

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Programas de Pós-Graduação

**FATORES INTERFERENTES NA ANÁLISE ELETRÔNICA DA
QUALIDADE DO LEITE CRU CONSERVADO COM
AZIDIOL LÍQUIDO, AZIDIOL COMPRIMIDO E BRONOPOL**

Mônica de Oliveira Leite

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2006**

Mônica de Oliveira Leite

**FATORES INTERFERENTES NA ANÁLISE ELETRÔNICA
DA QUALIDADE DO LEITE CRU CONSERVADO COM AZIDIOL LÍQUIDO,
AZIDIOL COMPRIMIDO E BRONOPOL**

**Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Ciência Animal.**

**Área de Concentração: Medicina Veterinária
Preventiva e Epidemiologia**

Orientador: Nélio José de Andrade

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2006**

L533f Leite, Mônica de Oliveira, 1964-
Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol / Mônica de Oliveira Leite. – 2006.
62 p.: il.
Orientador: Nélio José de Andrade
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Qualidade – Teses. 3. Leite – Bacteriologia – Teses. I. Andrade, Nélio José de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637.1

“Se as coisas são inatingíveis...ora! Não é motivo para não querê-las...”

Mário Quintana

Aos meus amados filhos Larissa e Tiago,
que são minha fonte de vida e alegria

AGRADECIMENTOS

Ao professor Nélio José de Andrade, pela orientação, pela confiança e pela amizade.

Ao professor Leorges Moraes da Fonseca por viabilizar a execução deste trabalho. Obrigada por sempre acreditar, apoiar e incentivar o meu desenvolvimento profissional.

Aos professores e amigos, Mônica Cerqueira, Ronon Rodrigues, Cláudia Penna e Marcelo Resende pelo apoio, sugestões e ensinamentos valiosos durante toda a realização do curso. Obrigada por estarem presentes em todas as horas e pela agradável convivência durante este período.

À Maura, pela presteza, alegria, companheirismo e ajuda imprescindível.

Aos funcionários do Lab-UFMG pelo carinho com que me auxiliaram, estando sempre disponíveis para me ajudar, com paciência e ótimo humor.

À Moisa, pelo precioso auxílio no experimento.

A todos os professores do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal pela agradável convivência.

Aos amigos Miltinho, Fatinha, Valéria e Marco Antônio, pelo apoio e companheirismo.

Ao mestre e amigo professor Ivan Sampaio, pela atenção e colaboração na análise estatística dos resultados.

À professora Ângela, pelos ensinamentos estatísticos e sugestões.

Ao amigo Danilo, que pacientemente me auxiliou na análise estatística dos resultados.

À Cristiana Fonseca, pela amizade e auxílio em tantos momentos.

À Fabiana, da Itambé, e Maurílio, da Cotochés que estiveram sempre dispostos a colaborar com a realização do experimento.

À Andréia Kelly pela grande ajuda na revisão final da tese.

Ao meu marido Alberto, pelo apoio em vários momentos desta trajetória.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E NO MUNDO	14
2.2 MUDANÇAS NA LEGISLAÇÃO DE LEITE OCORRIDAS NOS ÚLTIMOS ANOS NO BRASIL.....	16
2.3 PARÂMETROS IMPORTANTES NA CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE DE LEITE.....	17
2.3.1 CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS.....	17
2.3.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	18
2.3.3 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL.....	19
2.4 ANÁLISE DA QUALIDADE DO LEITE POR MEIO DE EQUIPAMENTOS ELETRÔNICOS.....	20
2.4.1 ANÁLISE ELETRÔNICA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	20
2.4.1.1 CONTAGEM BACTERIANA TOTAL.....	20
2.4.1.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	22
2.4.2 ANÁLISE ELETRÔNICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO LEITE.....	23
2.5 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU PRODUZIDO NO BRASIL.....	24
2.6. CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE CRU PRODUZIDO NO BRASIL.....	25
2.7 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO LEITE CRU PRODUZIDO NO BRASIL.....	26
2.8 FATORES INTERFERENTES NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE POR MÉTODOS ELETRÔNICOS.....	27
2.8.1 TEMPERATURA DE CONSERVAÇÃO E TEMPO DE CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	27
2.8.2 USO DE CONSERVANTE LÍQUIDO EM AMOSTRAS DESTINADAS À CONTAGEM BACTERIANA TOTAL (CBT)	28

3	CAPÍTULO 1	30
	INFLUÊNCIA DO CONSERVANTE NO ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS DESTINADAS ÀS ANÁLISES ELETRÔNICAS DA QUALIDADE DO LEITE CRU	
	RESUMO.....	30
	ABSTRACT.....	30
3.1	INTRODUÇÃO.....	31
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.4	CONCLUSÕES.....	40
4	CAPÍTULO 2	41
	EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS SUBMETIDAS ÀS ANÁLISES ELETRÔNICAS DA QUALIDADE DO LEITE CRU	
	RESUMO.....	41
	ABSTRACT.....	41
4.1	INTRODUÇÃO.....	42
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.4	CONCLUSÕES.....	56
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Classificação mundial dos principais países produtores de leite em 2005.....	14
Tabela 2.2	Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade animal no Brasil no período de 1980 a 2003.....	15
Tabela 2.3	Resultados médios dos teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco total (EST) de leite cru refrigerado, publicados por pesquisadores dos laboratórios pertencentes à Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite.....	26
Tabela 3.1	Média e desvio-padrão dos resultados de contagem bacteriana, por citometria de fluxo, de amostras de leite cru refrigerado em função do conservante adicionado.....	35
Tabela 3.2	Média e desvio-padrão de diferentes parâmetros físico-químicos de amostras de leite cru refrigerado adicionadas de conservantes.....	36

Tabela 3.3	Média e desvio-padrão dos resultados da CCS (log céls./mL) e da CBT (log UFC/mL) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de conservantes.....	38
Tabela 3.4	Média das contagens padrão em placas (log de UFC/mL) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de conservante e armazenadas sob refrigeração.....	40
Tabela 4.1	Média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo dos resultados de composição centesimal e contagem de células somáticas em amostras de leite cru refrigerado, armazenadas a 30°C durante oito dias.....	46
Tabela 4.2	Médias dos valores de EST, lactose e CCS em amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 30°C durante oito dias.....	48
Tabela 4.3	Média e desvio-padrão dos resultados da CCS em amostras de leite cru refrigerado armazenadas sob refrigeração.....	52
Tabela 4.4	Média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo dos resultados de composição centesimal e CCS em amostras de leite cru refrigerado armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.....	52
Tabela 4.5	Média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo das contagens bacterianas, por citometria de fluxo e em placas, em amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 30°C.....	53
Tabela 4.6	Média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo das contagens bacterianas, por citometria de fluxo e em placas, em amostras de leite cru refrigerado armazenadas sob refrigeração.....	54
Tabela 4.7	Médias dos resultados de contagem padrão em placas em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido e azidiol comprimido armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Produção de leite no mundo, em milhares de toneladas, nos anos de 1995 e 2004.....	15
Figura 2.2	Distribuição da produção brasileira de 23.475 mil toneladas de leite no ano de 2004 por Unidades da Federação.....	16
Figura 2.3	Foto de equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem bacteriana total em amostras de leite cru.....	21
Figura 2.4	Foto de equipamento eletrônico Bentley Combi System 2300®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem de células somáticas e análise de composição centesimal de amostras de leite cru.....	24
Figura 3.1	Médias das contagens bacterianas por citometria de fluxo em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido e azidiol comprimido durante armazenamento por 10 dias em temperatura de refrigeração	35
Figura 3.2	Médias dos valores de extrato seco total (EST) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.....	37
Figura 3.3	Médias dos valores de extrato seco desengordurado (ESD) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.....	37

Figura 3.4	Médias dos valores de lactose em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.....	38
Figura 3.5	Médias das contagens bacterianas por citometria de fluxo em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.....	39
Figura 3.6	Médias das contagens padrão em placas em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.....	40
Figura 4.1	Médias dos valores de extrato seco desengordurado (ESD) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas a 30 °C durante oito dias.....	46
Figura 4.2	Médias dos valores de proteína em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas a 30°C durante oito dias.....	47
Figura 4.3	Médias dos valores de gordura em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas a 30°C durante oito dias.....	47
Figura 4.4	Médias dos valores de EST em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.....	48
Figura 4.5	Médias dos valores de ESD em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.....	49
Figura 4.6	Médias dos valores de lactose em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.....	49
Figura 4.7	Médias dos valores de proteína em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.....	50
Figura 4.8	Médias dos valores de gordura em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.....	50
Figura 4.9	Médias dos resultados da CCS em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.....	51
Figura 4.10	Médias das contagens bacterianas, por citometria de fluxo, em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido e armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.....	54
Figura 4.11	Médias das contagens bacterianas, por citometria de fluxo, em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol comprimido e armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.....	55

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos estudar a influência de vários parâmetros nos resultados das análises eletrônicas da qualidade do leite cru, como: o tempo e a temperatura de armazenamento das amostras, o emprego do conservante azidiol na forma de comprimido, o uso do azidiol em amostras destinadas às análises de composição e contagem de células somáticas e o uso do bronopol em amostras destinadas à contagem bacteriana total. Foram coletadas seis amostras, que foram subdivididas, adicionadas dos conservantes e armazenadas a 30°C por até oito dias e sob refrigeração (4, 7 e 10°C) por até 10 dias. As análises de composição e contagem de células somáticas foram efetuadas em equipamento eletrônico Bentley Combi System 2300® e a avaliação da contagem bacteriana total foi realizada em equipamento eletrônico IBC BactoCount (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América) e por contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em placas. O delineamento adotado foi em parcelas subdivididas, tendo sido realizadas a análise de variância e a comparação das médias usando-se o teste de Duncan. Concluiu-se que amostras armazenadas a 30°C podem ser analisadas, quanto à contagem de células somáticas e análise de composição centesimal até o quinto e quarto dia, respectivamente, após a coleta. Amostras destinadas às análises de contagem de células somáticas e composição centesimal armazenadas sob refrigeração, podem ser analisadas em até dez dias após a coleta das mesmas. Amostras destinadas à contagem bacteriana não podem ser armazenadas em temperatura ambiente, sendo que, em temperatura de refrigeração podem ser mantidas por até dez dias. O uso do conservante azidiol em amostras de leite cru destinadas às análises de composição centesimal e contagem de células somáticas não é recomendado, por ter apresentado resultados estatisticamente diferentes nos teores de lactose pesquisados, assim como na contagem de células somáticas, e não é indicado o uso do bronopol em amostras destinadas à contagem bacteriana total, por subestimar a população microbiana. Em relação ao uso do azidiol na forma de comprimido, concluiu-se que este pode ser usado como conservante de amostras de leite cru, em substituição ao azidiol na forma líquida, sem que haja qualquer prejuízo nos resultados das análises.

