tabela 4.8. Médias e desvios padrão dos pontos de congelamento do leite de mistura, de seis rebanhos da região de Taubaté, analisadas através de crioscopia eletrônica.....	44
Tabela 4.9. Médias e desvios padrão dos pontos de congelamento do leite de mistura, das regiões de Campinas e Taubaté, analisadas através de crioscopia eletrônica	46
Tabela 4.10. Pontos de congelamento do leite das ordenha da manhã, tarde e mistura, das fazendas A, C e F, da região da Campinas, durante o inverno e verão, em diferentes dias e analisadas através de crioscopia eletrônica	48
Tabela 4.11. Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na fazenda A, da região de Campinas, durante o inverno e analisadas através de crioscopia eletrônica.....	53
Tabela 4.12. Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na fazenda A, da região de Campinas, durante o verão e analisadas através de crioscopia eletrônica.....	54
Tabela 4.13. Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na fazenda C, da região de Campinas, durante o inverno e analisadas através de crioscopia eletrônica.....	55
Tabela 4.14. Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na fazenda C, da região de Campinas, durante o verão e analisadas através de crioscopia eletrônica.....	56

Tabela 4.15. Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na fazenda F, da região de Campinas, durante o inverno e analisadas através de crioscopia eletrônica.....	57
---	-----------

Tabela 4.16. Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na fazenda F, da região de Campinas, durante o verão e analisadas através de crioscopia eletrônica.....	58
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Comparação das escalas de temperatura obtidas com o aparelho de Hortvet e a escala centígrada	14
Figura 4.1. Efeito do armazenamento sobre o ponto de congelamento da solução de biftalato de potássio 3%, armazenada à temperatura ambiente e sob refrigeração	33
Figura 4.2. Efeito do armazenamento sobre o ponto de congelamento da solução de cloreto de sódio 0,85%, armazenada à temperatura ambiente e sob refrigeração	34
Figura 4.3. Regressão linear entre a porcentagem de água adicionada ao leite e o ponto de congelamento, determinada por crioscopia eletrônica	38
Figura 4.4. Distribuição dos valores dos pontos de congelamento do leite das ordenhas da manhã, tarde e mistura, das Fazendas A, C e F, da região de Campinas, durante o inverno	50
Figura 4.5. Distribuição dos valores dos pontos de congelamento do leite das ordenhas da manhã, tarde e mistura, das Fazendas A, C e F, da região de Campinas, durante o verão	51
Figura 4.6. Distribuição dos valores dos pontos de congelamento de leite individual, das Fazendas A, C e F, da região de Campinas, no inverno e no verão	60

Resumo

Considerando-se os poucos conhecimentos sobre crioscopia de leite de vaca tipo "B" no Estado de São Paulo, bem como os fatores que o influenciam, o presente trabalho foi conduzido no intuito de esclarecer a real situação do leite, em relação ao ponto de congelamento, nas regiões de Campinas e Taubaté. Amostras de leite foram coletadas "in situ", pelo próprio pesquisador, e analisadas através de crioscopia eletrônica. Foi encontrada diferença significativa ($p \leq 0,001$) entre as duas regiões estudadas. Na região de Campinas, foi estabelecida uma diferença significativa ($p \leq 0,001$) entre leites coletados nas fazendas e na plataforma. Foi encontrada diferença significativa ($p \leq 0,001$) entre pontos de congelamento de amostras coletadas nos períodos da manhã e da tarde. Não foi encontrada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre verão e inverno. Com relação ao estágio de lactação, foi observada uma tendência de aumento do ponto de congelamento do leite no inverno. Tendência oposta foi observada no verão. O valor médio do ponto de congelamento do leite, estabelecido através deste experimento para a região de Campinas foi de $-0,543^{\circ}\text{C} \pm 3,77$ e o de Taubaté, $-0,534^{\circ}\text{C} \pm 2,82$. As análises das soluções padrão comerciais indicaram que os valores nominais não corresponderam aos valores reais das mesmas. Soluções de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%, podem ser utilizadas como padrão para crioscopia.

SUMMARY

Considering the limited knowledge of cryoscopy in "B" grade cow's milk in the State of São Paulo (Brazil) and the factors which influence it, the main objective of this research was to elucidate the real situation of milk in the Campinas and Taubaté regions with respect to its freezing point. A significant difference ($p \leq 0,001$) was found between the two regions. In the Campinas region, a significant difference was found ($p \leq 0,001$) between samples collected in the morning and others collected afternoon. No significant difference ($p \leq 0,05$) was found between summer and winter. With respect to the stage of lactation, a tendency for the freezing point to increase as lactation progressed was observed in the winter, and the inverse effect observed in the summer. In the Campinas region, the average value for the freezing point of milk established in this work was $-0,543^{\circ}\text{C} \pm 3,77$. In the Taubaté region, this value was $-0,534^{\circ}\text{C} \pm 2,82$. Analyses of commercial standard solutions showed that the nominal values did not correspond to the true values. Solutions of 3% potassium biphthalate and 0,85% sodium chloride can be used as standard for cryoscopy.

1. Introdução

O leite é um sistema complexo cujos componentes distribuem-se em diferentes fases. A água é a fase dispersante, na qual os glóbulos de gordura e proteína encontram-se emulsionados ou suspensos e os demais componentes, como sais e lactose, estão em solução verdadeira (PUHAN, 1984).

O leite de vaca contém em média 87,5% de água e 12,5% de sólidos totais. A presença de água extrínseca no leite é ilegal na maioria dos países, inclusive no Brasil. Tal adição reduz o valor nutritivo do leite bem como o seu rendimento durante a fabricação de subprodutos, além de aumentar o custo de transporte e a probabilidade de uma contaminação microbiana (HARDING, 1983).

Das características físicas do leite, o ponto de congelamento ou índice crioscópico é considerado o parâmetro que apresenta menor variabilidade, sendo proporcional à quantidade de soluto na fase de solução verdadeira do leite (CARVALHO, 1977a). Desta forma, a determinação do ponto crioscópico passa a ter, além da importância teórica, aplicação prática na indústria de laticínios, já que possibilita a detecção de fraude causada por adição de água ao leite (PINTO & WOLSCHOON-POMBO, 1985)

Os produtores nacionais de leite tipo "A" e "B", com seus rebanhos especializados, têm apresentado um leite considerado anormal frente ao rígido padrão adotado pela legislação brasileira, padrão este baseado em determinações experimentais de outros países (SAITO & SCHIFTAN, 1973). Fatores como alimentação, clima, estágio de lactação e raça do animal podem ser responsáveis pela ocorrência deste fenômeno (COSTA *et alli*, 1985). A influência dessas variáveis sobre o ponto crioscópico, deve ser considerada para que este possa ser usado com segurança na constatação de eventuais irregularidades a que o leite tenha sido submetido (PANETTA *et alli*, 1985).

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivos, oferecer subsídios para a solução dos problemas enfrentados com frequência, pelos produtores nacionais de leite tipo "A" e "B", além de avaliar as soluções padrão recomendadas para a padronização dos crioscópios e o nível de influência da região, estação do ano e horário da ordenha sobre o ponto de congelamento do leite de vaca.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O ponto de congelamento do leite

Em 1714, FAHRENHEIT (citado por CARVALHO, 1977) relatou que a água podia ser super-resfriada sem que ocorresse o seu congelamento. Este pesquisador observou também que se uma partícula de gelo fosse adicionada, o congelamento começaria e a temperatura do sistema subiria até aproximadamente zero. A partir desta informação, originaram-se vários métodos de determinação do ponto de congelamento de soluções diluídas.

RAOULT (1894) (citado por WOLFSCHOON-POMBO, 1982), foi quem primeiramente estabeleceu a lei referente à variação do ponto de congelamento das soluções. O autor afirmou que o abaixamento da temperatura de congelamento de uma solução é diretamente proporcional à sua concentração e inversamente proporcional à massa molecular da(s) substância(s) dissolvida(s). Então, a adição de água em uma solução, tornará menor a sua concentração, resultando em um valor maior no ponto de congelamento.

O ponto de congelamento do leite é uma medida indireta da concentração das substâncias solúveis em água e não depende da concentração das substâncias insolúveis na fase aquosa (BRATHEN, 1983). Desta forma, através da diluição do leite com água, a concentração das substâncias solúveis em água é reduzida e consequentemente o ponto de congelamento é alterado, aproximando-o de zero. A magnitude do aumento é aproximadamente proporcional à quantidade de água adicionada (SHIPE, 1961).

Os valores do ponto de congelamento encontrados para leite integral, creme e leite desnatado mostram-se semelhantes. Isto ilustra o fato de que o ponto de congelamento depende, não da composição da amostra, mas da concentração das substâncias dissolvidas na fase aquosa, principalmente sais e lactose (NEWLANDER, 1964).

O ponto de congelamento ainda pode ser referido como depressão do ponto de congelamento (DPC), sendo esta última definida como a diferença algébrica entre as temperaturas de congelamento do leite e da água. Assim, quanto menor a DPC, maior a

probabilidade que amostra tenha sido adulterada com água (PINTO & WOLSCHOON-POMBO, 1985; FONSECA, 1986).

Levando-se em consideração que o ponto de congelamento do leite é dependente do número de moléculas e/ou íons dissolvidos na fase aquosa, fica evidente que os glóbulos de gordura e proteína coloidal não exercerão nenhum efeito no ponto de congelamento do leite, dado o número relativamente pequeno de moléculas por grama (BRATHEN, 1983).

O ponto de congelamento do leite é então totalmente dependente da concentração de lactose e cloretos, sendo que a primeira soma ao redor de 55% e o segundo, 25% da DPC (COLE *et alli*, 1957). Os demais 20% da DPC são devidos a outros constituintes como cálcio, potássio, lactatos, fosfatos e citratos (PINKERTON & PETERS, 1958).

Muito embora o ponto de congelamento seja uma "constante fisiológica", o mesmo varia dentro de limites muito estreitos, sugerindo que embora ocorra variação de um dos componentes na fase aquosa, a molalidade total dos diferentes constituintes mantém-se constante. Exemplificando, pode-se dizer que qualquer variação no conteúdo da lactose, será compensado por uma alteração dos sais na mesma proporção; não necessariamente na quantidade dos sais, mas no total de suas moléculas e íons que se acham dissolvidos no leite (PETERS *et alli*, 1959a, HENNINGSON, 1963; DEMOTT, 1971).

O ponto crioscópico do leite pode ser influenciado por fatores ambientais (estação do ano, clima e região), bem como características genéticas dos animais (raça) e manejo (estágio de lactação e alimentação) (COSTA *et alii*, 1985). Entretanto, existe um valor médio, baseado na média dos resultados do leite produzido por muitas vacas, no qual o efeito desses fatores é compensado. Este valor é utilizado como parâmetro de referência para calcular a quantidade de água adicionada ao leite (WOLSCHOON-POMBO, 1982).

Devido a estas variações naturais, COSTA *et alli* (1985), recomendaram que antes de se afirmar que o leite foi adulterado com água, seja estabelecido o ponto crioscópico característico do leite autêntico, a partir de animais individuais, de leite de mistura, latões, caminhões, etc. Entende-se por leite autêntico, leite certificadamente livre de água adicionada, coletado da ordenha da manhã ou da tarde, na presença do fiscal "in situ".

Segundo CARVALHO (1977a), este valor médio deve ser determinado para cada região e em casos especiais pode ser necessário até a verificação em amostras de leite provenientes de rebanhos específicos.

Desta forma, quando um laboratório analisa o leite de um produtor, ele compara o ponto crioscópico do produto com o valor do ponto crioscópico médio da região (WOLSCHOON-POMBO, 1982).

2.2. Fatores que influenciam o ponto de congelamento do leite

Segundo JOHNSON (1974), leites diferem largamente quanto a composição, sendo que as maiores variações ocorrem entre leites de diferentes espécies. Em animais da mesma espécie, as alterações na composição do leite dependem de tantos fatores, que é difícil determinar com precisão, a relação entre o agente de variação e os componentes do leite.

Muito embora existam tabelas onde são fornecidos dados da composição do leite, não se pode afirmar que estas são as quantidades exatas dos componentes produzidos por um animal em um dado momento. Mediante a larga variação na composição individual das amostras, DUCLAUX (citado por JOHNSON, 1974), declarou que melhor seria se o "leite" fosse intitulado como "leites".

2.2.1. Raça

HORTVET (1921), supôs que a raça das vacas não tivesse influência sobre o ponto de congelamento do leite. Posteriormente, VELDEN *et alli* (1984), relatou que não há provas conclusivas da influência da raça do animal sobre o ponto de congelamento do leite. Mesmo que tenham sido encontradas diferenças no ponto de congelamento do leite de vacas de diferentes raças, a amplitude de variação é tão pequena que sua importância parece questionável.

DEMOTT (1966) e PINTO *et alli* (1976), não conseguiram encontrar diferenças significativas entre leites de vacas Jersey, Holstein, Friesian, Greman Red e Híbridos.

Entretanto, resultados de outras pesquisas mostraram diferenças no valor do ponto de congelamento à partir de raças diferentes (PETERS *et alli*, 1959b; HENNINGSON, 1969).

No entanto, existe uma indicação de que as características genéticas dos animais interferem significativamente sobre os valores do ponto de congelamento, os quais apresentam-se mais elevados (mais próximos de zero) à medida em que os rebanhos possuem maior número de animais puros em relação aos animais mestiços (PANETTA *et alli*, 1985).

Por este motivo, CARVALHO (1977b) sugeriu que a determinação do ponto de congelamento médio do leite, a nível de plataforma, deve levar em consideração a diversidade das raças leiteiras utilizadas no Brasil.

Tem-se tentado encontrar uma relação entre o ponto de congelamento do leite e o tamanho do rebanho (VELDEN *et alli*, 1984). Seria de se esperar que o ponto de congelamento do leite de um rebanho dependa do tamanho deste, supondo-se que as variações nos pontos de congelamento do leite das vacas consideradas individualmente sejam mais niveladas em um rebanho grande que em um pequeno (BRATHEN, 1983).

Entretanto, FREEMAN *et alli* (1972) e HARDING & MORRIS (1978), não encontraram diferenças consistentes entre estes dois parâmetros. Esses pesquisadores sugeriram que, provavelmente, o tamanho do rebanho e o sistema de ordenha não tenham influência direta no ponto de congelamento do leite. Porém, meios diferentes de manejo, como diferenças na alimentação e acesso dos animais à água, podem levar a diferenças no ponto de congelamento do leite.

2.2.2. Alimentação

A alimentação pode influir decisivamente sobre alguns componentes do leite. Segundo SHIPE *et alli* (1953) os componentes alimentares que interferiram ligeiramente sobre os valores do ponto de congelamento foram os concentrados (ração) e os minerais.

DEMOTT *et alli* (1969) encontraram diferenças nos pontos de congelamento do leite, quando havia uma mudança na dieta das vacas, de silagem/feno, para pastagem e novamente para silagem/feno. Esses pesquisadores encontraram médias de $-0,520^{\circ}\text{C}$, $-0,522^{\circ}\text{C}$ e $-0,519^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Um aumento no ponto de congelamento do leite, foi observado por PINKERTON & PETERS (1956), quando as vacas recebiam menor conteúdo de carboidrato. A diferença

encontrada entre o grupo teste (ração com baixa concentração de carboidrato) e o padrão (ração com alto conteúdo de carboidrato), chegou até a 0,008°C.

Tendência semelhante foi encontrada por PETERS *et alli* (1959a) e SHIPE *et alli* (1953). Os primeiros, encontraram pontos de congelamento mais altos, para animais alimentados com ração, cerca de 63% mais pobre em fibra crua e 14% menos concentrada em matéria seca. Os segundos pesquisadores encontraram pontos de congelamento mais altos, quando na ração havia grande proporção de grãos (-0,534°C), que quando os animais eram alimentados com feno (-0,541°C) ou com pastagem (-0,544°C).

Da mesma forma, DEMOTT *et alli* (1967) encontraram pontos de congelamento cerca de 0,003°C mais baixo, quando as vacas eram alimentadas com uma ração composta de feno, silagem e grão, do que quando era fornecido, ração de mesma composição, porém com menor proporção de feno e silagem e maior concentração de grãos.

Segundo PETERS *et alli* (1959a), o ponto de congelamento do leite também pode ser diminuído quando a ração contém maior quantidade de fibra crua. O mesmo efeito foi observado por GIKONYO & KLEYN (1969), que encontraram uma diferença de 0,007°C, quando as rações apresentaram concentrações de 11 a 19% de fibra bruta.

Tem-se observado algumas variações na composição mineral do leite, e consequentemente no ponto de congelamento, devido a variações no fornecimento de cloreto de sódio na dieta (DEMOTT, 1966).

Segundo DEMOTT *et alli* (1968), em média, cada 100g adicionais de sal por dia, resultaram em um ponto de congelamento 0,001°C mais baixo. Em rebanhos que receberam ração com concentrações crescentes (0, 1, 2, e 4%) de NaCl, foi observado pontos de congelamento de -0,525°C, -0,528°C, -0,529°C e -0,530°C, respectivamente. Pontos de congelamento mais baixos também foram observados por COSTA *et alli* (1985), quando o gado Holandês se alimentava de pasto mais suplementação mineral (-0,543°C), quando comparados com a dieta baseada só em pasto (-0,528°C).

GIKONKO & KLEYN (1969) não encontraram nenhum efeito no ponto de congelamento do leite, quando variaram o conteúdo de uréia (de 0 a 15 Kg/1000 Kg) de ração oferecida ao gado.

Segundo FONSECA (1986), é indubitável que uma deficiência quali e quantitativa na alimentação do gado, pode promover uma desnutrição geral no animal, em casos graves. Em casos mais leves, esta deficiência na alimentação pode alterar constituintes do leite, o que resulta na obtenção de um leite com ponto de congelamento mais baixo.

2.2.3. Lactação

As alterações dos componentes do leite que influenciam o ponto de congelamento variam durante o período normal da lactação (JENNES *et alli*, 1974).

Fica fora de questão o colostro e o leite proveniente de animais doentes. O colostro, leite das primeiras horas após o parto, possui maior concentração de proteínas e menor proporção de lactose, potássio, ácido pantotênico e água, em relação ao leite produzido numa fase posterior da lactação. Possui um ponto de congelamento mais baixo ($-0,551^{\circ}\text{C}$ a $-0,561^{\circ}\text{C}$) que o leite normal (JENNES & PATTON, citado por BRATHEN, 1983).

Também ficam excluídos, leites provenientes de úberes com mamite. Quando ocorre esta inflamação das mamas, diminui-se a porcentagem de gordura, sólidos não gordurosos, lactose e caseína, enquanto há um aumento da concentração de cloretos e proteínas do soro no leite. Com isso o ponto de congelamento de um leite proveniente de animais com mamite, terão valores cerca de $0,020^{\circ}\text{C}$ mais baixos que o normal (BRATHEN, 1983).

No período normal de lactação, presume-se que ocorra um ajuste osmótico no leite de tal forma que o ponto de congelamento mantém-se relativamente estável, apesar das variações nas concentrações dos componentes (FONSECA, 1986). Durante a lactação observa-se uma ligeira redução do teor de lactose e potássio, ao passo que aumentam os teores de fósforo, cálcio, magnésio, sódio e cloreto (BRATHEN, 1983; COSTA *et alli*, 1985).

DEMOTT *et alli* (1967), encontraram uma tendência de diminuição do ponto de congelamento após a 34ª semana do parto. No geral, os mesmos autores observaram pontos de congelamento mais altos entre a 27ª e 35ª semana de lactação.

Entretanto REES (citado por BRATHEN, 1983), encontrou pequenas variações no ponto de congelamento até a 28ª semana, tornando-se o mesmo constante após este período. Segundo COSTA *et alli* (1985), mesmo havendo variação no conteúdo de cloreto do leite entre a 8ª e a 24ª semana de lactação, não foi observada uma diferença significativa ($P \leq 0,05$) no ponto de congelamento do leite no mesmo período.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada no ponto de congelamento do leite, em função de variações relativas ao número de vacas/rebanho e a quantidade de leite produzido por ordenha (FREEMAN *et alli*, 1972).

BRATHEN (1983), observou uma tendência das amostras de leite, ordenhadas no período da tarde, terem pontos de congelamento mais baixos que o leite da manhã. Porém,

uma explicação simples para tal fato, torna-se difícil. Parece que a concentração de certos metabólitos no sangue podem alcançar um mínimo pela manhã, o que levaria a um ponto de congelamento mais alto neste período. Ao mesmo tempo, hábitos alimentares diurnos, colaboram para a diferença encontrada entre pontos de congelamento de leite obtido em diferentes períodos do dia, uma vez que a ingestão de alimentos é que regula os metabólitos do sangue e consequentemente do leite.

EISSES & ZEE (1980), encontraram diferença significativa entre os valores do ponto de congelamento do leite da manhã e da tarde. Os valores médios observados foram $-0,535^{\circ}\text{C}$ e $-0,543^{\circ}\text{C}$, respectivamente. ZEE *et alli* (1982), encontraram um ponto de congelamento médio do leite da manhã ($-0,532^{\circ}\text{C}$), cerca de $0,0072^{\circ}\text{C}$ mais alto que o da tarde ($-0,539^{\circ}\text{C}$).

Entretanto, HENNINGSON (1969) ressaltou que a diferença observada entre o ponto de congelamento do leite, obtido nas ordenhas da manhã e da tarde, na prática, não se mostra significativa. O mesmo autor cita, que em muitos casos, não é necessário amostras das duas ordenhas para se obter um valor seguro do ponto de congelamento do rebanho.

Outro fator que pode influenciar o ponto de congelamento de leites ordenhados em períodos diferentes do dia, é a disponibilidade de água aos animais (BRATHEN, 1983).

Segundo ASCHAFFENBRUG & ROWLAND (1950) a falta de água num longo período (noite) pode causar algum grau de desidratação nos animais e explicar a diferença entre os valores médios dos pontos de congelamento dos leites da manhã ($-0,555^{\circ}\text{C}$) e da tarde ($-0,525^{\circ}\text{C}$). Porém uma excessiva entrada de água, pela manhã, por poucos minutos, pode levar a uma grande secreção de água no leite da tarde, apresentando-se como que "aguado". Quando as vacas passam a ter o acesso à água durante o tempo todo, os pontos de congelamento do leite da manhã ($-0,546^{\circ}\text{C}$) e da tarde ($-0,553^{\circ}\text{C}$), voltam a apresentar valores próximos um do outro.

Portanto, se houver suspeitas de que os animais tiveram acesso limitado à água, ou se as amostras de leite foram colhidas durante um período de seca intensa, deve-se julgar os valores de ponto de congelamento com cautela. Provavelmente o leite terá um ponto de congelamento mais alto, quando tiver sido colhido de um animal ou de um rebanho que acabou de ter o acesso à água, após ter sido submetido a de um período de seca prolongado (FONSECA, 1986).

Quanto a influência do sistema de ordenha sobre o ponto de congelamento do leite, não há indicação de que o "stress" criado sobre o animal pelas tubulações das ordenhadeiras

mecânicas, por si só, exerça alguma influência sobre o ponto do congelamento do leite. Porém, existe a possibilidade de que a água residual de enxague ou de condensação sejam misturadas ao leite, podendo a instalação ser responsável pela elevação do ponto de congelamento (FONSECA, 1986).

2.2.4. Região

A maior fonte de variação no ponto de congelamento do leite é a localização geográfica dos rebanhos. Porém, não tem sido fácil medir estas diferenças, bem como a identificação das causas (MUSSENDEN *et alli*, 1977).

EISSES & ZEE (1980) e ZEE *et alli* (1982), estudando regiões distintas da Holanda, encontraram diferenças nos pontos de congelamento médio do leite entre $-0,539^{\circ}\text{C}$ e $-0,533^{\circ}\text{C}$, respectivamente, em função da localização dos rebanhos.

FREEMAN *et alli* (1972) e DEMOTT *et alli* (1967 e 1968) mostraram que embora hajam diferenças entre regiões distintas, estas podem ser atribuídas a práticas de manejo (alimentação, estação do ano e temperatura ambiente).

Segundo MUSSENDEN *et alli* (1977), não pode ser considerado que tenha havido uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) no ponto de congelamento do leite, entre 2 regiões distintas do Canadá, muito embora tenham ocorrido diferenças nos pontos de congelamento de rebanhos dentro de uma mesma região.

Da mesma forma, LOPES *et alli* (1982) não encontraram diferenças significativas entre 5 sub-regiões de Pernambuco. Entretanto CARVALHO (1977b), relatou que a média e o intervalo de variação da DPC variaram substancialmente em função da situação geográfica do rebanho estudado (Juiz de Fora-MG).

Leites provenientes de diferentes regiões do Estado de São Paulo, foram avaliadas por ROGICK (1946) e SAITO & SCHIFTAN (1973). O primeiro, encontrou para o ponto crioscópico, variações entre $-0,550^{\circ}\text{C}$ e $-0,570^{\circ}\text{C}$, enquanto que os segundos obtiveram como valor médio do índice crioscópico dos municípios de São Paulo, Jundiaí e Campinas o índice de $-0,538^{\circ}\text{C}$.

Segundo BIANCA (1965), temperaturas ambientais altas, diminuem o conteúdo de sólidos não gordurosos e lactose do leite, provocando como consequência, variação no

ponto de congelamento. Porém, a amplitude de variação é muito pequena e provavelmente tenha importância somente em climas tropicais e subtropicais.

É possível, que em zonas temperadas, as mudanças nas práticas de manejo do rebanho sejam mais importantes que o clima (BRATHEN, 1983).

Segundo REGAN & RICHARDSON (1938), depois de 24 h/35°C, as vacas produziram leites com pontos de congelamento 0,008°C mais altos, quando comparados com leites produzidos a 21°C. Isso foi confirmado por REES (1949) e DEMOTT (1966) que encontraram pontos de congelamento mais próximos de zero, quando a temperatura ambiente e umidade relativa eram altas.

Numerosas pesquisas relataram variações no ponto crioscópico do leite, às vezes de apenas alguns milésimos de graus, de amostras coletadas durante o verão e o inverno. Segundo BRATHEN (1983), as variações do ponto de congelamento não são sazonais por si só, parecendo existir maior correlação entre o ponto de congelamento e a alimentação, ingestão de água e os efeitos climáticos.

No hemisfério norte geralmente observa-se um menor ponto de congelamento do leite durante o inverno (POTTER & ARIMA, 1960). Tendência oposta foi encontrada em estudos no hemisfério sul (TUCKER, 1965). CLARCK (citado por DEMOTT, 1966) encontrou um ponto de congelamento mais alto nos dias mais quentes da primavera. Entretanto TUCKER (1990), observou uma tendência para um maior ponto de congelamento durante os meses mais frios do ano, devido possivelmente às pobres condições das pastagens.

Segundo EISSES & ZEE (1980) a estação do ano exerce pequena diferença no valor do ponto de congelamento. A maior diferença encontrada entre as quatro estações do ano foi de 0,0035°C.

2.2.5. Armazenamento

Só é possível manter o leite cru na fazenda por um ou dois dias, antes de enviá-lo para a usina de processamento ou submetê-lo às análises de rotina, caso este seja resfriado (DEMOTT & BURCH, 1966). O uso da refrigeração, se faz necessário devido à possibilidade do desenvolvimento de bactérias acidificantes do leite, as quais atuando sobre

a lactose, decompõe-na em ácido láctico, o que levará a uma diminuição do ponto de congelamento do leite (JOHNSON, 1974; WOLFSCHOON-POMBO & VARGAS, 1983), em cerca de 0,003°C para cada aumento de 0,01% de acidez (BAILEY, 1923).

Porém, com a refrigeração, ocorre a desgaseificação do leite. O dióxido de carbono é parcialmente convertido em ácido carbônico, que se ioniza. Os dois íons formados, atuam sobre o equilíbrio ácido carbônico-bicarbonato, influenciando de maneira direta o pH e a pressão osmótica e indiretamente o ponto de congelamento do leite, aumentando-o (BERG, 1979).

Embora não tenha sido relatada nenhuma variação significativa no ponto de congelamento do leite cru, quando estocado entre 1,5 e 3,5°C por 24 h (SHIPE, 1953) ou a 4,5°C por 36 h (SMITH, 1964), ZEE *et alli* (1982) observaram um aumento de 0,0015°C no ponto de congelamento do leite quando o mesmo permaneceu estocado à 4°C por uma noite. Informações semelhantes foram fornecidas por PINKERTON & PETERS (1956) e SHIPE (1959), os quais encontraram um aumento de 0,004°C no ponto de congelamento de leites estocados à 0°C por 24 horas e à 5°C durante 24-48 horas, respectivamente. Segundo os autores, a causa mais provável para o aumento do ponto de congelamento do leite, foi a desgaseificação do leite, principalmente pela perda de dióxido de carbono.

O congelamento do leite cru deve ser evitado, uma vez que promove no leite descongelado, um ponto crioscópico maior que aquele antes de congelar (HENDERSON, 1963). Faz-se necessário, interpretações cuidadosas dos resultados quando acidentalmente isso ocorrer (NEWLANDER, 1964).

Embora não seja recomendado, em algumas ocasiões, faz-se necessária a adição de conservadores às amostras de leite, de forma a se manter as características do leite inalteradas (RENTERGHEM *et alli*, 1975). Entretanto, o conservador adicionado diminui o ponto crioscópico, o qual pode mascarar ou compensar uma eventual elevação do valor do índice crioscópico, devido a adição criminosa ou involuntária de água no leite (WOLFSCHOON-POMBO & VARGAS, 1983).

2.3. Relação entre os pontos de congelamento expressos em graus Celsius e graus Hortvet

Em 1921, HORTVET desenvolveu um novo método crioscópico, visto que, os métodos até então empregados, necessitavam de padronização. O autor mostrou que a determinação do ponto crioscópico era uma medida empírica, onde os resultados eram dependentes da técnica usada. Por esta razão, deu uma descrição detalhada do aparelho e procedimento empregados em sua metodologia, e afirmou que o método era suficientemente seguro.

Usando um termômetro calibrado pela US BUREAU OF STANDARD (USA), HORTVET determinou que o ponto crioscópico das soluções de 7% e 10% de sacarose, eram $-0,422^{\circ}\text{C}$ e $-0,621^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Tais medidas passaram a servir de referência, para estas soluções, em termômetros de outros aparelhos (PANARI & ZANNONI, 1986).

Todavia estas temperaturas não são os pontos de congelamento verdadeiros (temperatura acima da qual o gelo não pode existir em equilíbrio com a solução) das soluções de sacarose de 7 a 10%. Representam os valores obtidos quando o crioscópio e a técnica de Hortvet são usados. O valor do ponto de congelamento verdadeiro de uma solução é obtido através de cálculos termodinâmicos, baseados nos mais recentes avanços da teoria de dissociação de eletrólitos. De acordo com essas determinações mais precisas, tem-se demonstrado que o abaixamento crioscópico é na realidade $-0,40746^{\circ}\text{C}$ e $-0,59968^{\circ}\text{C}$, respectivamente (PRENTICE, 1978).

Quando se deseja obter o ponto de congelamento verdadeiro de uma solução, o índice crioscópico deverá sofrer correções. Fatores como a temperatura da solução refrigerante, temperatura de convergência (resultado da taxa de remoção e introdução de calor), super-resfriamento, volume da amostra no tubo crioscópico, taxa de movimentação do agitador e um método de ajuste e observação da coluna de mercúrio são alguns dos fatores que interferem na determinação precisa do ponto de congelamento de uma amostra. Qualquer um destes fatores quando não obedecidos rigorosamente, de acordo com as técnicas citadas na literatura, não formarão o "plateau", onde se faz a medida do ponto de congelamento (CARVALHO, 1977a).

O uso do teste de Hortvet para determinar a quantidade de água no leite depende do reconhecimento que o ponto de congelamento observado, mantém uma relação constante com o ponto de congelamento verdadeiro da amostra. Não é possível confirmar tal hipótese para o leite, caracterizado por um sistema complexo solúvel, uma vez que não existem

dados precisos para isso. Porém, esta relação ocorre com as soluções de sacarose. Para o uso de soluções alternativas de calibração o crioscópio, esta mesma relação deve existir. O uso de instrumentos eletrônicos, também assume uma relação linear entre a temperatura observada e o ponto de congelamento verdadeiro da amostra. O valor numérico desta relação é irrelevante, uma vez que no processo de montar o aparelho, a escala é ajustada para indicar o valor teórico (Hortvet) do ponto de congelamento das soluções (PRENTICE, 1978).

Segundo SHIPE (1961), não há dúvidas de que o método crioscópico é válido, em termos práticos, para detecção de água em leite. É um método em que um analista pode obter resultados reprodutíveis e que valores semelhantes podem ser obtidos entre diferentes analistas, desde que sigam o mesmo procedimento.

A diferença entre os valores dos pontos de congelamento observados e verdadeiros, das soluções de sacarose, não é $0,199^{\circ}\text{C}$, mas sim, $0,192^{\circ}\text{C}$. Assim, todos os resultados da literatura obtidos pelo uso do crioscópio de Hortvet, não são pontos de congelamento verdadeiros, e são mais propriamente expressos em $^{\circ}\text{H}$ (HARDING, 1986).

Na Figura 2.1 são colocadas em confronto as escalas de temperatura Hortvet e centígrada, demonstrando as diferenças entre elas. As duas escalas não se correspondem quanto ao valor numérico, nem quanto ao intervalo das divisões (PANARI & ZANNONI, 1986).

A falta de correspondência entre as duas escalas, é $0,021^{\circ}\text{C}$ diferente num ponto da calibração, o que indica mais de 3% de água no leite (RICHARDSON, 1979). Desta forma, o método de Hortvet determina uma DPC 3,56% maior que o valor teórico (PRENTICE, 1978).