Palavras-chave: azidiol líquido, azidiol comprimido, bronopol, contagem bacteriana total, citometria de fluxo, temperatura de armazenamento, tempo de armazenamento, leite cru, qualidade de leite.

ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the influence of several parameters on the results of electronic analyses of total bacteria count (TBC), the somatic cell count (SCC) and composition used to determine raw milk quality. The parameters were: storage time and temperature, azidiol (liquid and tablets) and bronopol. Each other analysis of SCC, composition and TBC. Six samples were collected, subdivided, added preservative and stored at room temperature for up to until eight days and incubated under three different temperatures (4, 7 e 10°C) for until ten days. An electronic equipment, Bentley Combi System 2300[®] was used for the composition and SCC analyses. The total bacterial counting (TBC) was done using an electronic equipment Bactocount IBC - Bentley[®] and standard plate counting for mesophilic aerobic microorganisms. The design was split-split, and the results were evaluated by Analysis of Variance with analysis of minimal significant difference by Duncan Test. The results showed that samples kept at 30°C can be analyzed, for composition and SCC until the fourth and fifth day, respectively, after collection. Cooled samples can be analyzed for composition, SCC and TBC until 10 days after collection. However the samples can not be stored at room temperature for TBC. There was significant statistical difference on the levels of lactose and SCC between samples using azidiol. Therefore azidiol is not suitable for samples preservation analyzed for composition and SCC. Sample preserved with bronopol is not indicated for TBC because it underestimates the bacterial population. The results indicated that the tablet of azidiol can be used to replace the liquid presentation of the preservative in raw milk samples.

Keywords: azidiol liquid, azidiol tablet, bronopol, total bacterial counting, flow cytometry, temperature of storage, time of storage, raw milk, milk quality

1. INTRODUÇÃO

Visando a inserção do setor laticinista brasileiro na economia internacional, com aumento de competitividade, qualidade e maior produção, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa nº51 (IN 51) (Brasil, 2002), preconizando limites legais de contagem padrão em placas, contagem de células somáticas e padrões físicos e químicos para o leite cru refrigerado. A melhoria da qualidade higiênico-sanitária do leite cru é considerada o principal vetor deste processo de modernização do setor produtivo laticinista no Brasil.

De acordo com a IN 51, oficialmente em vigor desde julho de 2005, é compulsória a análise mensal de uma amostra de leite cru, proveniente de cada uma das propriedades rurais que enviam o produto para estabelecimentos sob Inspeção Federal. Estão previstas a contagem de células somáticas; a determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos; a pesquisa de resíduos de antimicrobianos; a determinação da crioscopia e contagem bacteriana total. A logística de coleta, envio aos laboratórios oficiais e a análise laboratorial propriamente dita das amostras de leite, consiste de várias etapas, sendo que as mesmas devem chegar aos laboratórios com temperatura inferior a 10°C e serem analisadas no prazo de quatro dias (Gonzalo *et al.*, 2003). Recentemente, com o aumento da demanda de análises, é comum a ocorrência de situações de não conformidade, que podem acontecer desde a coleta das amostras até sua análise nos laboratórios credenciados pelo MAPA podendo prejudicar a execução dos exames nas condições preconizadas.

Inicialmente, as amostras são coletadas, em geral, pelos transportadores de leite cru refrigerado na propriedade rural. Logo após, as mesmas são acondicionadas em frascos próprios, adicionadas de conservantes e

mantidas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável durante o transporte até a indústria. Durante a coleta do leite, uma das principais dificuldades do carreteiro é a necessidade de adicionar os conservantes às amostras, em especial o azidiol, que em função de se apresentar na forma líquida, muitas vezes é adicionado em quantidade não padronizada e diferente da recomendada, ocasionando erros de concentração final na amostra. Após chegar à indústria processadora do leite, as amostras são enviadas por empresas transportadoras ou pelo correio a um dos laboratórios pertencentes à Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL). Eventualmente, ocorrem atrasos no envio das amostras, prejudicando a temperatura ideal das amostras no momento da recepção no laboratório, assim como o tempo estabelecido para se efetuar as análises. Finalmente, no laboratório, as amostras precisam ser analisadas com rapidez e precisão, fornecendo resultados que retratem a qualidade do leite no momento de sua coleta na fazenda produtora.

Ainda existem dúvidas sobre qual seria o tempo máximo de armazenamento das amostras de leite sem a ocorrência de alteração dos resultados. Segundo Cassoli (2005), amostras adicionadas de azidiol, conservadas por até sete dias a 7°C, podem ser usadas na contagem bacteriana total (CBT) sem que ocorram diferenças significativas nos resultados encontrados. Souza *et al.* (2005) determinaram que, para a contagem de células somáticas, as amostras devem ser armazenadas sob refrigeração e analisadas em até sete dias após a coleta.

O presente trabalho teve como objetivos estudar a influência de vários parâmetros nos resultados das análises eletrônicas da qualidade do leite cru, como: o tempo e a temperatura de armazenamento das amostras, o emprego do conservante azidiol na forma de comprimido, o uso do azidiol

em amostras destinadas às análises de composição e contagem de células somáticas e o uso do bronopol em amostras destinadas à contagem bacteriana total.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de leite no Brasil e no mundo

Atualmente, o Brasil é o sétimo maior produtor de leite do mundo, tendo produzido mais de 23.320 mil toneladas de litros no ano de 2005 (Tabela 2.1), o que representa 4,4% do total da produção mundial.

Tabela 2.1. Classificação mundial dos principais países produtores de leite em 2005

	Países	Produção de leite (mil toneladas) em 2005
1°	Estados Unidos	80.150
2°	Índia	38.500
3°	Rússia	30.600
4°	Alemanha	27.600
5°	França	25.282
6°	China	24.530
7°	Brasil	23.320
8°	Nova Zelândia	14.625
9°	Reino Unido	14.577
10°	Ucrânia	14.000

Fonte: Empresa... (2006a)

As perspectivas do mercado internacional para o Brasil são positivas, pois nos países desenvolvidos a produção de leite está estabilizada ou em declínio (Figura 2.1), enquanto no Brasil, tanto a produção como a produtividade têm melhorado a cada ano (Empresa..., 2006b). No Brasil, a produtividade do leite, aumentou em quase 80% nos últimos 15 anos, em decorrência de investimentos e pesquisas efetuadas na área (Tabela 2.2). Apesar deste aumento significativo, o Brasil não atingiu a expressividade de países como os Estados Unidos e Canadá, que têm produtividade de 8.226 e 7.472 litros/vaca/ano, respectivamente. No entanto, apresenta um grande potencial de crescimento de produção e produtividade de leite (Empresa..., 2006a).

Existe uma expectativa de crescimento da demanda no mercado internacional de leite e seus derivados, em função do aumento de consumo na China. Os chineses, por tradição, consomem pouco leite, no entanto nos últimos anos houve um significativo incremento no consumo de produtos lácteos passando de três kg/pessoa/ano em 2000 para 9,9 kg/pessoa/ano em 2005 (Empresa..., 2006b). Em um mercado com mais de um bilhão de pessoas, qualquer aumento no consumo reflete positivamente na economia dos países exportadores (Empresa..., 2006b).

Em relação à produção de leite por Estados (Figura 2.2), Minas Gerais se apresenta como o maior produtor, sendo responsável por quase 30% da produção nacional, seguido de Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Santa Catarina (Instituto..., 2006).

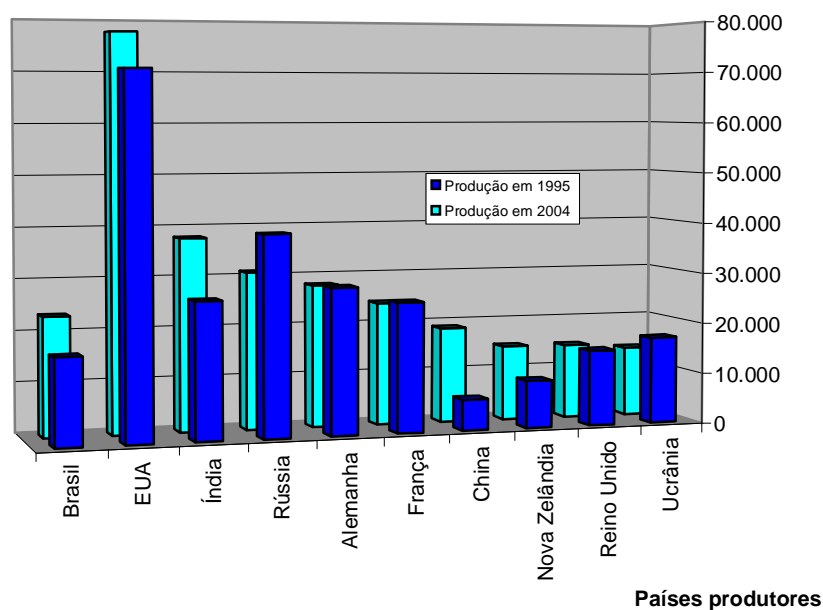


Figura 2.1. Produção de leite no mundo, em milhares de toneladas, nos anos de 1995 e 2004.
 Fonte: Empresa...(2006a).

Tabela 2.2. Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade animal no Brasil no período de 1980 a 2003

Ano	Produção de Leite (mil toneladas /ano)	Vacas Ordenhadas (mil cabeças)	Produtividade (litros/vaca/ano)
1980	11.162	16.513	676
1990	14.484	19.072	760
2000	19.767	17.885	1.105
2001	20.510	18.194	1.127
2002	21.643	19.005	1.139
2003	22.595	19.195	1.177

Fonte: Instituto...(2006).

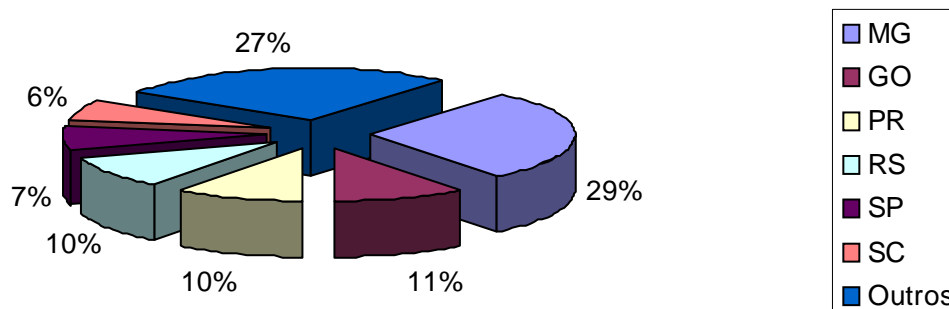


Figura 2.2. Distribuição da produção brasileira de 23.475 mil toneladas de litros de leite no ano de 2004 por Unidades da Federação.

Fonte: Instituto...(2006).

2.2. Mudanças na legislação de leite ocorridas nos últimos anos no Brasil

No Brasil, em 1952, foi publicado o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1980) que estabeleceu parâmetros de qualidade para produtos de origem animal, entre eles o leite e seus derivados. Em 1996, por iniciativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite e de representantes da comunidade científica, foi criado o “Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite” – PNMQL (Oliveira *et al.*, 2000). Este programa teve início em função de resultados encontrados em diversos estudos, que comprovaram as perdas econômicas significativas pelas quais, sistematicamente, a cadeia produtiva do leite tinha, em decorrência, principalmente, de elevada acidez do leite e do alto índice de incidência de mastite nos rebanhos brasileiros. Além destes fatores, podem, também, ser citadas as perdas no transporte, na transformação da matéria-prima e a rápida deterioração dos produtos acabados devido à baixa qualidade da matéria-prima (Oliveira *et al.*, 2000).

A consequência do PNMQL foi a atualização da legislação federal, de forma a possibilitar o desenvolvimento e a modernização do setor laticinista brasileiro (Oliveira *et al.*, 2000; Pinto, 2004). Assim, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em abril de 2002, por meio da Instrução Normativa nº37 (IN 37), instituiu a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), com o objetivo de realizar análises laboratoriais para a fiscalização de amostras de leite cru, coletadas em propriedades rurais e em estabelecimentos de laticínios. A RBQL é composta por um laboratório de referência em Pedro Leopoldo, MG e por sete laboratórios estrategicamente localizados nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Goiás, Pernambuco e dois em Minas Gerais. Nestes Laboratórios são utilizados equipamentos capazes de realizar análises de composição centesimal, contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) (Fonseca, 2005). Em setembro de 2002, por meio da publicação da Instrução Normativa nº51 (IN 51) (Brasil, 2002), o MAPA definiu novos parâmetros de qualidade e estabeleceu critérios de avaliação para o leite cru refrigerado. De acordo com a IN 51, desde julho de 2005, é

compulsória a análise mensal de uma amostra de leite, proveniente de cada uma das propriedades rurais que destinam o produto para estabelecimento sob Inspeção Federal. Estão previstas a contagem de células somáticas, a determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos, pesquisa de resíduos de antimicrobianos, determinação da crioscopia e contagem bacteriana total.

A IN 51 (Brasil, 2002) estabelece que o leite cru refrigerado deva conter no mínimo 2,9% de proteína, 3,0% de gordura e 8,4 % de Extrato Seco Desengordurado (ESD). Em relação à contagem de células somáticas, o valor máximo permitido, nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, é de 1.000.000 céls./mL. A partir de julho de 2008 este valor máximo será reduzido para 750.000 e, em julho de 2011, será de 400.000 céls./mL. Na contagem bacteriana total os valores máximos permitidos, nas mesmas regiões, também passarão por alterações no decorrer dos anos: 1.000.000 desde julho de 2005; 750.000 a partir de julho de 2008 e 100.000 a partir de julho de 2011. Estes padrões visam compatibilizar a qualidade do leite e derivados produzidos no Brasil com os padrões estabelecidos mundialmente.

2.3. Parâmetros importantes na caracterização da qualidade de leite

A demanda nacional por grandes volumes de leite de boa qualidade tem tornado a produção de leite uma atividade bastante competitiva. Assim, torna-se necessário conhecer e quantificar os parâmetros que podem interferir nos resultados obtidos na análise da qualidade do leite, visando diagnosticar os pontos que devem ser corrigidos, de modo a gerar ganhos efetivos nessa atividade econômica.

2.3.1. Contagem padrão em placas

Um dos importantes aspectos avaliados no leite é a qualidade microbiológica. Nesta análise, a sua população microbiana é contada ou estimada e usada como parâmetro para se avaliar a saúde do úbere, bem como os cuidados higiênicos relacionados às etapas de obtenção, transporte e armazenamento do leite cru. A higiene durante a ordenha constitui o principal recurso na fonte de produção relacionado ao período de conservação do leite, devido à impossibilidade de se reverter a sua qualidade de ruim para boa. A manutenção dessa qualidade depende das condições adequadas de armazenamento do leite na propriedade e de seu transporte até a indústria (Cerqueira *et al.*, 1999a).

A contagem de microrganismos mesófilos em leite cru era exigida apenas para leite tipo A e B, antes da publicação da IN 51, sendo os limites estabelecidos em $1,0 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, respectivamente (Brasil, 1980). No caso do leite C, o RIISPOA somente estabelecia padrão para o leite pasteurizado. Atualmente, com a entrada em vigor da IN 51, o leite tipo C não existe mais, sendo aceitos apenas os leites tipos A, B e cru refrigerado. Os padrões para os tipos A e B permanecem os mesmos estabelecidos anteriormente. No caso do leite cru refrigerado foi estabelecido o limite máximo de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL entre julho de 2005 e junho de 2008, $7,5 \times 10^5$ UFC/mL entre julho de 2008 e junho de 2011, sendo que a partir de julho de 2011, o limite será de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. Desta forma, segundo os padrões legais do MAPA, a partir desta data, todo o leite produzido nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, destinado para estabelecimento sob Inspeção Federal, terá qualidade compatível com as exigências do mercado internacional.

Em atendimento à IN 51, a avaliação microbiológica do leite cru é feita por meio de contagem eletrônica, sendo designada

como contagem bacteriana total. Entretanto, os padrões de análises microbiológicas para leite adotados no Brasil ainda são baseados em metodologias de análises tradicionais, as quais estimam a contagem microbiana do leite a partir da enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos e não a contagem bacteriana total. Para se adaptar o resultado obtido pelos equipamentos eletrônicos àqueles especificados pela legislação vigente no Brasil, convencionou-se fazer uma transformação estatística dos resultados, feita no equipamento, convertendo os resultados de contagem bacteriana total (CBT) em unidades formadoras de colônias (UFC) por meio de uma equação de regressão. Esta metodologia tem sido questionada pelos pesquisadores da RBQL devido à falta de precisão dos resultados finais, o que ocorre em virtude da variabilidade da microbiota presente no leite cru. Portanto, a metodologia de resultados atualmente utilizada no Brasil, transforma um dado preciso e mais abrangente (isto é, toda a população microbiana do leite) em um dado estimado, sujeito a erro. Além disto, a interferência de fatores como o tratamento térmico do leite e a presença de substâncias antimicrobianas na sua contagem bacteriana total ainda não são bem conhecidos.

2.3.2. Contagem de células somáticas (CCS)

O termo células somáticas abrange diferentes elementos celulares, normalmente presentes no leite, compreendendo células de defesa do organismo e células epiteliais de descamação. Entre os fatores que podem provocar o aumento na contagem de células somáticas (CCS), a mastite, sobretudo a de origem bacteriana, é a mais importante, sendo que, aproximadamente, 99% de todas as células do leite provenientes de um quarto infectado são glóbulos brancos do sangue, enquanto o restante é constituído de células epiteliais dos tecidos mamários (Philpot e Nickerson, 2002).