Considerando-se que os valores de $-0,422^{\circ}\text{C}$ e $-0,621^{\circ}\text{C}$ estavam em uso há mais de 40 anos, e a modificação desses, para $-0,408^{\circ}\text{C}$ e $-0,600^{\circ}\text{C}$, poderia causar uma certa confusão, a maioria das indústrias de leite conservou os primeiros números como válidos (FONSECA, 1986).

A escala centígrada foi substituída por uma escala relativa, chamada escala "Hortvet", onde as amostras de 7% e 10% de sacarose, passaram a serem identificadas como $-0,422^{\circ}\text{H}$ e $-0,621^{\circ}\text{H}$, antes $^{\circ}\text{C}$ (LIGUGNANA, 1979).

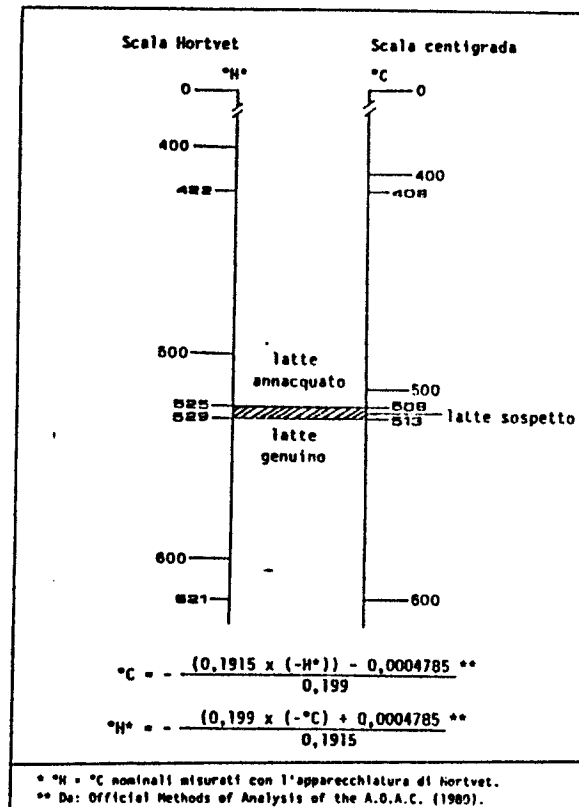


Figura 2.1. Comparação das escalas de temperatura obtidas com aparelho de Hortvet e a escala centígrada

Na literatura encontra-se muita confusão quanto à denominação da escala de temperatura, em que a determinação é feita. A maioria dos crioscópios atuais são calibrados, para leituras em °H muito embora os resultados sejam expressos em °C (PACKARD & GINN, 1979).

Porém, se o método de calibração é dado, é possível corrigir os resultados de um para o outro, e HARDING (1986) propôs as seguintes transformações:

$$T_c = 0,9656 T_h$$

$$T_h = 1,0356 T_c$$

onde T_c = ponto de congelamento em °C

T_h = ponto de congelamento em °H

Entretanto, RICHARDSON (1979) recomendou que os graus Hortvet sejam trocados definitivamente por graus Celsius nos métodos oficiais para prevenir dificuldades na interpretação dos resultados. Esta mesma sugestão foi dada por outros autores (PACKARD & GINN, 1979; AOAC, 1984).

Na dificuldade de se determinar a DPC ou ponto de congelamento verdadeiro do leite, CARVALHO (1977a) sugeriu a obtenção do valor aparente destas medidas, através de condições padronizadas, para que os resultados de diferentes regiões e laboratórios sejam comparáveis (CARVALHO, 1977b).

2.4. Legislação e Padrões

Em 1923, a A.O.A.C. baseada nos estudos de BAILEY (1922), tomou como média do ponto crioscópico do leite o valor de $-0,550^{\circ}\text{C}$, com 3% de tolerância ($-0,534^{\circ}\text{C}$) estabelecendo o valor limite superior de $-0,535^{\circ}\text{C}$, para amostras de leite sem adição de água (SAITO & SCHIFTAN, 1973). Esta tolerância era permitida em casos, onde a média do ponto de congelamento da área analisada era mais alta que $-0,550^{\circ}\text{C}$ (ROBERTSON, 1957a).

Desde então, a média do ponto de congelamento do leite sofreu algumas alterações, dado por vários fatores que podem influenciá-lo. MAC DONALD (1948) encontrou média de $-0,543^{\circ}\text{C}$, enquanto DAHLBERG (citado por SAITO & SCHIFTAN, 1973) relatou o valor de $-0,540^{\circ}\text{C}$. Já ROBERTSON (1957a), determinou o valor de $-0,530^{\circ}\text{C}$, sendo este aceito pela A.O.A.C., como valor limite oficial do ponto de congelamento do leite, para amostras livres de água, até 1960.

Considerando que o método é trabalhoso e demorado, este passou a ser utilizado somente para confirmação, principalmente quando o conteúdo de sólidos não gordurosos, calculados por densidade e teor de gordura, pela fórmula de Fleischmann, indicavam a presença de água (MAC DONALD, 1948; EISSES & ZEE, 1980).

Apesar do método de Hortvet ser universalmente aceito como padrão para determinação do ponto de congelamento, numerosas modificações ocorreram no aparelho, no sentido de simplificar o procedimento e aumentar a precisão (SHIPE, 1961).

Baseado nestas alterações do aparelho, outros valores foram determinados. JURGENS (1983) encontrou o valor de $-0,530^{\circ}\text{C}$, como sendo padrão para 100 produtores da Alemanha. Para diferentes regiões da Hungria, foram obtidos resultados diferentes. KISS & UZONYI, (1984), trabalhando na região de Hâdju, observaram que o ponto de congelamento médio, deveria ser pelo menos de $-0,530^{\circ}\text{C}$, sendo o limite superior estipulado entre $-0,520^{\circ}\text{C}$ e $-0,525^{\circ}\text{C}$. UNGER *et alli* (1991) encontraram o valor médio de $-0,533^{\circ}\text{C}$, com valores variando de $-0,521^{\circ}\text{C}$ a $-0,546^{\circ}\text{C}$. Em 1977, o STANDARD INSTITUTION OF ISRAEL, determinou o valor de $-0,530^{\circ}\text{C}$, como médio para o ponto de congelamento do leite.

Entretanto FREEMAN & BUCY (1967) avaliando cinco áreas diferentes de Kentucky (USA), encontraram como ponto de congelamento médio o valor de $-0,540^{\circ}\text{C}$. EISSES & ZEE (1980) obtiveram a média de $-0,539^{\circ}\text{C}$, para sete regiões diferentes da Holanda. Valores mais baixos ainda ($-0,545^{\circ}\text{C}$) e mais altos ($-0,512^{\circ}\text{C}$) também foram encontrados pelo KENYA BUREAU OF STANDARD (1976) e LUCK (1984), na África do Sul, respectivamente.

Internacionalmente são mais accitas as seguintes interpretações: onde o ponto de congelamento é menor que $-0,535^{\circ}\text{C}$, o leite é considerado livre de água; em casos onde o ponto crioscópico estiver entre $-0,534^{\circ}\text{C}$ e $-0,530^{\circ}\text{C}$, o produtor é avisado para checar sua fazenda. Se o valor do ponto de congelamento estiver entre $-0,529^{\circ}\text{C}$ e $-0,525^{\circ}\text{C}$, há uma forte probabilidade de ter havido fraude por aguagem, e finalmente se o ponto de congelamento for igual ou menor que $-0,525^{\circ}\text{C}$, o leite está certificadamente adulterado com água (HARDING, 1990).

No caso de misturas de leite, as variações individuais, bem como entre rebanhos são canceladas para dar uma composição média ao leite, onde valores extremos do ponto de congelamento, causados por adição de água, são difíceis de serem detectadas. Isso não quer dizer que, todas as amostras recebidas em latões, necessariamente estavam dentro dos

parâmetros legais, quando os mesmos eram analisados separadamente (MAC DONALD, 1948).

No Brasil, a primeira referência, a respeito do ponto crioscópico do leite, é fornecida pelos "Métodos e Padrões de Análises do Leite - Bacteriológicas e Químicas", publicado em 1929 pela Inspetoria do Policiamento de Alimentação Pública, do Serviço Sanitário do Estado de São Paulo, sendo estes baseados nos STANDARD METHODS OF AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1929), que exigiam para o ponto crioscópico o valor de $-0,550^{\circ}\text{C}$ com 3% de tolerância (PANETTA *et alli*, 1985).

Em 1939, o Regulamento do Policiamento Sanitário da Alimentação, estabeleceu para o ponto crioscópico do leite valores entre $-0,540^{\circ}\text{C}$ a $-0,570^{\circ}\text{C}$. Em 1946, houve uma alteração no mesmo regulamento, no qual passou a vigorar o ponto crioscópico mínimo de $-0,540^{\circ}\text{C}$ para o leite (SAITO & SCHIFTAN, 1973).

Somente em 1951, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) estabelecia um ponto crioscópico mínimo de $-0,550^{\circ}\text{C}$ (SAITO & SCHIFTAN, 1973). Este mesmo padrão foi mantido no novo regulamento do RIISPOA de 1952 e na modificação introduzida em 1962. Em 24 de Abril de 1980 (BRASIL, 1980), a nova portaria da Secretaria de Inspeção de Produto Animal, determinou o índice crioscópico entre $-0,530^{\circ}\text{C}$ e $-0,550^{\circ}\text{C}$ (PANETTA *et alli*, 1985).

Atualmente esta portaria foi mantida para o leite tipo "C" especial (3,2% de gordura), no entanto a portaria de 24/06/84, da Secretaria de Inspeção de Produto Animal (BRASIL, 1984), alterou os parâmetros para a análise de leite tipo "B" para $-0,550^{\circ}\text{C}$ com tolerância de $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$, admitindo-se até $-0,535^{\circ}\text{C}$ para leites individuais, desde que haja comprovação de que o manejo e sistema de alimentação estejam corretos (PANETTA *et alli*, 1985).

Todas as modificações do ponto crioscópico do leite no Brasil foram realizadas tomando-se por base determinações experimentais de outros países, onde diversas pesquisas sobre o ponto crioscópico do leite têm sido divulgadas (SAITO & SCHIFTAN, 1973).

No Brasil, são poucos os estudos referentes à crioscopia do leite. ROGICK (1946), SAITO & SCHIFTAN (1973) e PANETTA *et alli* (1985), trabalhando com amostras provenientes do Estado de São Paulo encontraram valores entre $-0,550^{\circ}\text{C}$ e $-0,570^{\circ}\text{C}$, e $-0,535^{\circ}\text{C}$, respectivamente, para o ponto de congelamento do leite. Valor de $-0,540^{\circ}\text{C}$ foi obtido por COSTA *et alli* (1985) em Goiânia, enquanto que CARVALHO (1977b) encontrou $-0,551^{\circ}\text{C}$ como valor médio para o índice crioscópico do leite em Minas Gerais.

Em cuidadosa revisão bibliográfica realizada por CARVALHO (1977b), o autor enfatiza a necessidade de trabalhos nacionais sobre a questão da crioscopia de leite no Brasil, já que as discussões sobre este assunto no país, têm sido baseadas quase que exclusivamente em dados estrangeiros.

A maioria dos autores parece concordar com a necessidade de se estabelecerem valores regionais para o ponto de congelamento do leite, tendo em vista a existência de fatores interferentes sobre o mesmo (PANETTA *et alli*, 1985). Desta forma, ROBERTSON (1957b), relatou que é adequado, não estabelecer nenhum valor único, para o ponto de congelamento e/ou para média, para ser aplicado de uma forma geral para um determinado país.

Na tentativa de assegurar interpretações coerentes dos resultados, cada região deveria estabelecer, a média e o percentual de tolerância próprios. Segundo VELDEN *et alli* (1984), o critério legal do ponto de congelamento para leite de vaca individual não é tão relevante. Por outro lado, um valor médio por fazendeiro é necessário, principalmente para prevenir quantidades inaceitáveis de água adicionada ao leite.

Sem um valor pré-determinado, produtores e processadores de leite, podem estar sujeitos a um padrão injusto, consumidores podem não estar seguros quanto à qualidade do produto e os laboratórios oficiais não terão um valor com o qual eles possam trabalhar com confiança e segurança (HENNINGSON, 1969).

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

3.1.1. Pontos de amostragem

3.1.1.1. Plataforma

As amostras de leite tipo "B" foram coletadas "in situ", na presença do pesquisador, seguindo-se o procedimento habitualmente utilizado pelas plataformas de recebimento. O leite dos latões, identificados por números do produtor, foram primeiramente homogeneizados com agitador apropriado. Em seguida, a coleta da amostra representativa, se deu em vasilhame de aproximadamente 300 ml, tomando-se pequenas alíquotas de cada um dos latões do produtor de interesse.

3.1.1.2. Fazendas

3.1.1.2.1. Tanque de resfriamento

O leite da manhã, tarde e/ou mistura, devidamente resfriado à 4–5°C, foi homogeneizado (entre 2 e 3 minutos), previamente à retirada da amostra.

3.1.1.2.2. Latões

Quando a fazenda não possuía tanque de resfriamento, volumes iguais do leite da ordenha da manhã e da tarde, foram misturados em um latão de 50 l, e após homogeneização, realizada a amostragem.

3.1.1.2.3. Animais

A coleta foi realizada na presença do pesquisador, manualmente e diretamente da teta da vaca, no terço médio da ordenha.

3.1.2. Acondicionamento das amostras

As amostras de leite foram acondicionadas em garrafas de vidro, de 250 ml de capacidade, com tampa de rosca, que permitia boa vedação. As garrafas foram previamente higienizadas através de lavagem com água fria e quente e sabão, e secas em estufa à 80°C por 1 h.

As amostras foram mantidas sob refrigeração (aproximadamente +10°C), em um isopor com gelo, desde a coleta até o momento da análise. O tempo decorrido entre a retirada e a análise da amostra, não foi superior a 3 horas (WOLFSCHOON-POMBO & VARGAS, 1983).

3.2. Crioscopia de gado holandês

3.2.1. Comparação dos pontos de congelamento entre amostras coletadas na fazenda e na plataforma, de rebanhos na região de Campinas

Partindo-se do objetivo de se caracterizar o ponto de congelamento de rebanhos produtores de leite tipo "B", constituídos por animais da raça holandesa preto e branco e uma pequena porcentagem de holandês vermelho e branco, foram relacionados seis produtores na região de Campinas-SP, cuja produção diária variava de 220 a 2100 litros de leite por dia.

Amostras do mesmo produtor foram retiradas na fazenda e na plataforma de beneficiamento de leite, na tentativa de se eliminar qualquer suspeita de adulteração. As amostras foram analisadas através de crioscopia eletrônica, em duplicata.

3.2.2. Pontos de congelamento do leite de rebanhos na região de Taubaté

Avaliação semelhante foi realizada com seis rebanhos produtores de leite tipo "B", constituídos por animais da raça holandesa preto e branco, da região de Taubaté-SP, com produção diária de 200 a 1800 litros por dia. Foram coletadas amostras de conjunto do leite da manhã e tarde, bem como amostras de misturas (leite da manhã e da tarde). As análises foram realizadas através de crioscopia eletrônica, em duplicata.

3.2.3. Avaliação dos pontos de congelamento do leite coletado das fazendas A, C e F, da região de Campinas

Na região de Campinas foram escolhidas as fazendas A, C e F, para dar continuidade aos trabalhos de avaliação, visando um maior detalhamento nas comparações obtidas até então.

Essas três fazendas, além de pertencerem ao mesmo grupo, isto é, não mostrarem diferença entre si, foram as que apresentaram melhores condições de trabalho para coleta de um grande número de amostras.

Foram avaliadas leites de conjunto da manhã e tarde e amostras de leite de mistura, no inverno e no verão.

Avaliando a influência do estágio de lactação dos animais, no ponto de congelamento do leite, os rebanhos A, C e F foram divididos em lotes. O lote I foi composto por animais com menos de três meses de lactação, o lote II de 3 a 7 meses e o lote III, reuniu animais com mais de 7 meses. As coletas foram feitas individualmente por animal, usando-se da mesma metodologia das etapas anteriores. Sempre que foi possível, utilizou-se no verão, os mesmos animais do inverno.

3.3. Soluções padrão

3.3.1. Preparo das soluções padrão

A preparação das soluções padrão seguiu-se conforme as recomendações do OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (A.O.A.C., 1984) e Manual de; Reagentes e Solventes - Padronização Preparação e Purificação (MORITA & ASSUNÇÃO, 1972). Utilizou-se água destilada recém fervida e resfriada à 20°C para a dissolução dos sais.

Foram preparadas soluções de sacarose a 7 e 10%, tomando-se o cuidado de secar o reagente em estufa por 1 h à 80–90°C, antes do preparo das soluções.

Também foram preparadas soluções de biftalato de potássio 3%, o qual foi também previamente seco em estufa à 110–120°C por 30 minutos.

Devido à grande higroscopicidade do cloreto de sódio, antes do preparo da solução à 8,5%, este foi desidratado em mufla à 300°C por 1h.

3.3.2. Soluções padrão comerciais

Para a calibração dos crioscópios eletrônicos, foram utilizadas soluções padrão fornecidas pela Cooperativa Paulista de Laticínios de São Paulo – SP.

As soluções padrões comerciais X, Y e Z foram avaliadas através de crioscopia manual.

3.3.3. Avaliação das soluções padrão

3.3.3.1. Determinação dos pontos de congelamento de soluções padrão comerciais

Foi realizado um estudo com soluções padrão encontradas no comércio, para a calibração do crioscópio eletrônico, determinados através de crioscopia manual, no Laboratório de Leite da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) – UNICAMP.

As soluções da marca X vieram intituladas como –0,422 e –0,621, sem nenhuma especificação de grau; a Y apresentou suas soluções em graus Hortvet (°H) e a Z, simplesmente com as denominações 424, 530 e 621.

3.3.3.2. Determinação dos pontos de congelamento das soluções de sacarose 7 e 10%

Avaliação semelhante a anteriormente citada, foi feita através de crioscopia manual, com soluções de sacarose 7 e 10%, previamente preparadas no Laboratório da FEA.

3.3.3.3. Determinação dos pontos de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%

Dada a não reprodução dos valores nominais das soluções padrão comerciais e de sacarose, através de crioscopia manual, tentou-se reproduzir padrões a partir dos sais já comumente usados para crioscopia, adotando metodologia simples e prática, no que se refere ao preparo e estocagem.

Atenção especial foi dada às condições de armazenamento das soluções padrão, as quais foram estocadas à temperatura ambiente e sob refrigeração por 8 (oito) meses.

Considerando-se a necessidade de funcionalidade em um laboratório de análise, procurou-se determinar concentrações, nas quais as soluções poderiam ser estocadas por um período de tempo, e quando requeridas fossem facilmente diluídas. Pretendeu-se ainda, que as mesmas, após diluição, tivessem pontos de congelamento ao redor de 550 ($-0,550^{\circ}\text{C}$), valor este considerado pela legislação vigente, como valor médio do leite

Para o biftalato de potássio, o máximo de concentração obtido foi de 5,8%, embora o valor próximo de $-0,550^{\circ}\text{C}$ fosse 3%. Presumiu-se que seria incoerente elaborar uma solução, somente ao dobro de sua concentração, visto que os erros que possivelmente pudessem ser inseridos com a diluição fossem muito mais desastrosos que o preparo de uma nova solução, ficou estabelecido a concentração de 3% para o biftalato de potássio.

O cloreto de sódio é um sal que possui uma grande solubilidade, porém determinou-se que 8,5% era ideal, já que quando exatamente diluído a 1/10 de sua concentração, obteve-se o ponto de congelamento próximo do mencionado, através de uma concentração de NaCl 0,85%.

3.3.3.4. Determinação do ponto de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%, por diferentes analistas

Solução de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 8,5% foram preparadas no Laboratório da FEA e enviadas a outros 8 (oito) pesquisadores, os quais através de crioscópios manuais diferentes, do tipo FRITZKER, seguiram a mesma metodologia até então usada, para a determinação do ponto de congelamento.

A solução de NaCl 8,5% foi diluída a 1/10 de sua concentração (0,85%) no local da análise, pelo próprio analista, pouco antes da análise da solução. A solução de biftalato de potássio 3% não sofreu diluição.

O resultado do pesquisador 1, refere-se a dados obtidos no Laboratório da FEA.

3.3.3.5. Estudo de armazenamento das soluções padrão de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%

Procurando-se analisar os efeitos do armazenamento sobre as soluções padrão de biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%, as mesmas foram mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração e analisadas através de crioscopia manual.

3.3.3.6. Comparação das soluções padrão de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%, analisadas através de crioscopia manual e eletrônica

Tentando-se estabelecer a diferença do ponto de congelamento real e nominal das soluções de biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%, foi realizada uma comparação destas soluções através de crioscopia manual e eletrônica.

3.3.3.7. Determinação da curva de aguagem do leite

Baseado na linearidade dos resultados das soluções, foi feita uma curva através de crioscopia eletrônica, onde concentrações de 1 a 10% de água foram acrescentadas ao leite.

3.4. Determinação do ponto de congelamento do leite

3.4.1. Crioscopia eletrônica

O crioscópio eletrônico utilizado na análise das amostras de leite e das soluções padrão, foi da marca LAKTRON, modelo 312L, da Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas (CLC).

Inicialmente 2,5 ml de amostra foi colocado no tubo crioscópico de vidro e este imerso através de um braço mecânico e automático, em um banho refrigerante.

A amostra foi constantemente agitada através de uma haste mecânica, cuja intensidade de vibração foi regulada para 6 mm.

O banho refrigerante composto por álcool e água (1:1), foi mantido entre -7 e -8°C , durante todo o período das análises. Num período de 3 (três) minutos, o banho refrigerante retirava calor da amostra até o superesfriamento da solução onde, através da vibração mecânica da haste, formava-se gelo. Com a liberação do calor de fusão, a temperatura subia até um "plateau", onde por meio de um visor digital, podia-se fazer a leitura do ponto de congelamento da solução em questão.

Para a calibração do aparelho usou-se de soluções padrão de bifalato de potássio, identificadas como 424, 530 e 621. Essas foram fornecidas pela Cooperativa Paulista de Laticínios de São Paulo (Cooperativa Central), à qual a Cooperativa CLC estava associada.

3.4.2. Crioscopia manual

3.4.2. Crioscopia manual

O crioscópio manual utilizado neste trabalho foi do tipo FRITZKER.

Num frasco de Dewar (adiabático) com capacidade para 2000 ml, foi colocado o banho refrigerante, formado de gelo triturado e sal (NaCl) e o tubo crioscópico.

O banho refrigerante foi constantemente agitado por uma haste de metal, no sentido de homogeneizar o resfriamento, principalmente ao redor do tubo crioscópico.

No tubo crioscópico de vidro, além da amostra (± 80 ml), havia uma haste para agitação e um termômetro de mercúrio, no qual se realizou a leitura do ponto de congelamento. A agitação oferecida pela haste, evitava o congelamento da amostra nas bordas do vidro. O termômetro variava de $+2$ à -3 C, com uma sensibilidade de $0,01^{\circ}\text{C}$.

Mantido a -7 e -8°C , o banho refrigerante abaixava a temperatura da amostra até o superesfriamento, num período que variava de 3 a 5 minutos. Após esse período, o ponto de congelamento podia ser lido, através do menisco do termômetro de mercúrio onde permanecia por ± 1 a 2 minutos.

As análises foram realizadas em duplicatas.

3.5. Análise estatística

Todos os resultados referentes ao ponto de congelamento, seja das soluções bem como das amostras de leite, foram multiplicados por -1000 , no sentido de facilitar a confecção das tabelas, como também o próprio entendimento, visto que não é coloquial interpretações de números negativos. Dentro das Cooperativas essa linguagem é normalmente utilizada, embora os resultados sejam expressos através de números negativos. As análises estatísticas dos dados foram feitas em microcomputador, através do programa SAS (versão 6.01).

De acordo com o modelo experimental empregado, a influência de cada um dos fatores estudados sobre o ponto de congelamento do leite, foi avaliada através de Análise de Variância (ANOVA) e testes de média (TUKEY – $p \leq 0,05$). Médias e desvios padrão foram também calculados e expressos em tabelas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação das soluções padrão

4.1.1. Determinação dos pontos de congelamento das soluções padrão comerciais

A Tabela 4.1 mostra os pontos de congelamento de soluções padrão encontradas no comércio, para a calibração do crioscópio eletrônico, determinadas através de crioscopia manual.

Os resultados das duplicatas das soluções apresentaram-se coerentes, não havendo nenhum caso de discrepância maior que $0,020^{\circ}\text{C}$, sendo esta variação considerada normal, até mesmo pela legislação vigente que permite tal variação no ponto de congelamento do leite ($-0,550^{\circ}\text{C} \pm 0,01$). No entanto, todos os resultados ficaram acima dos valores nominais das soluções.

O padrão nominal 621, da solução Z, apresentou o maior distanciamento do valor real médio, encontrado para essa solução (35 pontos em média). Essa discrepância entre o valor real e o nominal das soluções não pode ser atribuído à variabilidade inerente da metodologia empregada, uma vez que os desvios padrão encontrados para cada uma das soluções não excederam 7,90.

As soluções X, não apresentaram variação constante nas duas soluções. Já as soluções Y e Z tiveram magnitudes de variação semelhantes entre as soluções analisadas, apresentando desvios padrão que variaram de 4,08 a 6,52. No entanto, a magnitude da variação não foi constante entre soluções de mesma graduação, de marcas diferentes.

Estes resultados sugerem que os valores reais das soluções, não correspondem aos valores nominais das mesmas.

Tabela 4.1- Pontos de congelamento de soluções padrão comerciais, para calibração do crioscópio eletrônico, determinados através de crioscopia manual, e expressos em °C.

Marca das Soluções Padrão	Valores Nominais das Soluções		
	424	530	621
X	420	-	625
	425		630
	425		635
	425		640
	430		645
Média e desvio padrão	425(3,53)		635(7,90)
Y	440	555	
	440	555	
	445	560	
	445	560	
	445	560	
	450	565	
	450	570	
Média e desvio padrão	445(4,08)	560(5,34)	
Z	440	550	650
	450	550	650
	450	555	660
	450	560	660
	455	565	660
Média e desvio padrão	447(5,48)	556(6,52)	656(5,48)

(1) Valores nominais indicam °C para as soluções X, Y e Z

4.1.2. Determinação dos pontos de congelamento de soluções de sacarose 7 e 10%

Os resultados da avaliação das soluções de sacarose 7 e 10%, estão apresentados na Tabela 4.2.

A magnitude da variação dos dados, apresentou-se na segunda casa decimal, na ordem de 0,010 a 0,015, semelhante à variação encontrada nas soluções comerciais. Todos os resultados, em média, ficaram 23 pontos acima do esperado.

Tabela 4.2- Pontos de congelamento das soluções de sacarose 7 e 10%, através de crioscopia manual e expressos em °C.

Valor nominal das soluções	Concentração solução de sacarose	Pontos de Congelamento
-0,422 C	7%	440
		440
		445
		445
		450
		Média e desvio padrão
		444(4,18)
-0,621 C	10%	640
		640
		650
		650
		655
		Média e desvio padrão
		647(6,71)

De forma semelhante ao ocorrido com relação ao ponto de congelamento das soluções padrão comerciais para calibração do crioscópio eletrônico, os valores nominais das soluções padrão de 7 e 10% de sacarose, afastaram-se dos valores reais das soluções, conforme determinação por crioscopia manual. A discrepância entre os valores nominais e reais não pode ser atribuída à baixa precisão ou metodologia de crioscopia manual, uma vez que os desvios padrão referentes a cada solução não excederam 6,71.

4.1.3. Avaliação das soluções de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%

4.1.3.1. Determinação do ponto de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%, por diferentes analistas

O ponto de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%, determinado por diferentes analistas estão expressos na Tabela 4.3.

O resultado do pesquisador 01, refere-se a dados obtidos no Laboratório de Leite da FEA - UNICAMP.

Tabela 4.3- Pontos de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%, realizado por diferentes analistas, através de crioscopia manual e expressos em °C

Analistas	Biftalato de potássio 3%	NaCl 0,85%
1	545	545
2	530	550
3	550	550
4	560	540
5	560	550
6	530	545
7	530	550
8	550	550
9	530	530
Média e desvio padrão	543(13,02)	545(6,43)
Coefficiente de variação	2,40	1,18

Os baixos valores obtidos para os coeficientes de variação da solução de biftalato de potássio 3% (2,40) e cloreto de sódio 0,85% (1,18), relativos às leituras fornecidas por diferentes analistas e diferentes crioscópios, sugerem a boa repetibilidade da metodologia empregada, descaracterizando que a referida metodologia apresenta alto grau de imprecisão.

4.1.3.2. Estudo de armazenamento das soluções padrão de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%

As Figuras 4.1 e 4.2 mostram o efeito do armazenamento sobre o ponto de congelamento da solução de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%, respectivamente, armazenadas à temperatura ambiente e sob refrigeração.

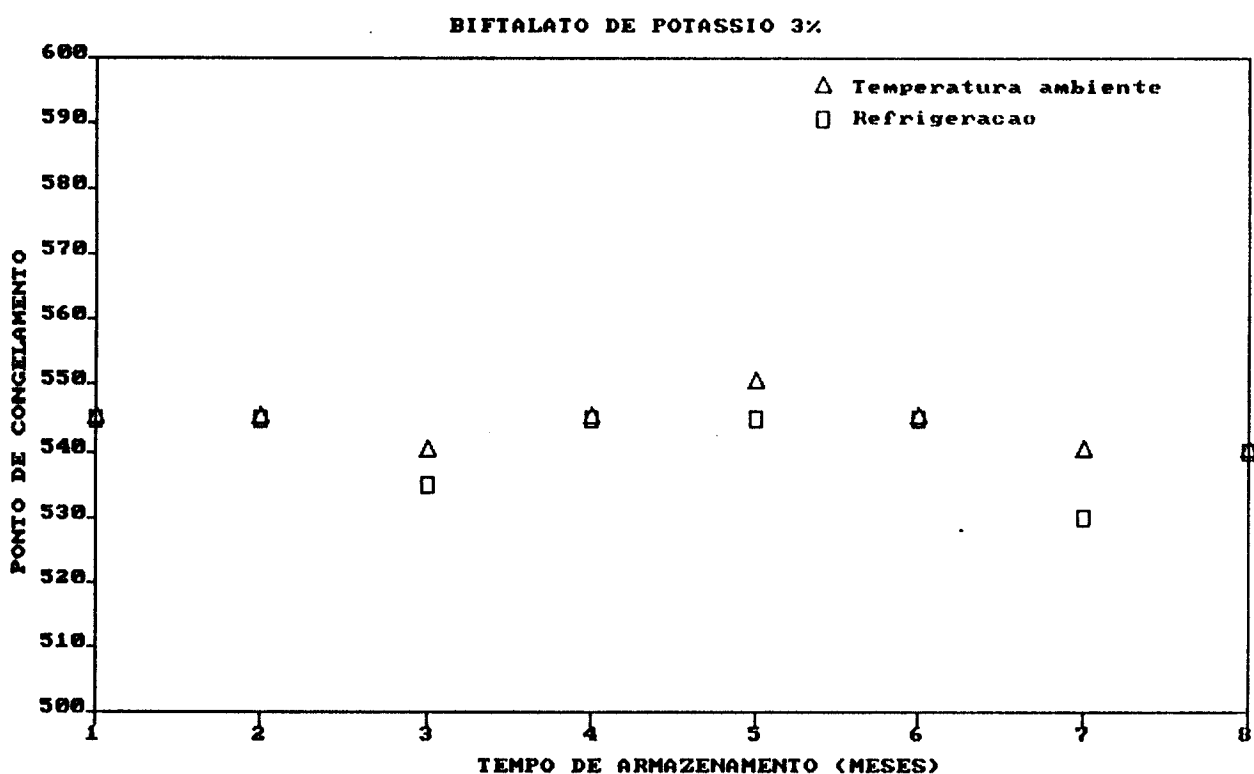


Fig. 4.1- Efeito do armazenamento sobre o ponto de congelamento da solução de biftalato de potássio 3%, armazenada à temperatura ambiente e sob refrigeração

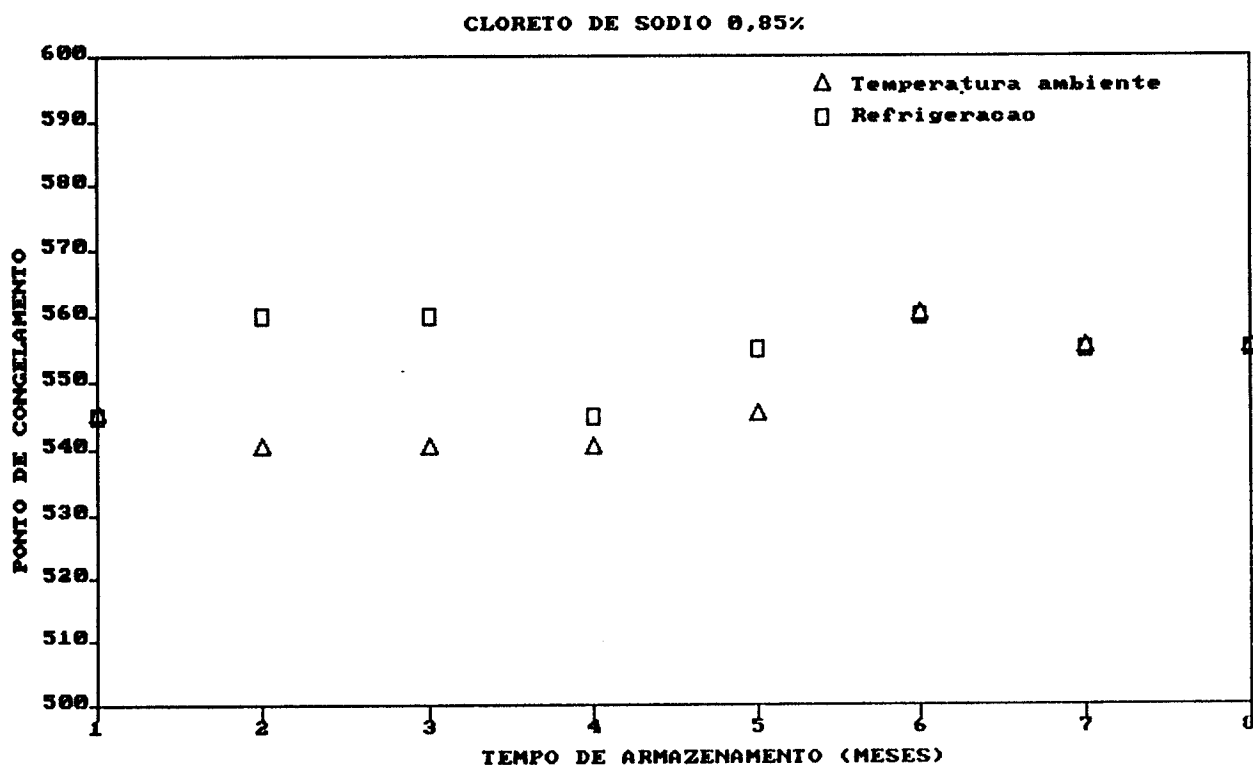


Figura 4.2- Efeito do armazenamento sobre o ponto de congelamento da solução de cloreto de sódio 0,85%, armazenada à temperatura ambiente e sob refrigeração

Os dados mostram que o armazenamento da solução de biftalato de potássio 3%, tanto à temperatura ambiente como sob refrigeração, não modificou o ponto de congelamento da solução, uma vez que não foi encontrada uma correlação entre esses dois parâmetros. Uma pequena alteração do ponto de congelamento da solução ocorreu após o 6º mês de armazenamento, havendo uma diminuição do mesmo, considerando-o numericamente, indicando assim a estabilidade da solução frente ao armazenamento refrigerado.