Mastite é a inflamação da glândula mamária proveniente de trauma ou lesão do úbere, irritação química ou, sobretudo, infecção causada por microrganismos, especialmente por bactérias. O grau de inflamação pode variar desde a forma subclínica até as várias formas clínicas da doença, dependendo da gravidade com que o úbere reage à causa da irritação (Philpot e Nickerson, 2002).

Como resultado da resposta inflamatória durante a mastite, são observadas intensas mudanças nas concentrações tanto dos principais componentes do leite como proteína, gordura e lactose, quanto dos componentes encontrados em menores concentrações, como os minerais e as enzimas (Kitchen, 1981). O aumento da contagem de células somáticas no leite pode refletir em um aumento nos teores de proteína e gordura e redução nos de lactose e sólidos totais (Pereira *et al.*, 1999; Prada e Silva *et al.*, 2000; Santos, 2002). Machado *et al.* (2000) observaram que as amostras de leite de conjunto com altas CCS apresentaram maior porcentagem de gordura, menores teores de proteína e lactose, permanecendo inalterados os teores de sólidos totais. As mudanças significativas nas concentrações dos componentes do leite ocorreram a partir de contagens superiores a 10^6 células somáticas/mL (céls./mL) para gordura e $5,0 \times 10^5$ céls./mL para proteína e lactose. Bueno *et al.* (2005) encontraram resultados semelhantes aos de Machado *et al.* (2000), com exceção dos teores de sólidos totais que apresentaram redução em seus teores.

Além de alterações nos constituintes do leite, a produção diária de leite por vacas com mastite diminui devido a danos no tecido secretor, como por exemplo, a lesão na membrana basal das células secretoras (Kitchen, 1981). Ribas *et al.* (2002), trabalhando com 672.881 amostras de leite de vacas da raça holandesa, no Estado do Paraná, encontraram efeito significativo da CCS sobre a produção diária de leite.

Coldebella *et al.* (2004) concluíram que ocorrem perdas absolutas, isto é, independem do nível de produção dos animais, e evidentes a partir de CCS de 17.000 céls./mL. Os autores estimam que para cada aumento de uma unidade na escala do logaritmo natural a partir deste valor, ocorrem perdas de 238 e 868 mililitros/dia para vacas primíparas e múltiparas, respectivamente.

A mastite resulta em redução relevante na quantidade e em mudanças na composição do leite. Para os produtores, isto significa menor retorno financeiro devido à diminuição da produção. Para as indústrias, significa numerosos problemas no processamento, diminuição do rendimento, da qualidade e da estabilidade dos produtos de laticínios (Andrade *et al.*, 2001; Philpot e Nickerson, 2002). Além de causar prejuízos econômicos para produtores de leite e indústrias de laticínios, os microrganismos envolvidos na etiologia da mastite podem causar importantes doenças no homem, como intoxicação estafilocócica, listeriose, campilobacteriose, dentre outras (Philpot e Nickerson, 2002).

Sendo assim, a contagem de células somáticas é um excelente parâmetro do estado sanitário do úbere, além de indicar possíveis reduções na produção de leite e alterações na sua composição físico-química, com conseqüente comprometimento do rendimento industrial (Andrade *et al.*, 2001; Smith, 1996).

A contagem de células somáticas é reconhecida, internacionalmente, como um dos parâmetros mais importantes para determinar a qualidade do leite. A União Européia e a Austrália estabelecem um limite de 400.000 céls./mL para amostras de rebanho. No Canadá e nos Estados Unidos, os padrões são de 500.000 céls./mL e 750.000 céls./mL, respectivamente (Philpot, 1998; Ribas, 1999).

No Brasil, a Instrução Normativa nº51 (Brasil, 2002) preconiza os limites legais de CCS para o leite cru, estipulando diferentes prazos para as diversas regiões do país. O limite inicial, que entrou em vigor em julho de 2005 nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste é de 1.000.000 céls./mL. Os valores máximos propostos serão reduzidos para 750.000 céls./mL em 2008, nas regiões citadas. Em 2011, para todas as regiões do País, o padrão oficial será de 400.000 céls./mL (Brasil, 2002).

2.3.3. Composição centesimal

Outro importante parâmetro usado na caracterização da qualidade do leite está relacionado com a composição centesimal de seus principais constituintes, como gordura, lactose e proteína. A determinação da composição centesimal do leite é fundamental para as indústrias de laticínios por ser fator preponderante para o rendimento industrial de queijos, manteiga, leite em pó, creme de leite, requeijão e outros produtos. A redução de 0,5 % de sólidos totais pode significar a perda de até cinco toneladas de leite em pó para cada milhão de litros de leite processado (Fonseca e Santos, 2000). No Brasil, o pagamento do leite pela qualidade vem sendo adotado por várias indústrias, nos últimos anos. Entre os parâmetros usados estão a composição, a contagem de células somáticas e a contagem bacteriana total. Em relação à composição, o teor de gordura é o parâmetro mais aplicado nos sistemas de pagamento pela qualidade, seguido por exigências em relação ao teor de proteína (Fonseca, 2001). O pagamento do leite segundo a sua composição é uma forma de transmitir claramente à cadeia produtiva do leite, as necessidades e variações do mercado, orientando a sua produção (Ribas, 2000).

A composição média do leite é de 87,4% de água; 3,9 g de gordura; 3,2 g de proteína; 4,6 g de lactose e 0,9 g de minerais e outros sólidos por 100 g de leite (Harding, 1995). A

IN 51 (Brasil, 2002) estabelece que o leite cru refrigerado deva conter no mínimo 2,9% de proteína, 3,0% de gordura e 8,4 % de Extrato Seco Desengordurado (ESD).

2.4. Análise da qualidade do leite por meio de equipamentos eletrônicos

A contaminação do leite cru afeta a qualidade, a vida de prateleira e a segurança dos produtos lácteos processados (Collins *et al.*, 1993; Cerqueira e Leite, 1995; Cerqueira *et al.*, 1999b; Picinin, 2003; Gigante, 2004). Existem vários métodos disponíveis para a detecção e a enumeração de microrganismos em leite cru e processado. As técnicas de cultura microbiana são as mais comuns, mas a grande desvantagem destes métodos é o tempo necessário para a obtenção de resultados (Gunasekera *et al.*, 2000). Outra desvantagem dos métodos convencionais é a falha na detecção de microrganismos viáveis, mas que não se desenvolvem nos meios de cultura utilizados. Visando a redução destes problemas, vários métodos têm sido desenvolvidos como a ATP bioluminescência, os testes de redução de corantes e a citometria de fluxo (Dansen *et al.*, 1991; Griffiths, 1993; White, 1993; Suhren e Walte, 2000).

A citometria de fluxo foi, inicialmente, usada na oncologia, em diagnósticos de câncer e de defeitos cromossômicos, e na hematologia. Aplicações clínicas da citometria de fluxo ainda constituem a maior parte das publicações científicas que utilizam esta técnica. Mas, nos últimos anos, também tem sido uma valiosa ferramenta na biologia, farmacologia, toxicologia, bacteriologia e virologia. O recente sucesso desta técnica se baseia no desenvolvimento de equipamentos versáteis associados com modernos sistemas computadorizados de aquisição e interpretação de dados, disponíveis comercialmente (Rieseberg *et al.*, 2001). A citometria de fluxo consiste na medição de características celulares, quando

estas se encontram suspensas em meio fluido (Barrientos *et al.*, 2000).

Na microbiologia de alimentos, o interesse por métodos rápidos e automatizados tem crescido nas últimas décadas. Equipamentos que se baseiam na citometria de fluxo, como o Bactoscan[®] (Foss Eletric[®], Hillerod, Dinamarca) e Bactocount[®] (Bentley Instruments Incorporated[®], Chaska, Estados Unidos da América) foram desenvolvidos visando à análise de rotina da qualidade microbiológica do leite cru. Entretanto, estes equipamentos se limitam a estimar a contagem bacteriana total ou a contagem de células somáticas, não fornecendo outras informações, como a diferenciação microbiana (Gunasekera *et al.*, 2000; Suhren e Walte, 2000). No entanto, a citometria de fluxo combinada com diferentes corantes fluorescentes e substratos fluorogênicos possibilita a quantificação e a diferenciação de microrganismos viáveis, injuriados e inviáveis (Donnelly e Baigent, 1986; McClelland e Pinder, 1994a; McClelland e Pinder, 1994b; Rapposch *et al.*, 2000; Gunasekera *et al.*, 2000; Malacrino *et al.*, 2001; Amor *et al.*, 2002; Bunthof e Abee, 2002; Gunasekera *et al.*, 2003; Holm e Jespersen, 2003; Holm *et al.*, 2004).

2.4.1 Análise eletrônica por citometria de fluxo

2.4.1.1. Contagem bacteriana total (CBT)

O método de referência para determinação da contagem bacteriana do leite é a contagem bacteriana em placas (International..., 1991), que determina a quantidade de bactérias aeróbias mesófilas após crescimento em ágar padrão. Bactérias viáveis e que crescem nas condições de cultivo, desenvolvem colônias que são enumeradas após o período de incubação, sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônias (UFC).

A contagem bacteriana total, realizada em equipamento eletrônico (Figura 2.3), tem a citometria de fluxo por princípio. No equipamento, uma alíquota da amostra é aspirada para uma das cavidades de um carrossel circular em rotação, onde é aquecida a 50°C. Durante a rotação do carrossel, a alíquota da amostra entra em

contato com uma solução de incubação constituída por reagentes hidrolisantes tamponados, enzimas proteolíticas e marcador fluorescente para lisar as células somáticas, solubilizar os glóbulos de gordura e as proteínas, tornar a parede bacteriana permeável e corar o DNA.



Figura 2.3. Foto de equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem bacteriana total em amostras de leite cru.

O marcador fluorescente, à base de brometo de etídio, se liga rápida e seletivamente na cadeia dupla do ácido nucléico bacteriano. Durante a incubação, a mistura é sonicada por meio de duas sondas ultra-sônicas, visando à quebra de partículas interferentes, o rompimento de aglomerados bacterianos, melhorando a detecção de bactérias individuais e a redução da fluorescência de fundo. A seguir, parte da mistura é transferida para o citômetro de fluxo, onde as bactérias são alinhadas em um tubo capilar e expostas a um raio *laser*, com emissão de fluorescência do DNA corado

com brometo de etídio. A fluorescência emitida é coletada por receptores ópticos, filtrada e captada por um foto-multiplicador. Os pulsos são, então, transformados em contagem individual de bactérias e, finalmente, em UFC/mL (unidade formadora de colônia/mL), após transformação estatística automática, baseada em uma curva de calibração previamente elaborada (Bentley..., 2002; Fonseca, 2005). Esta transformação é necessária em função dos limites legais para CBT, previstos pela IN 51, terem sido estabelecidos em UFC. Isto implica na necessidade de se desenvolver

uma equação de correlação entre o método de referência e o de citometria de fluxo, de modo que os resultados expressos em contagem individual de bactérias sejam transformados em UFC (Cassoli, 2005).

Para se efetuar a transformação da contagem bacteriana total em estimativa de microrganismos mesófilos, deve ser feita uma calibração com 500 amostras aproximadamente, com atualização semanal de aproximadamente 25 amostras. Esta calibração é feita com o plaqueamento de amostras de leite e, paralelamente, a leitura de CBT é feita no equipamento eletrônico. Após o período de incubação das placas, que é de 48 horas, os dados de contagem de UFC de microrganismos mesófilos são alimentados no banco de dados do computador do equipamento, onde os resultados de CBT estão armazenados. Os pontos extremos (*outliers*) são excluídos e é feita a análise estatística para estimativa da curva de regressão linear. A curva é armazenada no computador e toda leitura feita é, então, transformada de CBT em enumeração de microrganismos mesófilos aeróbios (Bentley..., 2003; Suhren e Walte, 2000).

A transformação dos resultados obtidos por equipamentos de contagem eletrônica, baseados em citometria de fluxo é utilizada, também, em outros países. Mas, devido ao erro inerente a esta transformação, tem sido proposta a utilização de dados de contagem bacteriana total não transformados. Este erro se reflete, muitas vezes, nos resultados de algumas regiões, ou mesmo de algumas propriedades específicas, não sendo adequadamente transformado pela equação de regressão armazenada no equipamento. Os fatores potencialmente interferentes são a região de coleta das amostras, a qualidade higiênica da ordenha, a estação do ano, as condições de estocagem, desinfecção dos tetos dos animais ordenhados, espécies microbianas contaminantes, dentre outros (Suhren e Walte, 2000).

2.4.1.2. Contagem de células somáticas

A contagem de células somáticas pode ser feita por aparelhos eletrônicos como o Somacount[®] (Bentley Instruments Incorporated[®], Chaska, Estados Unidos da América), o Fossomatic[®] (Foss Electric[®], Hillerod, Dinamarca) ou, por outros testes, como a microscopia direta, que é o método de referência, e o *Wisconsin Mastitis Test* (WMT).

A metodologia de referência para a contagem de células somáticas no leite demanda muito tempo para ser realizada, não sendo o método mais recomendado para monitorar a qualidade de um grande número de amostras de leite. Os equipamentos eletrônicos são utilizados pela Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite como alternativa para aperfeiçoar o controle leiteiro e a qualidade do leite (Silveira *et al.*, 2005). No Brasil, os equipamentos mais usados são o Fossomatic[®] (Foss Electric[®], Hillerod, Dinamarca) e o Somacount[®] (Bentley Instruments Incorporated[®], Chaska, Estados Unidos da América).

A contagem eletrônica de células somáticas se baseia no princípio da citometria de fluxo. Após aquecimento da amostra a 40°C, uma alíquota desta é aspirada para dentro do equipamento onde é misturada ao corante fluorescente brometo de etídio (pastilhas de GlocountTM [®] – Bentley..., 1997), com a finalidade de corar o DNA das células. A seguir, 50µL da amostra são conduzidos por um fluido carreador para o citômetro de fluxo, onde recebem a incidência de raio *laser*. Em função da incidência do raio *laser* nas células somáticas coradas com o brometo de etídio ocorre emissão de luz que, após passar por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de onda apropriados, é captada como pulso elétrico. Este pulso é ampliado, filtrado e convertido em contagem de células somáticas (Bentley..., 1997).

2.4.2. Análise eletrônica na região do infravermelho da composição centesimal dos constituintes do leite

A análise do leite por meio de equipamentos de infravermelho é prática, possibilitando analisar um grande número de amostras em curto tempo. A região de infravermelho é a faixa que varia de 0,78 μm a 300 μm do espectro infravermelho. Essa faixa é dividida em três regiões, de acordo com o comprimento de onda ou o número de ondas da radiação: o NIR (*near infra-red*), que abrange a faixa de 0,7 μm a 2,5 μm , o MIR (*mid infra-red*) que compreende a região de 2,5 μm a 25 μm e o FIR (*far infra-red*) que varia de 25 μm a 100 μm (Silveira, 2002). O princípio fundamental de todos os analisadores de infravermelho se baseia na capacidade de absorção de radiação, em diferentes comprimentos de ondas, dos grupos químicos específicos de alguns componentes do leite como gordura, proteína e lactose (Biggs *et al.*, 1987). Os grupos carbonila (C=O) das ligações éster dos triglicerídeos absorvem radiação no comprimento de onda de 5,73 μm , os grupos amida (CONH) das ligações peptídicas das proteínas em 6,46 e os grupos hidroxila (OH) da lactose em 9,53 μm (International..., 1996). A quantidade de sólidos totais presente em uma amostra pode ser determinada pelo somatório do conteúdo dos componentes gordura, proteína e lactose, acrescidos de uma constante de minerais ou pela absorção de radiação em um comprimento de onda de 4,3 μm dos grupos

hidroxila das moléculas de água (Biggs *et al.*, 1987; Silveira, 2002).

A análise da composição centesimal dos constituintes de leite cru refrigerado, realizada nos laboratórios oficiais da RBQL é efetuada em equipamentos eletrônicos com grande capacidade de análise das marcas Milko-scan (Foss Eletric[®], Hillerod, Dinamarca) e Bentley (Bentley Instruments Incorporated[®], Chaska, Estados Unidos da América) (Figura 2.4). Estes aparelhos realizam a análise por absorção infravermelha. Ocorre a mensuração da absorção de energia, utilizando quatro comprimentos de onda selecionados por quatro filtros, os quais passam por um feixe de raio *laser* durante cada ciclo de análise. Os componentes do leite são determinados em três destes comprimentos de onda: 5,73 μm para a gordura, 6,46 μm para a proteína e 9,53 μm para a lactose (Bentley..., 1998; International..., 2000).

A amostra de leite é aquecida a 40°C, agitada, aspirada para o interior do equipamento, onde recebe a irradiação pelo feixe de luz infravermelha. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho e é quantificada, sendo transformada em teores dos componentes, de acordo com a curva de calibração (Bentley..., 1998).



Figura 2.4. Foto de equipamento eletrônico Bentley Combi System 2300[®], Chaska, Estados Unidos da América, para contagem de células somáticas e análise de composição centesimal de amostras de leite cru.

2.5. Qualidade microbiológica do leite cru produzido no Brasil

A qualidade do leite cru produzido no Brasil tem sido objeto de vários trabalhos de pesquisa nos últimos anos. Mendonça *et al.* (2001), em pesquisa realizada em Minas Gerais, descreveram a ocorrência de 88% das amostras analisadas com contagens de microrganismos mesófilos aeróbios inferiores a 10^6 UFC/mL. Picinin (2003), após realizar a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, em 31 amostras de leite cru refrigerado e estocado em tanques de expansão no Estado de Minas Gerais, verificou que 74,19% das amostras apresentavam contagem de microrganismos mesófilos aeróbios dentro do padrão preconizado para 2005. Para 2008, 67,74% das amostras analisadas, apresentaram resultados que atenderiam ao requisito proposto e, apenas 25,81% dos resultados estariam de acordo com o padrão estabelecido para o ano de 2011. A autora ressalta, ainda, que as médias de contagens em amostras provenientes de ordenha mecânica e manual foram

semelhantes, não havendo diferença significativa entre elas ($p > 0,05$).

Fonseca *et al.* (2004a) analisaram 11.400 amostras de leite proveniente de tanques de refrigeração por expansão direta, coletadas e enviadas por cinco indústrias laticinistas do Estado de Minas Gerais ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (Lab-UFMG), da Universidade Federal de Minas Gerais, pertencente à RBQL, durante o período de dezembro de 2003 a abril de 2004. Aproximadamente 33,4% destas amostras tiveram contagens abaixo de 10^5 UFC/mL e 75,4% tiveram contagens inferiores a 10^6 UFC/mL.