Resultados semelhantes foram obtidos com a solução de cloreto de sódio 0,85%. Muito embora tenha ocorrido uma variação de 0,01°C após o 5º mês de armazenamento à temperatura ambiente e 0,015°C sob refrigeração, depois de trinta dias, não foi encontrada correlação entre as condições de armazenamento da solução e o ponto de congelamento da mesma. A solução de cloreto de sódio 0,85%, mostrou-se mais afastada do valor de -0,550°C, principalmente quando submetida à refrigeração.

De acordo com os resultados obtidos, é viável recomendar a estocagem da solução de biftalato de potássio 3% por 6 (seis) meses no máximo, e a solução de cloreto de sódio 0,85%, por 5 (cinco) meses, tanto sob refrigeração como ou à temperatura ambiente

4.1.3.3.Comparação das soluções padrão de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%, analisadas através de crioscopia manual e eletrônica

Os pontos de congelamento referentes às soluções padrão de biftalato de potássio 3% e cloreto de sódio 0,85%, obtidos através de crioscopia manual e eletrônica, encontram-se na Tabela 4.4.

De uma forma geral, pode-se observar que ocorreu uma maior variabilidade dos resultados quando a análise foi feita através de crioscopia manual (desvio padrão médio de 4,02), caracterizando uma vez mais a menor precisão do método. Tal fato não ocorreu com a crioscopia eletrônica, a qual forneceu um desvio padrão médio igual a 1,46.

Tabela 4.4-Pontos de congelamento das soluções de biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%, analisadas através de crioscopia manual e eletrônica e expressos em °C

Biftalato de potássio 3%		Cloreto de sódio 0,85%	
Crioscopia	Crioscopia	Crioscopia	Crioscopia
Manual	Eletrônica	Manual	Eletrônica
545	546	545	553
550	543	540	554
550	544	540	554
545	546	540	554
545	545	545	551
540	548	555	554
545	543	545	553
545	545	545	553
545	542	550	554
540	542	545	554
Média e desvio padrão	545(3,33)	544(1,95)	546(4,71)

Uma maior equivalência nas leituras obtidas pelos dois métodos, ocorreu com relação às soluções de biftalato de potássio, onde as médias apresentaram-se bastante próximas (545,0 e 544,4). Na solução de cloreto de sódio, a diferença entre as médias ficou em 0,007°C. Pela dificuldade no manuseio do cloreto de sódio, devido à sua alta higroscopicidade, é recomendável que se utilize o biftalato de potássio para a preparação de soluções padrão para crioscopia.

Dentro da experiência e dos dados obtidos, tudo indica que o correto seria definirmos uma solução padrão preparada a partir de reagentes confiáveis, facilmente encontrados no comércio nacional e tomar como base a leitura crioscópica obtida em termômetro de precisão comumente adotadas nos crioscópio manuais disponíveis no nosso mercado. Somente assim, entendemos que os valores encontrados possam ser reproduzíveis pelos vários laboratórios.

4.1.4.Determinação da curva de aguagem do leite

Na Figura 4.3 é apresentado o estudo de correlação entre a porcentagem de água adicionada ao leite e o respectivo ponto de congelamento, determinado por crioscopia eletrônica.

O alto coeficiente de determinação ($R^2=0,99$) evidencia a boa linearidade existente entre o ponto de congelamento do leite e a porcentagem de água adicionada ao mesmo. Esses resultados mostram que o ponto de congelamento do leite é um parâmetro seguro para detectar pequenas adições de água no produto, independente do valor absoluto do ponto de congelamento que se tenha para o leite garantidamente normal.

Em concordância com os resultados reportados por SHIPE (1961), os resultados obtidos no presente estudo, validam o método crioscópico na detecção de fraude por aguagem de leite.

Entretanto, a falta de um sistema de calibração que seja reproduzível por diferentes laboratórios e/ou analistas, dificulta a comparação interlaboratorial dos resultados, que poderão diferir em valores absolutos como função das soluções de calibração e técnicas laboratoriais.

Quanto ao crioscópio eletrônico, a sua calibração depende dos valores definidos pelo termômetro de precisão do crioscópio manual, uma vez que o mesmo somente mede valores relativos após ser devidamente calibrado. Daí a importância da definição e devida correção da discrepância observada na crioscopia manual.

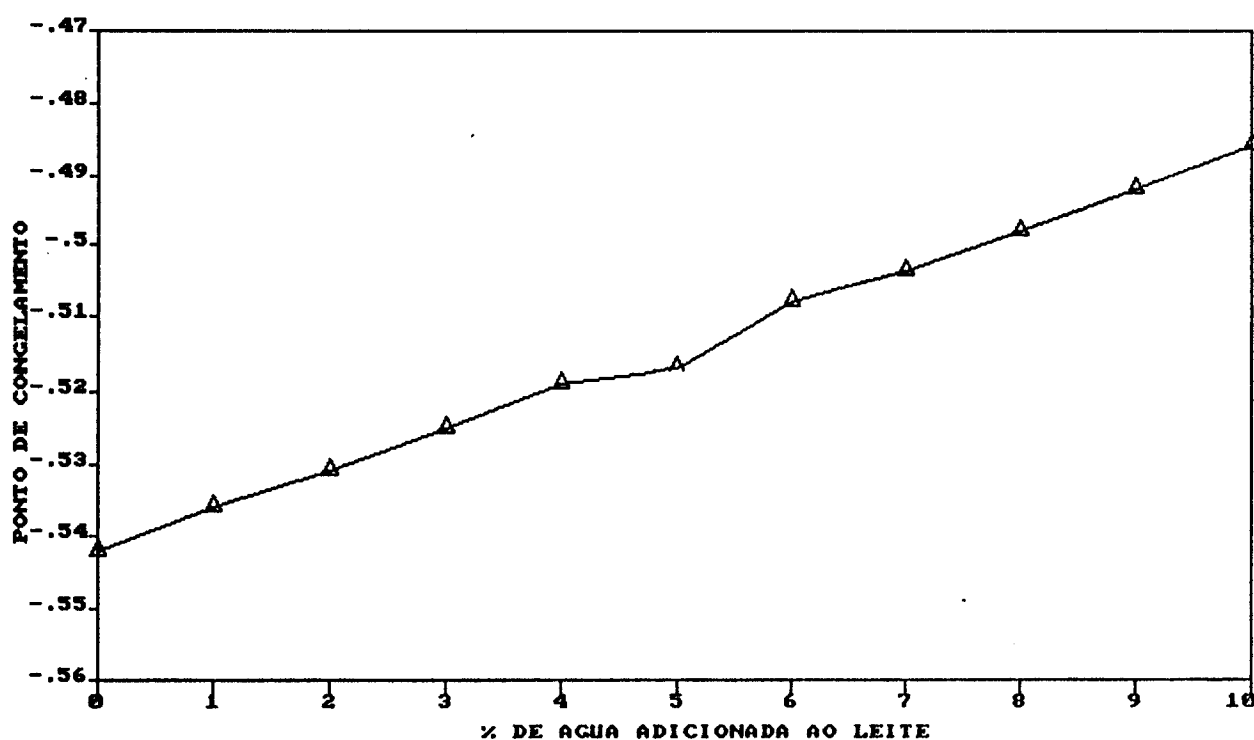


Figura 4.3- Regressão linear entre a porcentagem de água adicionada ao leite e o ponto de congelamento, determinada por crioscopia eletrônica ($y = -0,542 + 0,0055 x$, $p \leq 0,05$)

4.2.Crioscopia de gado holandês

4.2.1.Comparação dos pontos de congelamento entre amostras coletadas nas fazendas e plataforma, de rebanhos da região de Campinas

Os resultados da avaliação dos pontos de congelamento de leites coletados na região de Campinas, estão relacionados na Tabela 4.5. São apresentados um total de 132 dados provenientes de 22 amostras dos seis rebanhos em um período de três semanas. Das 22 amostras coletadas em cada rebanho, 11 delas foram retiradas na própria fazenda e outras 11 retiradas da mesma produção do dia, envolvendo a ordenha da tarde, misturada com a da manhã, tão logo chegava à plataforma da usina de pasteurização.

Comparando-se os resultados obtidos nas amostras retiradas na fazenda com os resultados correspondentes nas amostras retiradas na plataforma (Tabela 4.5), observa-se uma nítida tendência dos pontos de congelamento das amostras coletadas na plataforma serem ligeiramente menor, numericamente falando, do que os obtidos nas amostras coletadas diretamente na fazenda. De fato, a análise estatística dos dados (ANOVA) indicou que médias globais, 540,65 na fazenda e 539,41 na plataforma, apresentaram diferença significativa ao nível 0.001. Entretanto quando os resultados foram estatisticamente analisados a nível de rebanhos, individualmente, não foi detectada nenhuma diferença significativa ($p \leq 0,05$).

A menor média global, nos dados da plataforma é um fato a salientar. Tal ocorrência pode ser devida à desgaseificação do leite, quando sob refrigeração. BERG (1979) e ZEE *et alli* (1982), encontraram aumentos de 0,004 a 0,015°C respectivamente, no ponto de congelamento do leite, quando este era estocado à 4-5°C por 24 h. Entretanto, tais resultados não concordam com as observações de SHIPE (1953) e SMITH (1964), os quais não observaram nenhuma variação significativa em condições semelhantes de armazenamento.

Tabela 4.5 - Pontos de congelamento de amostras de leite coletadas nas fazendas e plataforma, da região de Campinas, analisadas através de crioscopia eletrônica

Amostras	Local ⁽¹⁾	Rebanhos						Média
		A	B	C	D	E	F	
1	a	539	536	543	546	541	542	541,2
	b	539	536	542	548	540	542	541,2
2	a	540	540	539	550	543	545	542,8
	b	540	538	543	547	541	545	542,3
3	a	540	536	545	550	541	544	542,7
	b	541	538	546	546	541	544	542,7
4	a	544	536	542	548	543	546	543,2
	b	540	534	541	550	540	544	541,5
5	a	541	540	547	551	540	542	543,5
	b	542	53	542	548	541	543	542,5
6	a	534	534	539	546	539	537	538,2
	b	536	534	539	542	538	535	537,3
7	a	535	535	539	545	539	538	538,5
	b	535	531	536	543	536	535	536,0
8	a	540	533	538	543	539	543	539,3
	b	537	531	535	545	535	539	537,0
9	a	537	536	543	548	539	543	541,0
	b	538	536	537	544	537	538	538,3
10	a	534	535	539	545	539	537	538,2
	b	536	535	539	543	539	536	538,0
11	a	535	536	539	545	539	538	538,7
	b	536	532	536	544	536	536	536,7
Média	a	538	536	541	547	540	541	540,6
	b	538	535	540	545	538	540	539,4

(1) Local de coleta: a= amostras coletadas na fazenda; b= amostras coletadas na plataforma

Ao serem comparados os rebanhos, através das amostras coletadas na fazenda, o rebanho D apresentou crioscopia significativamente mais elevada em relação aos demais e o B, a crioscopia mais baixa (Tabela 4.6). Os outros quatro rebanhos constituíram um grupo homogêneo, mesmo com algumas diferenças entre eles. Quanto à variabilidade dos dados por amostra dentro de cada rebanho, os mesmos variaram diferentemente, conforme pode ser observado através dos respectivos desvios padrão representados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Médias e desvios padrão dos pontos de congelamento do leite dos seis rebanhos da região de Campinas, analisadas através de crioscopia eletrônica.

Rebanhos	Média ⁽¹⁾	Desvio Padrão
D	547,00 ^a	2,56
F	541,36 ^b	3,29
C	541,18 ^b	2,99
E	540,18 ^{bc}	1,60
A	538,09 ^{cd}	3,30
B	536,09 ^d	2,16
Média	540,66	2,65

(1) Médias apresentando letra(s) em comum, não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$), conforme determinado pelo teste de TUKEY.

Os desvios padrão variaram de 1,60 a 3,30, sendo que no geral, o valor absoluto mais baixo foi 533 e o mais elevado 551, tomando como base os 66 dados das amostras da fazenda. O desvio padrão médio dessa amostras foi igual a 2,65. Entre os diferentes dias, houve diferença significativa à nível 0.001.

De uma forma geral, esse resultados confirmam que o efeito da variabilidade fisiológica dos animais no ponto de congelamento do leite é grande e deve ser levada em consideração no estabelecimento e comparação e resultados, com o padrão legal atualmente vigente em todo o país.

4.2.2. Pontos de congelamento de rebanhos da região de Taubaté

A Tabela 4.7 apresenta os resultados relativos a seis rebanhos produtores de leite tipo "B", situados na região de Taubaté - SP. Os valores expressos na referida tabela, representam um total de 144 amostras coletadas nas seis fazendas, envolvendo as ordenhas da manhã, da tarde e o leite de mistura, representando a produção diária de cada rebanho, por um período de três semanas, em diferentes dias de amostragem.

Conforme pode ser observado na Tabela 4.7, as amostras de leite de mistura apresentaram uma média global de 534,66, enquanto que as médias por rebanho variaram de 532,37 a 539,00. Análises estatísticas indicaram que o rebanho B apresentou crioscopia mais elevada, diferenciando-se significativamente ao nível de significância de 0,05 (Tabela 4.8), dos rebanhos E, A e C. Os demais rebanhos não mostraram diferenças significativas entre si ao nível de 5% de significância.

Tabela 4.7- Pontos de congelamento do leite da manhã, tarde e mistura, coletadas em fazendas de Taubaté-SP, e analisadas através de crioscopia eletrônica

Amostras	Local ⁽¹⁾	Rebanhos						Média
		A	B	C	D	E	F	
1	a	536	539	531	536	546	532	536,6
	b	540	529	529	539	537	539	535,5
	c	541	533	532	537	540	535	536,3
2	a	535	549	536	540	537	535	538,7
	b	531	529	531	533	525	544	532,2
	c	535	541	534	535	530	535	535,0
3	a	527	544	534	530	542	531	534,7
	b	525	533	539	534	530	538	533,2
	c	529	537	539	532	532	534	533,8
4	a	538	545	531	538	544	531	537,8
	b	529	542	536	534	531	539	535,2
	c	533	543	536	533	534	534	535,5
5	a	532	543	525	535	540	533	534,7
	b	531	535	528	534	526	542	532,7
	c	527	541	526	536	534	540	534,0
6	a	539	544	532	536	533	533	536,2
	b	533	536	529	538	529	539	534,0
	c	536	540	531	539	532	535	535,5
7	a	534	545	526	535	540	533	535,5
	b	529	533	530	534	525	536	531,2
	c	531	538	531	536	533	537	534,3
8	a	533	543	530	535	539	531	531,3
	b	530	532	531	535	530	539	532,8
	c	531	539	530	535	533	535	533,8
Média	a	534	544	531	536	540	532	536,2
	b	531	534	531	535	529	539	533,2
	c	533	539	532	535	533	536	534,7

(1) Local de coleta: a= amostras de conjunto do leite da manhã; b= amostras de conjunto de leite da tarde; c= amostras de mistura (leite da manhã e da tarde).