Bueno *et al.* (2004), em pesquisa realizada no Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Universidade Federal de Goiás (UFG), também pertencente à RBQL, encontrou 45,53% das amostras com resultados inferiores a 10^5 UFC/mL e 80,6% abaixo de 10^6 UFC/mL. Estes resultados coadunam com os demonstrados por Fonseca (2005) em levantamento das análises realizadas no Lab-UFMG. Neste trabalho foram analisados os dados obtidos no período de dezembro de 2003 a janeiro de 2005, com um total de 50.434 amostras. Destas, 81,6% apresentaram contagens bacterianas iguais

ou inferiores a 10^6 UFC/mL. Comparando-se com o padrão estabelecido pela IN 51 para vigorar a partir de julho de 2011, para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, cujo valor é de no máximo 10^5 UFC/mL, 44,9% das amostras avaliadas alcançaram este padrão de qualidade.

Sendo assim, a importância de se monitorar a qualidade microbiológica do leite cru tem se tornado cada vez maior para a indústria laticinista brasileira e um monitoramento efetivo significa a obtenção de resultados rápidos e seguros a baixo custo e da forma mais prática possível. No entanto, é fundamental conhecer de que forma a diversidade da microbiota do leite, os diferentes tratamentos térmicos, assim como o tempo de conservação e a temperatura de armazenamento da amostra podem interferir nos resultados obtidos quando as análises são realizadas em equipamentos eletrônicos de contagem bacteriana total.

2.6. Contagem de células somáticas do leite cru produzido no Brasil

No Brasil, a análise da CCS começou a ser efetuada por meio de equipamentos eletrônicos em maio de 1991, por ocasião da inauguração do primeiro Laboratório Centralizado de Análise da Qualidade do Leite, do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná (PARLPR) (Ribas *et al.*, 2003). Posteriormente, outros laboratórios iniciaram a análise de contagem de células somáticas em outros estados brasileiros, possibilitando a geração de dados confiáveis sobre a qualidade do leite produzido no Brasil, em relação a este parâmetro.

Ribas *et al.* (2003) apresentaram os resultados de CCS obtidos nos anos de 1998 a 2001 em um total de 262.973 amostras provenientes dos Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo. As médias foram de 507.000, 474.000, 482.000 e 503.000, respectivamente, sendo que 70,1% das amostras tiveram contagens inferiores a

565.000 céls./mL e, apenas, 6,9% apresentaram contagens superiores a 1.130.000 céls./mL.

Segundo Brito *et al.* (2003), a média das contagens de células somáticas de amostras de leite oriundo de rebanhos dos Estados do Espírito Santo, Minas Gerais (maioria) e Rio de Janeiro, analisadas no Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, no período de 2000 a 2002, foi 493.000 céls./mL. Em relação aos limites estabelecidos para CCS nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, 91% das amostras se adequaram ao padrão de 1.000.000 céls./mL, em vigor desde julho de 2005, 82% estão de acordo com o padrão estabelecido para julho de 2007 (750.000 céls./mL) e, apenas, 51% estão de acordo com o padrão previsto para 2011 (400.000 céls./mL).

A média da contagem de células somáticas de 851.989 amostras provenientes de leite de tanques refrigeradores no Rio Grande do Sul, no período de 2000 a 2002, variaram entre 426.000 e 540.000 céls./mL (Dürr, 2003). Dados sobre a contagem de células somáticas no Estado de São Paulo são relatados por Machado *et al.* (2003). Os autores analisaram 131.211 amostras no período de 1999 a 2003 e encontraram médias de 615.000, 685.000, 513.000, 441.000 e 440.000 céls./mL respectivamente, semelhantes às encontradas em outras regiões do Brasil.

De acordo com Fonseca *et al.* (2004b), em 10.800 amostras de leite cru, coletadas em tanques de expansão, no Estado de Minas Gerais, durante o período de dezembro de 2003 a abril de 2004, a média da CCS foi 561.000 céls./mL, sendo que 12,0 % das amostras apresentaram CCS abaixo de 200.000 céls./mL; 31,3% de 200.000 a 399.000 céls./mL; 45,5 % de 400.000 a 999.000 céls./mL e 11,1 % acima de 1.000.000 céls./mL. Fonseca (2005), em um levantamento mais abrangente, relata que, a partir da análise de 50.434 amostras de leite

cru refrigerado, coletadas no Estado de Minas Gerais, durante o período de dezembro de 2003 a janeiro de 2005, as médias aritméticas de CCS variaram de 403.000 a 660.000 céls./mL. Quando os resultados foram avaliados como média geométrica, os valores de CCS oscilaram de 331.000 a 501.000 céls./mL.

Bueno *et al.* (2005), ao analisar 18.949 amostras de leite de tanques de refrigeração no Estado de Goiás, no período de outubro de 2002 a setembro de 2003, encontraram médias de 342.000 e 352.000 céls./mL no período de chuva e de seca, respectivamente. Estes resultados indicam que o leite produzido no Estado de Goiás apresenta média de contagem de células somáticas inferior às que ocorrem em outras regiões do Brasil (Ribas *et al.*, 2003; Brito *et*

al. 2003; Dürr, 2003; Machado *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2004b e Fonseca, 2005).

Considerando os dados apresentados, é necessária a implementação de programas para melhorar a qualidade do leite, com ênfase na prevenção e controle de mastite, visto que, permanecendo estes resultados, em julho de 2011, aproximadamente 50% das amostras apresentariam resultados em desacordo com os padrões estabelecidos pela IN 51 (Brasil, 2002).

2.7. Composição centesimal do leite cru produzido no Brasil

Dados sobre a composição média do leite cru refrigerado, produzido em vários estados brasileiros, nos últimos anos, têm sido relatados visando a sua caracterização (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Resultados médios dos teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco total (EST) de leite cru refrigerado, publicados por pesquisadores dos laboratórios pertencentes à RBQL.

Pesquisadores	Período das análises	Procedência das amostras	Número de amostras	Valor Médio (%)			
				Gordura	Proteína	Lactose	EST
Machado <i>et al.</i> (2000)	12/1996 a 07/1998.	SP e sul de MG	4.785	3,61	3,2	4,51	12,37
Brito <i>et al.</i> (2003)	01/2000 a 12/2002	ES, MG (maioria) e RJ	Variou de acordo com o parâmetro	3,56	3,22	4,59	12,27
Machado <i>et al.</i> (2003)	06/1999 a 03/2003	SP, MG, GO, PA	131.211	3,40	3,13	4,55	11,97
Ribas (2003)	11/1998 e 11/2001	SC, PA e SP	262.973	3,69	3,24	4,56	12,32
Fonseca <i>et al.</i> (2004b)	12/2003 a 04/2004	MG	11.400	3,63	3,23	4,52	12,34
Fonseca (2005)	12/2003 a 01/2005	MG	50.434	3,63	3,19	4,51	12,32

De acordo com Dürr (2003), em relação à composição do leite cru refrigerado produzido no Rio Grande do Sul, nos anos de 2000, 2001 e 2002, os teores médios de gordura variaram entre 3,47% e 3,80%, os de proteína variaram de 2,95% a 3,24 e os de lactose de 4,35% a 4,66%.

Brito *et al.* (2003), em avaliação da qualidade composicional de amostras de leite cru refrigerado, relatam que, de acordo com os requisitos da IN 51, no que diz respeito aos teores mínimos de gordura e proteína, 93% do total de amostras analisadas apresentaram resultados dentro das exigências para ambos os componentes.

No entanto, com o decorrer dos anos, o percentual de amostras que se enquadraram nas exigências do MAPA para proteína aumentaram, enquanto que para gordura diminuíram. Estes resultados coadunam com os descritos por Fonseca (2005), que 95,1% e 94,1% das amostras apresentaram resultados de acordo com os padrões estabelecidos pela IN 51 para proteína e gordura, respectivamente. Os parâmetros com melhor índice de aceitação pela legislação em vigor foram, exatamente, os teores de gordura e proteína. Somente 64,6% das amostras apresentaram resultados de acordo com todos os índices de qualidade estipulados, de maneira que se faz necessária a regulamentação sobre o destino destas amostras que apresentaram resultados em desacordo com os padrões vigentes (Fonseca, 2005).

2.8. Fatores interferentes na avaliação da qualidade do leite por métodos eletrônicos

2.8.1. Temperatura de conservação e tempo de conservação das amostras

Ainda existem dúvidas sobre qual seria o tempo máximo de armazenamento das amostras sem a ocorrência de alteração dos resultados. Marshall (1992) admite que amostras de leite adicionadas de conservante e mantidas entre zero e 4,4°C podem ser analisadas em até sete dias após a coleta.

Segundo Cassoli (2005), amostras adicionadas de azidiol, conservadas por até sete dias a 7°C, podem ser usadas na contagem bacteriana total (CBT) sem que ocorram diferenças significativas nos resultados encontrados. Souza *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes ao armazenarem amostras de leite cru refrigerado a 3,8 e 10°C durante sete dias, concluindo que estas condições de armazenamento não afetam os resultados da contagem bacteriana.

De acordo com a Federação Internacional de Laticínios (International..., 1995), para se determinar a contagem de células somáticas, amostras de leite com conservante, mantidas entre 2 e 6°C, devem ser analisadas em até três dias. Vermunt *et al.* (1995) ao analisarem amostras de leite de vaca adicionadas de bronopol, observaram decréscimo de 10% nas médias de CCS após seis semanas de armazenamento sob refrigeração, e de 16% após 10 semanas.