Tabela 4.8 - Médias e desvios padrão dos pontos de congelamento do leite de mistura, de seis rebanhos da região de Taubaté, analisadas através de crioscopia eletrônica

Rebanhos	Média⁽¹⁾	Desvio Padrão
B	539,00 ^a	3,07
F	535,62 ^{ab}	1,99
D	535,37 ^{ab}	2,20
E	533,50 ^b	2,92
A	532,87 ^b	4,42
C	532,37 ^b	3,96
Média	534,66	2,82

(1) Médias apresentando letra(s) em comum, não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Com relação à variabilidade dos dados obtidos com o leite de mistura, estes foram semelhantes aos observados na região de Campinas, exceto pelo fato do rebanho A ter apresentado um desvio padrão relativamente alto, comparado ao desvio padrão médio, que foi igual a 2,82 (Tabela 4.8). O valor mais baixo para o ponto de congelamento foi 526 e o mais alto 543 (Tabela 4.7).

A análise estatística (ANOVA) dos valores crioscópicos obtidos para as amostras das ordenhas da manhã e da tarde (médias de 536,2 e 533,2) (Tabela 4.7), indicaram que existem diferenças significativas ($p \leq 0,001$) entre pontos de congelamento do leite, em função do período do dia da ordenha.

Observando-se essas mesmas médias dentro de cada rebanho (Tab. 4.7), nota-se nitidamente a tendência da ordenha da manhã ser mais elevada que a da tarde. Entretanto, somente nos rebanhos B e E essa diferença foi confirmada estatisticamente, sendo que nos rebanhos C e F houve inversão nessa tendência.

As diferenças observadas entre a ordenha da manhã e da tarde, podem ter sido devidas ao manejo do rebanho. Hábitos alimentares diurnos, juntamente com a ingestão de água pela manhã, pode levar à uma secreção maior de água no leite da tarde (FONSECA, 1986).

4.2.3. Comparação dos pontos de congelamento das amostras coletadas em Campinas e Taubaté

Ao compararmos as regiões de Campinas e Taubaté no que se refere às médias globais, 540,65 (Tabela 4.5) e 534,66 (Tabela 4.7) das amostras de leite de mistura coletadas na fazenda, vamos encontrar uma diferença bastante significativa ($p \leq 0,001$). isto é, 5,28 vezes a diferença significativa mínima (1,1053), estabelecendo uma diferença entre as duas regiões de 99% ($P \leq 0.001$). Um aspecto importante evidenciado por este estudo, foi o valor médio bastante baixo na região de Taubaté, envolvendo valores individuais tão baixos quanto 526.

A Tabela 4.9 apresenta uma comparação entre médias e desvios padrão dos pontos; de; congelamento de leite provenientes das regiões de Taubaté e Campinas.

Tabela 4.9- Médias e desvios padrão dos pontos de congelamento do leite de mistura, nas regiões de Campinas e Taubaté, analisadas através de crioscopia eletrônica

Rebanhos	Média(1)	Desvio Padrão
Dc	547,00 ^a	2,56
Fc	541,36 ^b	3,29
Cc	541,18 ^b	2,99
Ec	540,18 ^b	1,60
Bt	539,00 ^{bd}	3,07
Ac	538,09 ^{bd}	3,30
Bc	536,09 ^{cd}	2,16
Ft	535,62 ^{cd}	1,99
Dt	535,73 ^{cd}	2,20
Et	533,50 ^c	2,92
At	532,87 ^c	4,42
Ct	532,37 ^c	3,96
Média	537,75	2,87

t= rebanhos da região de Taubaté ;c= rebanhos da região de Campinas

(1) Médias apresentando letra(s) em comum, não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

As médias por rebanho, variaram de 532,38 a 547,00, permitindo um agrupamento central (grupo D), envolvendo 2 rebanhos da região de Campinas e 3 de Taubaté, com médias variando de 535,73 a 539,00, os quais não se distinguiram estatisticamente.

Muito embora todos os rebanhos utilizados neste trabalho sejam compostos de um grande número de animais puro por origem (p.o.) haviam alguns animais puro por cruz (p.c.), chegando a ser encontrado animais 7/8 de holandês. A porcentagem destes últimos era maior em Taubaté que em Campinas, levando a um ponto de congelamento mais baixo.

Tendência semelhante foi encontrada por PANETTA *et alli* (1985), os quais supuseram que quanto mais puro fosse o animal, maior seria a possibilidade de encontrar pontos de congelamento mais elevados, em relação aos animais mestiços.

No entanto os rebanhos mostraram-se homogêneos, demonstrando que a diferença se estabeleceu devido às médias e desvios padrão, quando comparados por região, separadamente. No momento em que os dados foram avaliados como um todo, a diferença diminuiu, estabelecendo-se uma maior homogeneidade. Portanto faz-se necessário cuidadosas interpretações quando se faz comparação de resultados de diferentes regiões dentro do país e fora dele.

Além disso, os rebanhos de Taubaté recebiam uma alimentação rica em grãos, principalmente em milho, o que pode ter contribuído para a diminuição do ponto de congelamento do leite, considerando-o numericamente. Segundo SHIPE *et alli* (1953) pode haver uma diferença de 0,007 a 0,010°C, quando a ração fornecida ao gado, for mais rica em grãos.

4.2.4. Comparação dos pontos de congelamento entre amostras das ordenhas da manhã, tarde e mistura, das fazendas A, C e F, da região de Campinas, durante o inverno e o verão

O resultado da avaliação dos pontos de congelamento do leite, das fazendas A, C e F da região de Campinas, estão apresentados na Tabela 4.10. São apresentados um total 132 dados, envolvendo as ordenhas da manhã, da tarde e a produção diária correspondente à mistura das duas ordenhas.

As três fazendas foram amostradas por um período de 08 semanas no inverno, totalizando 90 amostras, e durante o verão por um período de 05 semanas, num total de 42 amostras, todas retiradas na própria fazenda.

Analisando-se os dados da Tabela 4.10, estes forneceram uma média global de 543,24 e um desvio padrão de 3,57, enquanto que a média para o inverno foi de 542,99 e 543,48 para o verão. Se considerarmos somente o leite de mistura, ou seja, a produção diária por rebanho, a média para o inverno foi igual a 542,67 e para o verão 543,33, enquanto que o desvio padrão foi 3,06.

Tabela 4.10- Pontos de congelamento do leite das ordenha da manhã, tarde e mistura, das fazendas A, C e F, da região de Campinas, durante o inverno e o verão, em diferentes dias e analisadas através de crioscopia eletrônica

Amostras	Local ⁽¹⁾	INVERNO			VERÃO		
		A	B	C	A	B	C
1	a	549	538	540	-	542	536
	b	546	544	548	549	549	546
	c	548	547	545	-	545	537
2	a	543	547	538	539	542	549
	b	546	543	543	541	537	549
	c	543	542	540	542	541	547
3	a	544	540	538	541	550	541
	b	549	545	544	544	546	546
	c	544	545	543	545	550	541
4	a	538	541	546	539	549	542
	b	543	551	551	544	549	-
	c	543	544	546	543	538	541
5	a	538	543	541	541	549	538
	b	545	543	546	546	535	543
	c	542	543	542	541	551	542
6	a	538	541	543			
	b	544	545	548			
	c	539	545	545			
7	a	534	542	542			
	b	540	544	543			
	c	538	542	541			
8	a	538	542	539			
	b	545	544	556			
	c	537	543	546			
9	a	533	540	540			
	b	544	545	549			
	c	538	544	542			
10	a	538	542	540			
	b	542	545	548			
	c	540	541	544			
Média	a	539	542	541	540	546	541
	b	544	545	550	545	543	546
	c	541	544	543	543	545	542
Média geral			543,24			543,48	
Média global							543,24
Desvio padrão							3,57

(1) Local de coleta: a= amostras de conjunto da ordenha da manhã; b= amostras de conjunto da ordenha da tarde; c= amostras de leite de mistura (leite da manhã e da tarde).

Não houve diferença significativa entre rebanhos, no inverno nem no verão ($P \leq 0.05$). Não houve também, diferença significativa entre as duas estações.

As maiores variações do ponto de congelamento do leite entre estações são observadas no hemisfério norte, onde devido ao intenso frio, há uma mudança radical no manejo do gado, principalmente com relação à alimentação (POTER & ARIMA, 1960). No Brasil, as estações são trocadas, sem que no entanto seja observada diferenças grandes no clima a ponto provocar alterações nas práticas de manejo do gado. Nas regiões pesquisadas, não houve modificação no tratamento dos rebanhos, durante o inverno e verão, principalmente no que diz respeito à alimentação, estabulação e ingestão de água.

Com relação às ordenhas, foi confirmado a diferença significativa entre a ordenha da manhã e da tarde ($P \leq 0.001$), onde esta apresenta crioscopia mais elevada, havendo porém uma exceção quando a comparação foi feita por fazenda dentro de cada estação, onde o rebanho C no verão inverteu essa tendência, embora a diferença não tenha sido significativa.

Tais resultados não concordam com os de BRATHEN (1983), que indicaram uma tendência inversa com relação às ordenhas em diferentes períodos do dia. Entretanto os mesmos estão de acordo com dados encontrados por EISSES & ZEE (1980) e ZEE *et alli* (1982), os quais encontraram pontos de congelamento mais altos, para leites ordenhados no período da tarde.

Uma simples explicação para tal fato é difícil de ser dada, uma vez que além da grande variabilidade que cada animal apresenta, ainda podemos ter influência do manejo. Na região estudada, a alimentação do gado era efetuada imediatamente antes das ordenhas, sendo o acesso à água, livre todo o tempo. Além disso, a produtividade por animal na ordenha da manhã era maior, sendo o leite mais diluído que na ordenha da tarde.

Na Figura 4.4., pode ser observada a distribuição dos valores dos pontos de congelamento de leite de conjunto das ordenhas da manhã e tarde, e leite de mistura, das Fazendas A, C e F, no inverno. Distribuição semelhante foi feita com os dados do verão (Figura 4.5)

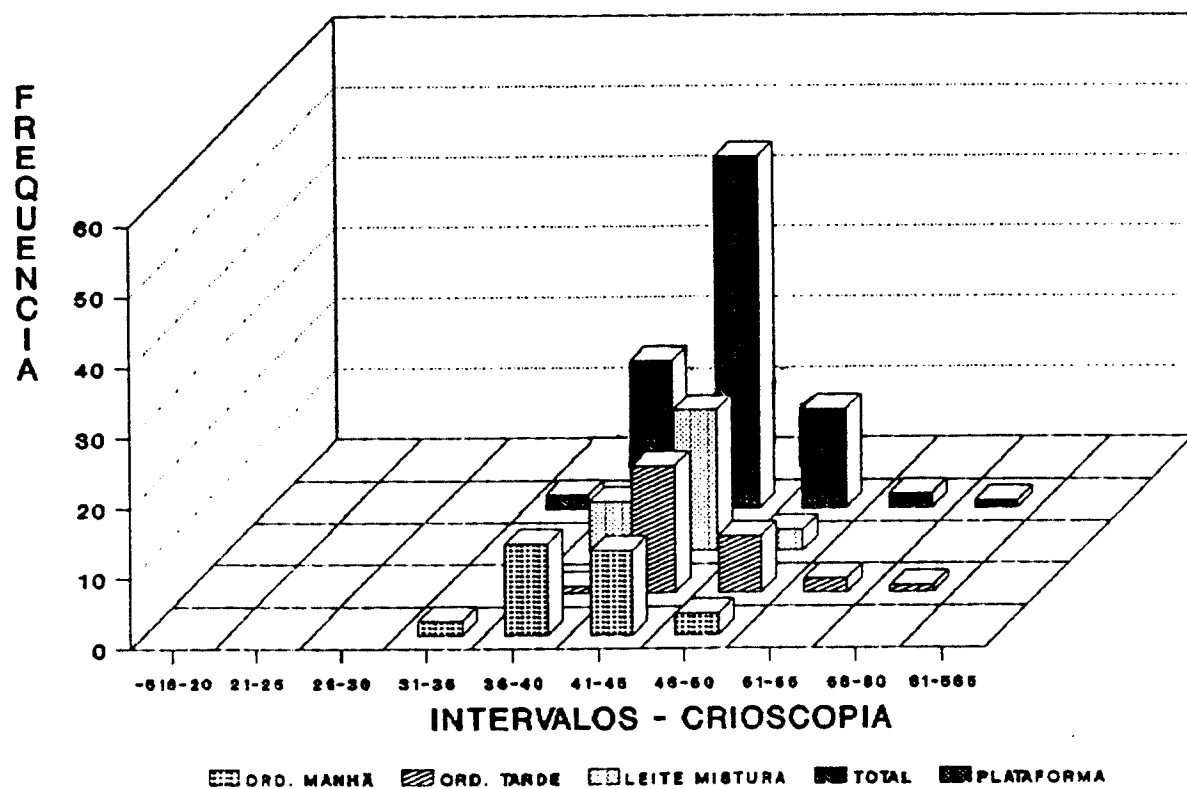


Figura 4.4. Distribuição dos valores dos pontos de congelamento do leite das ordenhas da manhã, tarde e mistura, das fazendas A, C e F, da região de Campinas, durante o inverno.

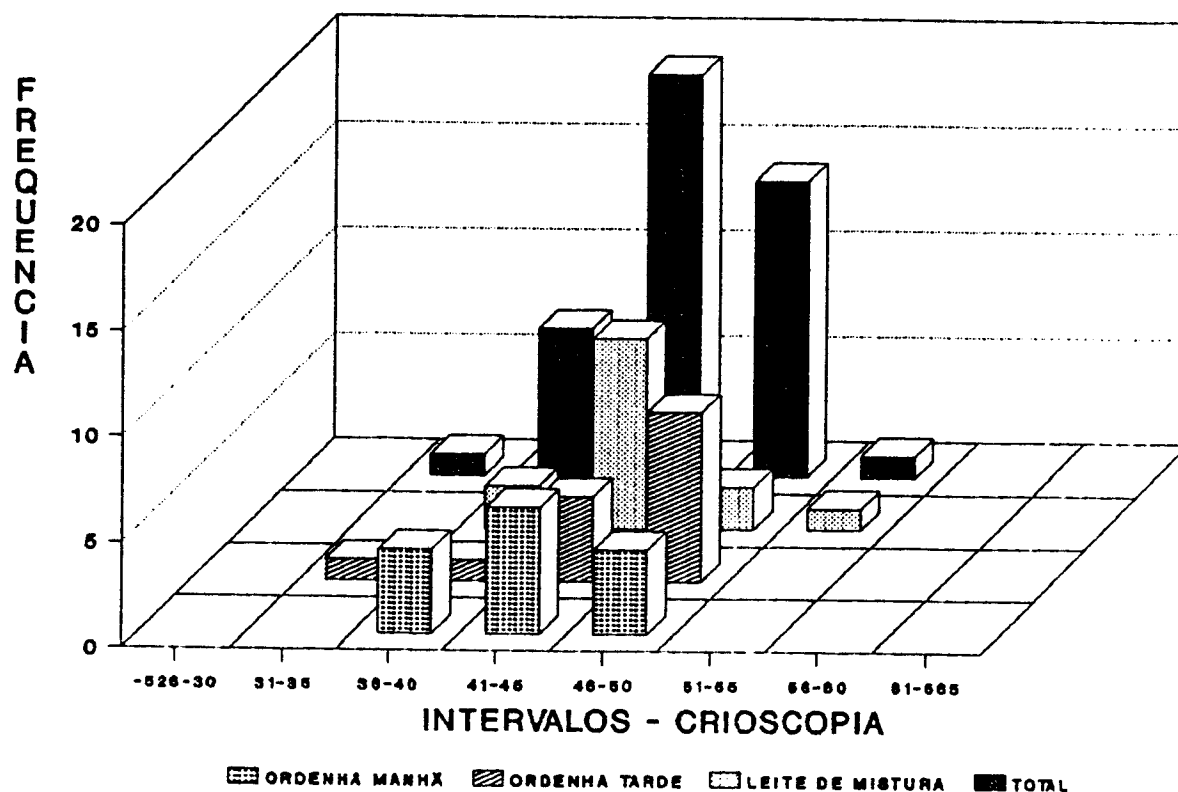


Figura 4.5. Distribuição dos valores dos pontos de congelamento do leite das ordenhas da manhã, tarde e mistura, das fazendas A, C e F, da região de Campinas, durante o verão

A tendência da distribuição dos dados, foi a mesma nas duas estações, para todas as amostras. Através das figuras, fica claro que o ponto de congelamento do leite é uma medida fisiológica, que obedece a uma distribuição normal. Os valores máximos encontrados foram entre 541 e 545. A base da curva foi larga, com valores variando de 533 a 556, sendo que os valores de 541 a 545, apareceram com maior frequência.

4.2.5. Comparação dos pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, das fazendas A, C e F, da região de Campinas durante o inverno e o verão

Os resultados do estudo de comparação dos pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, das fazendas A, da região de Campinas, durante o inverno e verão, estão apresentados na Tabela 4.11 e 4.12, respectivamente.

A Fazenda A apresentou média geral de 544,92, sendo que a média para o inverno foi de 544,62 e verão 545,21, com desvios padrão, de 2,81 e 1,69, respectivamente. Embora tenha ocorrido variabilidade entre os animais (desvios padrão de 4,65 à 6,25), nos diferentes dias de amostragem, não foi observada nenhuma diferença significativa entre eles, nas duas estações.

Quando os lotes foram comparados dentro de cada estação, ou seja, dentro de cada tabela, pode-se notar que os desvios padrão variaram de 5,43 a 6,25 no inverno e 4,65 a 6,05 no verão, confirmando que a variabilidade dos dados dentro de cada lote, foi semelhante à aquela observada entre animais.

O lote III diferiu dos demais, tanto no inverno como no verão, indicando assim que animais no terço final de lactação (mais de 7 meses) apresentam crioscopia mais elevada.

Quanto aos dias de amostragem, ao serem comparadas entre si como um todo, houve diferença significativa ($P \leq 0,05$), entretanto ao serem comparado nos diferentes lotes, não foi encontrado o mesmo resultado.

Os dados das Tabelas 4.13 e 4.14, traduzem os resultados de animais em diferentes estágios de lactação da Fazenda C, obtidos no inverno e no verão, respectivamente. Através deles pode-se observar que as médias para inverno (542,3) e verão (545,4), ficaram próximas da Fazenda A (544,6 e 545,2), porém com variabilidade entre os animais. Tal fato pode ser confirmado pelos desvios padrões de 4,60 e 3,13, respectivamente. O menor ponto de congelamento encontrado foi 527, enquanto o maior foi 560.

Considerando os dados por estação, não foi encontrado diferença significativa entre os diferentes lotes ($P \leq 0,05$), bem como entre os dias de amostragem ($P \leq 0,05$).

Nas Tabelas 4.15 e 4.16 estão registrados os dados dos pontos de congelamento do leite de animais em diferentes estágios de lactação, da Fazenda F, nas duas estações. De todas as fazendas, a F apresentou a menor média global (542,36), sendo a média geral de inverno 542,33 e a de verão 542,40. A variabilidade dos dados entre os animais foi no mesmo nível que as outras fazendas (desvio padrão de 4,29 e 5,60).

Tabela 4.11- Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na Fazenda A, da região de Campinas, durante o inverno e analisadas através de crioscopia eletrônica

Lotes ⁽¹⁾ Animais		Crioscopia Eletrônica Coleta em diferentes dias										Média p/ animal
I	1	547	548	551	550	547	545	543	540	546	546	546,3
	2	534	531	543	535	538	532	527	538	538	541	535,7
	3	553	540	550	546	544	552	539	541	540	538	544,3
	4	535	533	543	534	535	540	542	538	540	533	537,3
	Média dp ⁽²⁾	542	538	547	541	541	542	538	539	541	539	540,9 6,25
II	5	541	548	548	539	549	538	527	543	548	538	541,9
	6	539	549	535	552	547	558	550	551	546	543	547,0
	7	556	556	546	548	546	542	543	546	548	543	547,4
	8	547	546	548	543	538	542	540	542	537	536	541,9
	9	544	541	547	546	536	547	545	548	543	548	544,0
III	10	546	547	550	548	547	541	540	543	549	549	546,0
	Média dp	544	548	546	546	544	545	541	545	544	543	544,8 5,43
	11	554	550	550	551	545	548	549	550	548	551	549,6
	12	553	545	547	540	544	542	540	550	543	539	544,3
	13	556	548	553	550	553	549	546	554	539	544	549,2
III	14	553	560	538	540	539	544	546	546	546	541	545,3
	15	550	555	554	556	556	545	538	539	536	539	546,7
	16	547	551	549	541	549	547	546	552	552	545	547,9
	Média dp	552	551	548	546	548	546	544	548	544	543	547,2 5,59
	Média Global											544,3
	Desvio Padrão											2,81

(1) Lote I= animais com até 3 meses de lactação; lote II= animais de 3 a 7 meses de lactação; lote III= animais com mais de 7 meses de lactação.

(2) dp=desvio padrão

Tabela 4.12- Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na Fazenda A, da região de Campinas, durante o verão e analisadas através de crioscopia eletrônica

Lotes⁽¹⁾	Animais	Crioscopia Eletrônica					Média
		Coleta em diferentes dias					p/ animal
I	17	557	553	546	553	555	552,8
	18	558	530	555	546	547	547,2
	19	550	549	551	550	548	549,6
	20	550	542	547	547	549	547,0
	Média dp ⁽²⁾	554	543	550	549	549	549,0 6,05
II	21	544	546	542	544	546	544,4
	22	544	534	537	539	537	538,2
	23	552	532	547	543	545	543,8
	24	544	540	542	542	543	542,0
	Média dp	546	538	542	542	543	542,1 4,65
III	25	550	552	545	550	548	549,0
	26	558	539	545	546	548	547,2
	3	550	542	547	545	547	546,2
	27	547	546	547	545	546	545,6
	28	541	541	546	542	544	542,8
	29	538	535	538	538	536	537,0
	Média dp	547	542	545	544	545	544,3 5,06
Média Global							545,2
Desvio Padrão							1,69

(1) Lote I= animais com até 3 meses de lactação; lote II= animais de 3 a 7 meses de lactação; lote III= animais com mais de 7 meses de lactação.

(2) dp=desvio padrão

Tabela 4.13- Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na Fazenda C, da região de Campinas, durante o inverno e analisadas através de crioscopia eletrônica

Lotes ⁽¹⁾	Animais	Crioscopia Eletrônica										Média
		Coleta em diferentes dias										p/ animal
I	1	543	535	536	542	539	541	540	533	542	535	538,6
	2	539	541	550	545	535	535	538	536	539	546	540,4
	3	541	541	533	536	549	548	538	536	534	538	539,4
	4	536	536	540	542	538	546	538	547	544	551	541,8
	5	-	-	-	540	540	544	544	542	538	536	541,8
	Média dp ⁽²⁾	540	538	540	541	540	543	540	539	539	541	540,6 4,57
II	6	533	544	534	539	534	531	-	536	543	536	536,7
	7	553	555	544	543	549	557	553	556	554	555	551,9
	8	546	546	546	539	544	534	547	555	550	545	545,2
	9	537	539	535	528	543	534	541	533	537	535	536,2
	10	545	549	537	541	539	536	533	536	534	536	538,6
	Média dp	543	547	539	538	542	538	543	543	544	541	541,7 7,70
III	11	544	545	542	545	547	554	539	545	-	-	545,1
	12	551	548	549	548	540	541	549	544	545	548	546,3
	13	542	541	532	546	546	545	547	545	549	547	544,0
	Média dp	546	545	541	546	544	547	545	545	547	547	545,1 4,25
Média Global												542,3
Desvio Padrão												4,60

(1) Lote I= animais com até 3 meses de lactação; lote II= animais de 3 a 7 meses de lactação; lote III= animais com mais de 7 meses de lactação.

(2) dp=desvio padrão

Tabela 4.14- Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados da Fazenda C, da região de Campinas, durante o verão e analisadas através de crioscopia eletrônica

Lotes ⁽¹⁾	Animais		Crioscopia eletrônica				Média
			Coleta em diferentes dias				p/ animal
I	14	527	545	545	535	542	538,8
	15	547	539	538	540	-	541,0
	12	548	544	540	550	542	544,8
	16	544	542	550	531	543	542,0
	8	548	539	549	543	561	548,0
	Média dp ⁽²⁾	543	542	544	540	547	542,9 6,84
II	17	544	551	554	543	552	548,8
	18	541	537	549	534	550	542,2
	5	547	548	560	546	-	550,2
	19	547	545	550	534	553	545,8
	20	548	548	560	549	558	552,6
	Média dp	545	546	555	541	553	547,9 6,92
III	21	541	537	552	544	548	544,4
	11	-	551	551	542	547	547,7
	22	551	535	537	540	543	541,2
	23	543	538	555	535	547	543,6
	24	544	548	-	551	555	549,5
	Média dp	545	542	549	542	548	545,2 6,24
Média Global							545,4
Desvio Padrão							3,13

(1) Lote I= animais com até 3 meses de lactação; II= animais de 3 a 7 meses de lactação; III= animais com mais de 7 meses de lactação.

(2) dp=desvio padrão

Tabela 4.15- Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na Fazenda F, da região de Campinas, durante o inverno e analisadas através de crioscopia eletrônica

Lotes⁽¹⁾	Animais	Crioscopia Eletrônica										Média p/ animal
		Coleta em diferentes dias										
I	1	532	540	541	540	546	547	542	539	535	543	539,9
	2	536	543	538	545	543	542	538	542	542	542	541,1
	3	538	542	541	542	541	538	541	542	534	540	539,9
	4	536	536	536	546	552	545	531	534	538	536	539,0
	5	540	542	534	543	545	534	549	554	540	546	542,7
	6	543	535	544	545	538	546	539	540	536	538	540,5
	Média dp ⁽²⁾	537	540	539	543	543	542	540	542	537	541	540,5 4,62
II	7	542	546	551	547	545	550	543	544	542	544	545,4
	8	533	543	541	550	535	546	538	535	536	536	539,3
	9	548	547	546	550	545	548	545	543	542	543	545,7
	10	548	537	538	551	539	542	543	543	541	542	542,4
	11	541	531	543	540	539	545	538	538	550	544	542,4
	Média dp	542	541	544	548	541	546	541	541	542	542	542,8 4,82
III	12	534	541	542	543	544	542	548	551	549	549	544,3
	13	545	546	544	546	538	549	540	540	544	540	543,2
	Média dp	539	543	543	544	541	545	544	545	546	544	543,7 4,29
Média Global												542,3
Desvio Padrão												4,44

(1) Lote I= animais com até 3 meses de lactação; lote II= animais de 3 a 7 meses de lactação; lote III= animais com mais de 7 meses de lactação.

(2) dp=desvio padrão

Tabela 4.16- Pontos de congelamento do leite, de animais em diferentes estágios de lactação, coletados na Fazenda F, da região de Campinas, durante o verão e analisadas através de crioscopia eletrônica

Lotes(1)	Animais	Crioscopia Eletrônica					Média
		Coleta em diferentes dias					p/ animal
I	14	531	545	542	543	539	540,0
	15	531	540	531	540	534	535,2
	13	542	545	538	543	542	542,0
	16	527	543	541	532	530	534,6
	17	533	544	538	538	531	536,8
	Média dp ⁽²⁾	533	543	538	539	535	537,6 5,52
II	18	543	557	548	554	543	549,0
	19	539	548	542	535	542	541,2
	20	536	546	537	540	538	539,4
	12	540	549	539	539	547	542,8
	21	541	552	543	543	543	544,4
	Média dp	544	550	542	542	543	543,4 5,60
III	7	547	551	550	549	554	550,2
	2	541	545	541	545	542	542,8
	11	537	549	541	546	538	542,2
	9	544	556	542	554	553	549,8
	Média dp	542	550	543	548	547	546,2 5,60
Média Global							542,4
Desvio Padrão							5,96

(1) Lote I= animais com até 3 meses de lactação; lote II= animais de 3 a 7 meses de lactação; lote III= animais com mais de 7 meses de lactação.

(2) dp=desvio padrão

A variabilidade entre os lotes apresentaram a mesma tendência que a Fazenda A, ou seja, somente no verão foi encontrada diferença significativa ($P \leq 0.05$) entre o primeiro e o último lote, sendo este numericamente maior. Não houve diferença significativa entre as duas estações ($p \leq 0,05$).

Os dados indicam que à medida que se avança no estágio de lactação, há uma tendência do aumento do ponto de congelamento do leite no inverno. De forma inversa, parece haver uma diminuição do mesmo no verão. Essa tendência se mostrou oposta na fazenda F, onde teve o ponto de congelamento do lote III (animais com mais de 7 meses de lactação) aumentado no verão.

Uma série de fatores como alteração quantitativa dos componentes do leite durante o período normal de lactação (COSTA *et alli*, 1985), alimentação (DEMOTT *et alli*, 1968), volume de água ingerido pelos animais (FONSECA, 1986) e temperatura ambiente (BIANCA, 1965), podem explicar tal fenômeno.

A Figura 4.6 mostra a distribuição dos valores dos pontos de congelamento de amostras de leite, coletados individualmente, das Fazendas A, C e F, tanto no inverno quanto no verão. Como pode ser observado, a curva seguiu a mesma tendência de distribuição dos dados, das Figuras 4.4 e 4.5. Também neste caso, o ponto máximo ficou entre 541 e 545.

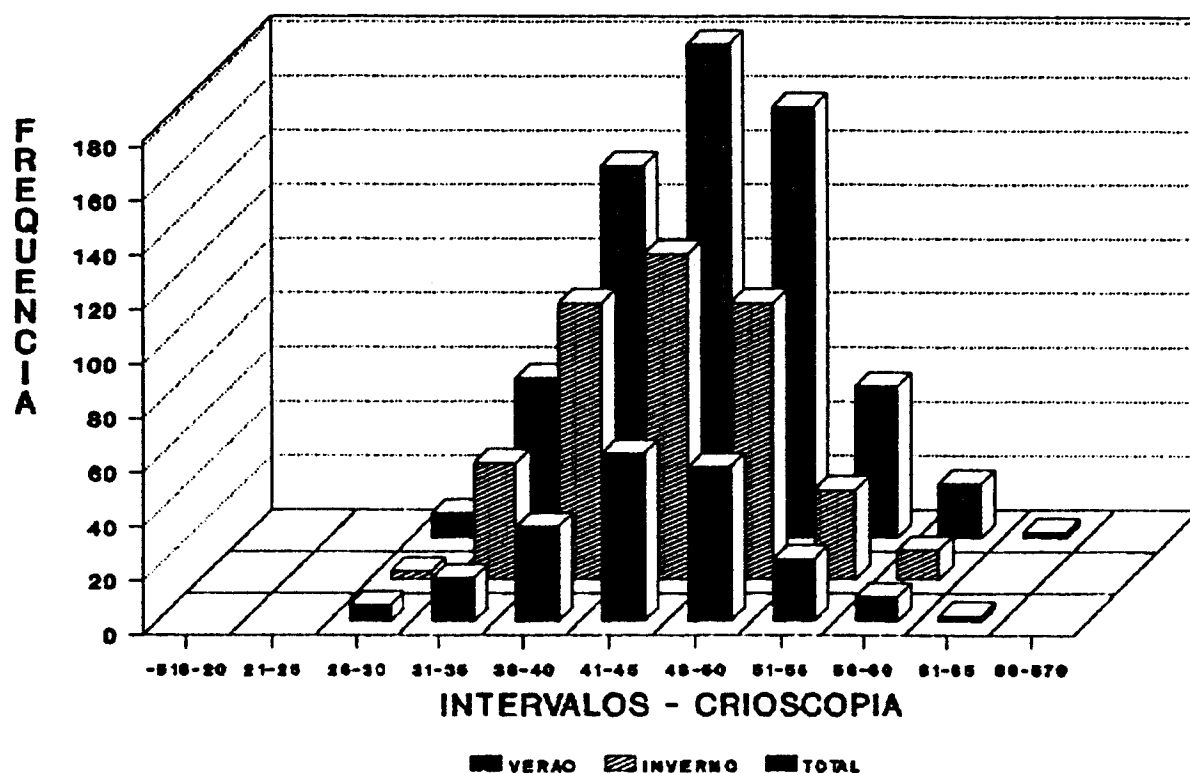


Figura 4.6. Distribuição dos valores dos pontos de congelamento de leite individual, das fazendas A, C e F, na região de Campinas, no inverno e no verão

A variabilidade entre os animais, pode ser facilmente visualizado, uma vez que houve um alargamento da base da curva de distribuição dos pontos de congelamento do leite, com valores variando entre 527 à 561.

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram que a curva de distribuição dos pontos de congelamento do leite, das fazendas A, C e F, da região de Campinas, é normal. O ponto de congelamento médio do leite de vaca da raça holandesa estabelecido para esta região foi de $543,7 \pm 3,77$. No entanto, 95% (noventa e cinco por cento) dos produtores de leite tipo "B"

estão dentro da faixa de 536 a 551. Estes limites levam em consideração a variabilidade fisiológica dos animais, bem como os fatores que interferem no mesmo (alimentação, temperatura ambiente e manejo).