Amostras de leite de cabra, adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração apresentaram decréscimo nas médias geométricas da contagem de células somáticas após 10, 25 e 42 dias de 5, 6,9 e 15%, respectivamente. Esses decréscimos foram maiores quando as amostras foram adicionadas de azidiol e estocadas sob refrigeração, com reduções correspondentes a 5,8, 15,2 e 21,9% nos mesmos tempos de estocagem (Sanchez *et al.*, 2005). Em amostras de leite de ovelha preservadas com bronopol e refrigeradas, os valores de CCS reduziram 2,8% após nove dias de armazenamento (Gonzalo *et al.*, 2003).

Cassoli (2005) armazenou amostras, adicionadas de bronopol, a 7°C por até sete dias, e efetuou análises de composição centesimal e contagem de células somáticas, obtendo resultados estatisticamente semelhantes durante todo o período de armazenamento. Souza *et al.* (2005) também relatam que, amostras armazenadas sob refrigeração podem ser destinadas à análise de contagem de células somáticas em até sete dias após a coleta.

Ribas *et al.* (2003) demonstraram a influência significativa do tempo de conservação da amostra sobre a CCS. As médias apresentaram redução de valores aproximados de 580.000, no primeiro dia, para 430.000 no oitavo dia, chegando a 350.000 no 14º dia.

Paula *et al.* (2004) também relatam que os resultados da CCS foram influenciados pelo tempo de conservação da amostra. Do primeiro ao quarto dia de conservação da amostra houve redução nos valores médios da CCS de 531.000 para 469.000 céls./mL. Segundo os mesmos autores, a causa da redução da CCS com o avançar do tempo de armazenamento da amostra, embora não tenha sido investigada, pode ser atribuída à lise celular. No sétimo dia, as médias para CCS tiveram redução de 9,98% em relação ao primeiro dia de análise. Ostrensky (1999) também observou declínio de 10,7% na CCS do primeiro ao oitavo dia de conservação das amostras.

Em relação à composição dos sólidos totais, Ribas *et al.* (2004) observaram que a concentração de gordura se manteve estável até o sexto dia, declinando no sétimo dia. O teor de proteína se alterou a partir do sexto dia, enquanto o teor de lactose permaneceu estável. A concentração dos sólidos totais permaneceu inalterada até o quinto dia, apresentando declínio após o sexto dia e resultados irregulares após o oitavo dia. Sanchez *et al.* (2005) armazenaram amostras de leite de cabra, adicionadas de bronopol, sob refrigeração durante 42 dias e não observaram diferenças nos teores de proteína e sólidos totais durante todo o período de estocagem.

O congelamento de amostras de leite destinadas à contagem de células somáticas e análise de composição centesimal tem sido estudado por diversos pesquisadores. Barkema *et al.* (1997) armazenaram amostras de leite de vaca sob congelamento por até 28 dias e observaram que as médias das CCS foram significativamente menores após os períodos de estocagem, entretanto a diferença foi pequena e relativamente constante na escala logarítmica. Em experimento similar, Martinez *et al.* (2003) armazenaram amostras de leite de ovelha adicionadas de bronopol, dicromato de potássio e azidiol em temperatura de congelamento (aproximadamente 20°C

negativos) por 60 dias, sendo que o efeito do congelamento não foi significativo para amostras adicionadas de bronopol e dicromato de potássio. No entanto, quando comparadas às médias dos resultados obtidos em amostras armazenadas sob refrigeração ($5,52 \log \text{ céls./mL} \pm 0,004$) e sob congelamento ($5,37 \text{ céls./mL} \pm 0,001$) a redução nas contagens de células somáticas foi significativa.

Sanchez *et al.* (2005) congelaram amostras de leite de cabra por até 105 dias e observaram que ocorreu redução significativa do log de células somáticas em amostras conservadas com azidiol, mas em amostras adicionadas de bronopol, não houve alteração dos valores. Em relação aos teores de proteína e sólidos totais, amostras conservadas com bronopol, também não apresentaram alterações nos teores médios.

2.8.2. Uso de conservante líquido em amostras destinadas à contagem bacteriana total (CBT)

No Brasil, o uso de conservantes nas amostras de leite cru refrigerado é necessário em função do grande número de fazendas e da extensão territorial, resultando em um longo tempo decorrido entre a coleta do leite e a realização da análise nos laboratórios. Em alguns países apenas a refrigeração é responsável pela preservação das amostras, não sendo utilizados conservantes. Nestes casos, a distância entre as fazendas e os laboratórios são curtas, possibilitando a análise em, no máximo, 48 horas após a coleta (Cassoli, 2005). Para a determinação da CBT, o conservante mais recomendado, atualmente, é o azidiol. O azidiol tem ação bacteriostática, o que prolonga a vida útil da amostra. Recomenda-se que amostras conservadas com azidiol sejam analisadas em até quatro dias após a coleta, se mantidas sob refrigeração a 4°C (Gonzalo *et al.*, 2003).

O azidiol líquido é usado na conservação de amostras de leite cru refrigerado que são enviadas a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), destinadas à contagem bacteriana total em equipamento eletrônico. O azidiol é composto por azul de bromofenol, cloranfenicol, etanol, citrato de sódio e azida sódica. A adição do conservante é feita, em geral, no momento da coleta das amostras na propriedade rural, sendo recomendada a adição de três a cinco gotas do conservante por amostra para garantir a concentração de 4,79 mg de azida sódica e 0,2 mg de cloranfenicol. Este procedimento gera dificuldades aos transportadores de leite, que são os responsáveis pela coleta das amostras. Além disso, usualmente, é adicionada quantidade superior ou inferior a recomendada, o que pode resultar em alteração da amostra, afetando a análise laboratorial.

Fonseca (2005) relata que dentre as não conformidades, relacionadas ao protocolo de coleta e envio de amostras, ocorridas em 50.434 amostras de leite recebidas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG, durante o período de dezembro de 2003 a janeiro de 2005, 173 estavam relacionadas com erros na adição do conservante em amostras destinadas à contagem bacteriana. Dentre estas, 100 amostras não foram adicionadas de conservante, 52 continham conservante em excesso, cinco continham azidiol e bronopol e 16 estavam com pouco conservante. A adição errônea de conservantes, principalmente o azidiol, pode resultar em alteração dos resultados. A solução imediata desta não conformidade seria a utilização do conservante azidiol na forma sólida, a exemplo do que ocorre com o bronopol no leite destinado às análises de CCS e composição (Fonseca, 2005).

3. Capítulo 1

INFLUÊNCIA DO CONSERVANTE NO ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS DESTINADAS A ANÁLISES ELETRÔNICAS DE QUALIDADE DO LEITE CRU

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram comparar o efeito da adição do conservante azidiol nas formas líquida e de comprimido em amostras destinadas à contagem bacteriana por citometria de fluxo e avaliar a possibilidade do uso de apenas um conservante (azidiol líquido, azidiol comprimido ou bronopol) em amostras de leite cru refrigerado destinadas às análises de composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total. Seis amostras de leite foram coletadas, subdivididas e submetidas à adição dos conservantes, incubadas em três diferentes temperaturas de refrigeração (4, 7 e 10°C) e analisadas após 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Após a incubação, efetuaram-se a contagem bacteriana total em equipamento eletrônico IBC BactoCount Bentley® e de microrganismos aeróbios mesófilos em placas. As análises de composição e contagem de células somáticas foram efetuadas em equipamento eletrônico Bentley Combi System 2300®. Todas as amostras, independentemente do conservante usado, foram analisadas nos dois equipamentos. Utilizou-se o delineamento estatístico de parcelas subdivididas e os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Duncan. Os resultados médios \pm desvio padrão das contagens bacterianas em amostras adicionadas de azidiol líquido e azidiol comprimido foram $5,68 \pm 1,01$ e $5,76 \pm 0,99$ log UFC/mL, respectivamente, não havendo diferença significativa pelo teste de Duncan ($p > 0,05$). Os resultados indicaram que o azidiol comprimido pode ser usado como conservante de amostras de leite cru, em substituição ao azidiol na forma líquida, sem que haja qualquer prejuízo nos resultados das análises. O uso do conservante azidiol em amostras de leite cru destinadas às análises de composição centesimal e contagem de células somáticas não é recomendado, uma vez que diferença estatisticamente significativa nos teores de lactose e na contagem de células somáticas foi observada. O uso de bronopol em amostras destinadas à contagem bacteriana total também não é indicado por subestimar a população microbiana.

Palavras-chave: azidiol líquido, azidiol comprimido, bronopol, temperatura de armazenamento, tempo de armazenamento, leite cru e citometria de fluxo.

ABSTRACT

The objectives of the present work were to evaluate azidiol in two different presentations, tablet and liquid, as preservative for raw milk samples used for bacterial counting by flow cytometry and to evaluate the possibility of using only one preservative, i.e., bronopol, azidiol tablet or liquid for raw milk samples to be submitted to analyses of composition, somatic cells counting and total bacteria counting. Six samples were collected, subdivided for addition of the respective preservatives and incubated under different temperatures (4, 7 and 10°C) for up to 10 days analyses were done after one, three, five, seven and ten days of incubation. The total bacterial counting (TBC) was done using electronic equipment Bactocount IBC - Bentley® and

Plate Counting for mesophilic aerobic microorganism. The composition and somatic cells counting (SCC) were determined by the electronic equipment Bentley Combi System 2300[®]. All samples, regardless the preservative type, were analyzed on both equipments. The design used was split-plot, and Analysis of Variance and mean comparisons among treatments were done using Duncan Test. The means \pm standard deviations of the samples with azidiol liquid and in tablets were, respectively, 5.68 ± 1.01 and 5.76 ± 0.99 log CFU/mol, and no statistical difference was found between the two types of preservatives ($p > 0.05$). The results indicated that the tablet of azidiol can be used as preservative for raw milk samples. There were statistical differences on the levels of lactose and somatic cells of samples with azidiol submitted to analyze of composition and SCC. However bronopol is not indicated for TBC because it underestimates the microbial population.