Comparando-se a faixa de $543,7 \pm 3,77$ com a atualmente utilizada pelo Serviço de Inspeção Federal ($540 \pm 0,01$), no controle de qualidade do leite em todo o país, podemos observar que a faixa encontrada é menor quanto ao limite inferior, sugerindo que o padrão utilizado para esta região poderia ser mais flexível. No entanto, esta faixa garante que 95% dos produtores de leite tipo "B" da região de Campinas, apresentarão leites certificadamente normais, quanto ao ponto de congelamento.

Quanto à região de Taubaté, a média encontrada foi de $534,7 \pm 2,82$. No entanto valores entre 529 a 540 podem ser considerados normais para esta região, visto que englobam 95% dos pontos de congelamento encontrados. Além de ter sido estabelecida uma média inferior à de Campinas, esta também apresentou um menor desvio padrão. Isto sugere que se um estudo regional à nível de ponto de congelamento fosse realizado e este fosse estabelecido por região, Taubaté teria certamente um ponto de congelamento baixo (tendo por base o valor aceito atualmente), porém mais energicamente poderia ser controlado já que apresenta um desvio padrão médio pequeno. Caso o padrão atualmente vigente no país for aplicado à região de Taubaté, pelo menos 50% dos produtores idôneos teriam que ser desconsiderados.

Desta forma, segere-se que devam ser realizados estudos regionais, para caracterizar o ponto de congelamento real do leite da região, evitando-se o "condenamento" de produtores idôneos, que estejam fora da faixa determinada, bem como refletirá a realidade do leite em nosso país.

5. Conclusões

1. Os valores reais das soluções padrão comerciais não corresponderam aos valores nominais das mesmas.
2. Os valores das soluções de sacarose 7 e 10%, segundo Hortvet, não foram reproduzidos, seguindo-se as técnicas atuais sugeridas pela A.O.A.C.
3. É possível usar biftalato de potássio 3% e NaCl 0,85%, como soluções padrão, uma vez que fornecem pontos de congelamento próximos ao do leite.
4. Os resultados indicaram que a solução de biftalato de potássio 3% pode ser estocada à temperatura ambiente ou sob refrigeração, sem que ocorra variação do ponto de congelamento da mesma, por no máximo 6 (seis) meses.
5. O prazo máximo de validade para a solução de NaCl 0,85%, à temperatura ambiente ou sob refrigeração foi de 5 (cinco) meses.
6. Todos os resultados devem ser expressos em °C (graus Celsius).
7. Valores "reais" dos pontos de congelamento das soluções padrão, devem ser obtidos através de termômetro de mercúrio de alta sensibilidade. Estes valores é que devem ser usados como referência para o equipamento eletrônico.
8. A crioscopia eletrônica detecta adição de água, dentro de valores relativos, de até 2%.

9. Com relação à crioscopia de gado holandês, os resultados indicam:

9.1. Houve diferença significativa ($p \leq 0,001$) entre leites coletados na fazenda e na plataforma

9.2. Houve diferença significativa ($p \leq 0,001$) entre regiões diferentes.

9.3. Houve diferença significativa ($p \leq 0,001$) entre ordenha da manhã e da tarde.

9.4. Não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre diferentes estações do ano.

9.5. Houve uma tendência do aumento do ponto de congelamento do leite, com o avanço do estágio de lactação, no inverno. Tendência inversa foi observada no verão.

9.6. O valor médio do ponto de congelamento do leite da região de Campinas, foi de $-0,543^{\circ}\text{C} \pm 3,77$. O valor médio encontrado está dentro do valor considerado normal pela legislação, no entanto um pouco mais baixo.

9.7. A faixa do ponto de congelamento do leite de vaca (raça holandesa), para a região de Campinas, estabelecida através deste experimento foi de $-0,536$ a $-0,551^{\circ}\text{C}$.

9.8. A faixa para o ponto de congelamento do leite da região de Campinas, estabelecida através deste experimento, foi mais flexível, quanto ao limite inferior, que aquela atualmente utilizada como padrão.

9.9. O valor médio do ponto de congelamento do leite da região de Taubaté, determinada através deste experimento foi de $-0,534 \pm 2,82$. No entanto valores entre $-0,529$ a $-0,540^{\circ}\text{C}$, podem ser considerados normais para o ponto de congelamento do leite desta região.

9.10. Devem ser realizados estudos regionais , para o estabelecimento do ponto de congelamento real da região.

6. Referências Bibliográficas

1. ASCHAFFENBURG, R. & ROWLAND, S.J. Abnormal freezing point of milk. **Chem. & Ind.**, p. 636-637, 1950.
2. A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis. 14 ed. Washington DC, p.289-290, 1984.
3. BAILEY, E.M. Cryoscopy of milk. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.** 5(4): 484-497, 1922.
4. BAILEY, E.M. Cryoscopy of milk: influence of acidity upon freezing point depression of milk. **J.Assoc. Off. Agric. Chem.** 6(4): 429-434, 1923.
5. BERG, M.G. van der. The partial pressure of carbon dioxide in milk and its relation to the freezing point. **Neth. Milk Dairy Journal** 33:91-11, 1979.
6. BIANCA W. Review of the progress of dairy science, section a physiology cattle in a hot climate. **J.Dairy Res.** 32: 291, 1965.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Portaria nº 5, de 24 de Abril de 1980.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Portaria nº 8, de 26 de Junho de 1984.
9. BRATHEN, G. Measurement of extraneous water by the freezing point test. **Bulletin International Federation.** DOC 154, 20 p., 1983.
10. CARVALHO, I.C. Crioscopia de leite 1ª - parte. Revisão do assunto. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 32(193): 9-19, 1977a.
11. CARVALHO, I.C. Crioscopia de leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 32(194): 3-7, 1977b.
12. COLE, E.R.; DOUGLAS, J.B.; MEAD, M. The lactose chloride contribution to the freezing depression of milk. II. Examination of partial contribution on the full lactation period for two cows. **J. Dairy Res.** 24: 33, 1957.
13. COSTA, F.M.A.; D'ALESSANDRO, W.T.; TANAZINI, C.A., LABOISSIERE, A.C.; AMADO Jr, R. & PRADO FILHO, S.R. Depressão do ponto de congelamento bovino "in natura" da bacia leiteira de Goiânia. **Higiene Alimentar** 4(1): 34-43, 1985.

14. DEMOTT, B.J. Relationship between weather factors, source of sample, composition of milk and freezing point depression. **J. Milk Food Tech.** 34(3): 140-143, 1971.
15. DEMOTT, B.J. The freezing point of milk produced in four markets in Tennessee. **J. Milk Food Tech.** 29(10): 319-322, 1966.
16. DEMOTT, B.J. & BURCH, T.A. Influence of storage upon the freezing point of milk. **J. of Dairy Sci.** 49(3): 317-318, 1966.
17. DEMOTT, B.J.; HINTON, S.A. & MONTGOMERY, M.J. Influence of some management practices and season upon freezing point depression. **J.Dairy Sci.** 50(2): 151-154, 1967.
18. DEMOTT, B.J.; HINTON, S.A.; SWANSON, E.W. & MILES, J.T. Influence of added sodium chloride in grain ration on the freezing point of milk. **J. Dairy Sci.** 51(9): 1363-1365, 1968.
19. DEMOTT, B.J.; MONTGOMERY, M.J.; HINTON, J.A. Influence of changing from dry hot feeding to pasture on the freezing point of milk **J. Milk Food Technol.** 32: 210, 1969.
20. EISSES, J. & ZEE, B. The freezing point of authentic cow's milk and farm tank milk in the Netherlands. **Neth. Milk Dairy J.** 34(3): 163-180, 1980.
21. FREEMAN, T.R. & BUCY, J.L. Distribution of milk freezing points in authentic herd samples. **J. Dairy Sci** 50(6): 951, 1967.
22. FREEMAN, T.R.; KRATZER, D.D. & BUCY, J.L. Relationship of freezing point of herd milk to production conditions. **J. Milk Food Techn.** 35(4): 189-190, 1972.
23. FONSECA, C.H. 1986. Crioscopia de leite - uma revisão bibliográfica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 41(248): 3-25, 1986.
24. GIKOMYO, G.M. & KLEYN, D.H. Influence of nitrogen source and fibre levels in the relation on the freezing point and chloride content of cows milk. **J. Dairy Sci.** 52(9): 1379-83, 1969.
25. HARDING, F. & MORRIS, J.L. 20 Int. Dairy Congress. Brief comm. E211, 1978.
26. HARDING, F. Measurement of extraneous water by freezing point test. **Bulletin Internacional Dairy Federation.** E. DOC 154, 20 p., 1983.
27. HARDING, F. Milk determination of freezing point (thermistor cryoscope method). **International Dairy Federation.** Standard 108A, 5 p., 1986.

28. HARDING, F. Milk adulteration - freezing point depression. **J. Society Dairy Technol.** **43**(3): 61, 1990.
29. HENDERSON, J.L. The effect of handling and processing on the freezing point of milk. **J. Assoc. Offic. Chem.** **46**(6): 1030-35, 1963.
30. HENNINGSON, R.W. The variability of the freezing point of fresh raw milk **J. Ass. Off. Agric. Chem.** **46**(6): 1036-1042, 1963.
31. HENNINGSON, R.W. Thermistor cryoscopic determination of the freezing point value of milk produced in North America. **J. Ass. Off. Agric. Chem.** **52**(1): 142-157, 1969.
32. HORTVET, J. The cryoscopy of milk. **J. Ind. Eng. Chem.** **13**(3): 198-208, 1921.
33. ISRAEL. Standard Institution of Israel. Raw cow's milk. Israel standard SI55, 4p., 1977.
34. JOHNSON, A.H. The composition of milk. In: WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H. & ALFORD, J.A. Ed. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. 2. ed., Westport, AVI, 1974, Chap. 1, p.1-57.
35. JENNES, R.; SHIPE W.F.; SHERBON, J.W. Physical properties of milk. In: WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H. & ALFORD, J.A. Ed. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. 2.ed., Westport, AVI, 1974, Chap. 8, p.402-441.
36. JURGENS, R. Study of milk watering in Shleswig-Holstein. **Deutsche Milchwirtschaft** **34**(22): 738-740, 1983.
37. KENYA, KENYA BUREAU STANDARD. Kenya Standard KS 05-10, 1976.
38. KISS, G. & UZONYI, G. 1984. Setting the control limit in calculation of watering of milk. **Tepijar** **33**(1): 15-17, 1984.
39. LIGUGNANA, R. Il sovraraffreddamento: como evitare errori nell'uso del crioscopio. **Il latte** **4**, nov/dez, 1979.
40. LUCK, H. New freezing point standard for milk. **South African of Dairy Tech.** **16**(2): 63-65, 1984.
41. MAC DONALD, F. J. The freezing point of bulk milk. **The Analyst** **3**(869): 423-429, 1948.

42. MORITA, T. & ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes & solventes - padronização preparação purificação**. Ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 2 ed., 1972
43. MUSSENDEN, S.; HODGES, J. & HILEY, P.G. Sodium and chloride in cows' drinking water and the freezing point of milk. **J. Dairy Sci.** **60**(10): 1554-1558, 1977.
44. NEWLANDER, J.A. Physical properties of milk. In: Newlander, J.A. & Atherton, H.V Ed. **The Chemistry and Testing of Dairy Products**. Milwaukee, 1964, Chap. 2, p. 38-41.
45. PACKARD, V.S. & GINN, R.E. Need for a working-factor in evaluating freezing point results on raw milk samples. **J. Food Protection** **42**(2): 110-112, 1979.
46. PANARI, G. & ZANNONI, M. Considerazioni sulla determinazione del punto di congelamento del latte. **Scienza e Tecnica Lattiero-casearia** **37**(2): 137-141, 1986.
47. PANETTA, J.C.; BARROS, V.R.M.; SILVA, A.A.; VELLOSO, L. & TROLLI, G. O problema da crioscopia no leite "B". **Boletim Leite B**, **35**(5): 8-12, 1985.
48. PETERS, I.I.; LEIGHTON, R.E. & MULAY, C.A. Influence of feed upon the composition of milk. I. High versus low fiber ration. **J. Dairy Sci** **42**(1): 180-84, 1959a.
49. PETERS, I.I.; MULAY, C.A. & SHRODE, R.R. The interrelation between conductivity, percent lactose and freezing point of milk. **J.Milk Food Techn.** **22**(3): 71-76, 1959b.
50. PINKERTON, F. & PETERS, I.I. The influence of composition and treatment of milk upon its freezing point. **J. Dairy Sci.** **39**(7): 916, 1956.
51. PINKERTON, F. & PETERS, I.I. Conductivity, percent lactose and freezing point of milk. **J. Dairy Sci.** **41**(3): 392-397, 1958.
52. PINTO, A.P.E.F. & WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Crioscopia manual: métodos de calibração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** **40**(238): 3-9, 1985.
53. PINTO, C.M.; FRASER, L.B.; BURGOS, S.M.A.; MELLA, B.J. & VIDAL, I. Cryoscopia de la leche II. Determination del punto congelation de la leche. **Agro Sur** **4** (2): 57-64, 1976.

54. PRENTICE, J.H. Freezing point data on aqueous solutions of sucrose and sodium chloride and the Hortvet test: a reappraisal. **Analyst** **103**: 1269-1273, 1978.
55. POTTER, F.E. & ARIMA, S. The freezing point of milk from individual cows. **J. Dairy Sci** **43**(12): 1888, 1960.
56. PUHAN, Z. Temperature-caused changes in soluble milk components - influence on the freezing point. **Alimenta** **23**(3): 82-84, 1984.
57. REES, H. Seasonal variation in the chemical composition and freezing point of bulk market milk. **Australian J. Dairy Techn.** **4**:81 July- September, 1949.
58. REGAN, W.M. & RICHARDSON, G.A. Reaction of the dairy cow to changes in environmental temperature. **J. Dairy Sci.** **21**(2): 73, 1938.
59. RENTERGHEM, R. van; GRAPPIN, R.; LUCK, H.; RONKILDE, P.; EISSES, J.; MAC DONALD, F.J. Freezing point depression of milk. **International Dairy Federation Bulletin**. E. DOC. 64, 6p., 1975.
60. RICHARDSON, G.H. Elimination of the Hortvet degree in cryoscopy. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** **62**(6): 1363-1364, 1979.
61. ROBERTSON, A.H. Cryoscopy of milk, A 1954-1956 Survey. I. Distribution of freezing points among 1,627 herd milk. **J. Assoc. Off. Agric. Chem.** **40**(2): 618-628, 1957a.
62. ROBERTSON, A.H. Cryoscopy of milk, A 1954-1956 Survey. II. Testes on replicate samples. **J. Assoc. Agric. Chem.** **40**(2): 628-632, 1957b.
64. ROGICK, A.F. Análises físico-químicas do leite proveniente dos rebanhos bovinos localizados em diversas regiões do Estado de São Paulo. **Boletim da Indústria Animal** **8**(3): 84-91, 1946.
65. SAITO, T. & SCHIFTAN, T.Z. Estudos relativos ao índice crioscópico do leite pasteurizado, determinado pelo método Fiske. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** **28**(169): 9-11, 1973.
66. SHIPE, W.F.; DAHLBERG, A.C. & HERRINGTON, B.L. Variations in the freezing point of cow's milk. **J.Dairy Sci.** **36**(9): 924-933, 1953.
67. SHIPE, W.F. The freezing point of milk. A review. **J. Dairy Sci** **42**(11): 1745-1762, 1959.

68. SHIPE, W.F. The meaning and significance of the freezing point of milk. **J. of Milk Food Technol** 24(9): 282-84, 1961.
69. SMITH, A.C. The carbon dioxide content of milk during handling, processing and storage and its effect upon the freezing point. **J. Milk Food Techn.** 27(2): 38-41, 1964.
70. TUCKER, V.C. Variation in the freezing point of genuine farm milk in Queensland. **Queensland J. Agric. Sci.** 20: 161, 1965.
71. TUCKER, V.C. Effect of nutrition on the freezing point of milk. **Australian J. Dairy Technol.** 25: 137, 1990.
72. UNGER, A.; BABELLA, G.; CSÁSZÁR, G. Brief communications of the XXIII International Dairy Congress, vol. I, Oct 8-12, Montreal, 1990. In: DSA 53(7): 4858-60, 1991.
73. VELDEN, H. van der; BROUWER, Th.; HARTOG, B.J.; JANSSEN, J.T. & NOOITGEDAGT, A.J. Study of the freezing point of cow's milk free from extraneous water. **Neth. Milk Dairy J.** 38: 91-106, 1984.
74. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Notas sobre crioscopia. Apostila fornecida em um curso da Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo, 1982.
75. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. & VARGAS, O.L. Nota explicativa sobre a crioscopia do leite. **Boletim do Leite nº 657**, 14-18, 1983.
76. WOLFSCHOON-POMBO, A.F. Crioscopia e qualidade do leite. Aspecto de legislação **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 40(240): 31-35, 1985.
77. ZEE, B.; DROGT, J.; GIESEN, Th.J.J. The freezing point of authentic farm tank milk in the Netherlands. **Neth. Milk Dairy J.** 36: 291-303, 1982.