Keywords: azidiol liquid, azidiol tablet, bronopol, temperature of storage, time of storage, raw milk, flow cytometry.

3.1. INTRODUÇÃO

O uso de conservantes para preservar amostras de leite cru no Brasil é necessário em razão das grandes distâncias existentes entre os laboratórios de análise e as fazendas produtoras. A adição do conservante bronopol às amostras destinadas à contagem de células somáticas e análise de composição do leite em equipamento eletrônico Bentley Comb System 2300[®] é recomendada desde a coleta. O bronopol, composto de 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol, natamicina e indicador de pH, é considerado bactericida. Nas amostras destinadas à contagem bacteriana total, o azidiol, por ser bacteriostático, tem sido usado com sucesso na conservação de amostras de leite cru refrigerado, que são enviadas aos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL). O azidiol é composto de azida sódica, cloranfenicol, etanol, citrato de sódio e azul de bromofenol. A azida sódica é conhecida como um inibidor do processo de respiração aeróbia, por interferir na cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria.

A adição dos conservantes é feita, em geral, no momento da coleta das amostras na propriedade rural, sendo recomendada a adição de 130 μ L de azidiol líquido ou uma

unidade de azidiol comprimido (garantindo a concentração de 4,79 mg de azida sódica e 0,2 mg de cloranfenicol) e um comprimido de bronopol naquelas destinadas às análises de composição e contagem de células somáticas. Este procedimento gera dificuldades aos transportadores de leite, que são os responsáveis pela coleta das amostras. Além disso, no caso do azidiol líquido, usualmente, é adicionada quantidade superior ou inferior a recomendada, o que pode resultar em alteração da amostra, afetando a análise laboratorial. Em função disto, foi desenvolvido pela coordenação do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (Lab-UFMG), situado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e pertencente à RBQL, em conjunto com profissionais da área farmacêutica, o azidiol na forma de comprimido, o que facilita a adição do conservante, por meio de um dosador, sem o risco do uso de dose insuficiente ou excessiva.

A coleta de duas amostras e a adição de dois conservantes diferentes resulta em aumento do tempo de coleta. A logística de transporte das duas amostras ao laboratório torna-se difícil pela necessidade de maior número de caixas isotérmicas, maior quantidade de gelo reciclável e maior custo do frete. Chegando ao laboratório, maior espaço é demandado para o armazenamento das amostras,

resultando também em maior custo para manutenção sob refrigeração. Ou seja, todo o processo de logística envolvendo a coleta, o transporte e o armazenamento seriam beneficiados, caso apenas uma amostra de leite fosse coletada para efetuar as análises físico-químicas e microbiológicas exigidas pela Instrução Normativa nº51 (Brasil, 2002). O presente trabalho teve por objetivo comparar o efeito conservador do azidiol comprimido com a sua forma líquida em amostras de leite cru destinadas à contagem bacteriana por citometria de fluxo e em amostras para contagem de células somáticas e análise de composição de leite cru, e avaliar a influência do uso do bronopol em amostras armazenadas por até 10 dias sob refrigeração destinadas à contagem bacteriana total.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Amostras

Seis amostras de leite cru refrigerado (aproximadamente dois litros por amostra) foram coletadas de silos de indústrias de laticínios de Minas Gerais no período de dezembro de 2004 a junho de 2005. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas e transportadas em condições isotérmicas em caixas contendo gelo reciclável até o Laboratório de Microbiologia, onde foram subdivididas e adicionadas de conservantes. As amostras foram subdivididas, em condições de esterilidade, em 45 subamostras de 40 mL, e então acondicionadas em frascos plásticos esterilizados com capacidade de 50 mL. Destas 45 subamostras, 15 foram adicionadas de quatro gotas de azidiol líquido (130 µL), 15 receberam a adição de uma unidade de azidiol comprimido e 15, de um comprimido de bronopol. Após a adição dos conservantes, os frascos foram homogeneizados por inversão até completa dissolução dos mesmos. A seguir, as

subamostras contendo os diferentes conservantes foram incubadas em três estufas com temperaturas de 4, 7 e 10°C durante 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Após a incubação nas três temperaturas nos diferentes tempos, efetuaram-se as análises.

As análises de composição, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Inspeção da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As análises eletrônicas do leite (composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total) foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG) e a contagem padrão em placas, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

3.2.2. Análises realizadas

Todas as amostras de leite cru foram submetidas à análise de contagem padrão de microrganismos aeróbios mesófilos em placas (Brasil, 2003) no Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Em seguida, os frascos contendo as amostras foram imediatamente encaminhados ao LabUFMG para realização da contagem bacteriana total pelo princípio de citometria de fluxo em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América (Bentley..., 2002). Posteriormente, efetuaram-se as análises de composição (International..., 2000) e contagem de células somáticas (International..., 1995) em equipamento eletrônico Bentley Combi System 2300® (Bentley ..., 1997; Bentley..., 1998), calibrado com amostras padrão de leite cru de origem canadense (International..., 1995; International..., 2000).

3.2.2.1. Contagem padrão em placas

No momento da análise das amostras, foram preparadas diluições decimais sucessivas empregando como diluente a água peptonada tamponada a 0,1%. Foi transferido, a partir de três diluições selecionadas, 1 mL do diluído para placas de Petri, em duplicata. Em seguida, foi vertido nas placas, sobre o inóculo, o meio de cultura ágar padrão para contagem (Difco). Após a realização de movimentos circulares nas placas (visando a incorporação do inóculo ao meio de cultura) e a solidificação do ágar, as placas foram incubadas invertidas em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 3 horas. Após a incubação, foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) (Brasil, 2003).

3.2.2.2. Contagem bacteriana total

A contagem bacteriana total foi efetuada em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América (Bentley..., 2002), que tem por princípio a citometria de fluxo. Na análise em equipamento eletrônico, a amostra de leite contendo conservante foi aspirada para a cavidade do carrossel circular em rotação, onde foi aquecida a 50°C . Durante este período o material de análise entrou em contato com uma solução de incubação constituída por enzimas proteolíticas e brometo de etídio, usado como marcador fluorescente de DNA (Bentley..., 2002). Esta solução teve como objetivo lisar células somáticas, solubilizar glóbulos de gordura e proteínas, permeabilizar bactérias e corar o DNA. Durante a incubação a mistura foi *sonicada* por meio de duas sondas ultrassônicas para auxiliar a quebra de partículas interferentes, romper colônias bacterianas remanescentes para melhorar a detecção de bactérias individuais e reduzir a fluorescência de fundo. Após o período de incubação, uma porção da mistura foi transferida para o citômetro de fluxo onde as

bactérias foram alinhadas dentro de um tubo capilar e expostas a um raio *laser* quando ocorreu a emissão de fluorescência a partir das moléculas de brometo de etídio. O brometo de etídio é um corante fluorescente específico que penetra nas células bacterianas e células somáticas se ligando ao RNA e DNA das mesmas. Quando excitadas pelo *laser*, as células passam a emitir radiação em comprimento de onda de 620 nm, que é coletada pelo sistema óptico do equipamento (Barrientos *et al.*, 2000). O sinal fluorescente após ser coletado pelos receptores ópticos, foi filtrado e captado por um foto-multiplicador. A intensidade e a amplitude dos pulsos de fluorescência foram registradas e usadas como parâmetros para os resultados. Os pulsos captados foram traduzidos em contagem individual de bactérias e, finalmente, em UFC/mL após transformação estatística automática baseada em uma curva de calibração previamente elaborada. O equipamento foi automaticamente limpo após cada análise, por retro-lavagem, com solução tampão (RBS) (Bentley ..., 2002; Broutin, 2004; Fonseca, 2005).

3.2.2.3. Composição centesimal

A análise composicional e a contagem de células somáticas foram realizadas no equipamento Bentley Combi System 2300®, composto por uma unidade do equipamento Bentley 2000 trabalhando conjuntamente com uma unidade do equipamento Somacount 300, com capacidade de até 300 amostras por hora.

O equipamento Bentley 2000 realiza análise por meio da mensuração da absorção de energia, utilizando quatro comprimentos de onda selecionados por quatro filtros, os quais passam por um feixe de raio *laser* durante cada ciclo de análise. Três destes comprimentos de onda são específicos para alguns macrocomponentes ($5,73\mu\text{m}$ para gordura, $6,46\mu\text{m}$ para proteína e $9,53\mu\text{m}$ lactose) e o quarto trata-se de um

comprimento de referência (Bentley..., 1998; International..., 2000).

A amostra de leite, aquecida a 40°C, é agitada, aspirada e finalmente homogeneizada, a fim de reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura, e recebe irradiação pelo feixe de luz infravermelha em uma cubeta. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho e é quantificada e transformada automaticamente em teores de componentes, tendo como referência a curva de calibração (Bentley..., 1998; Fonseca, 2005).

As calibrações do equipamento Bentley Combi System 2300[®] foram realizadas mensalmente no laboratório LabUFMG com checagem quinzenal, usando amostras padrão elaboradas no Canadá.

3.2.2.4. Contagem de células somáticas

A contagem de células somáticas foi realizada no equipamento Bentley Combi System 2300[®], que tem como princípio básico a citometria de fluxo. Uma alíquota da amostra, pré aquecida a 40°C, é sugada para dentro do equipamento e levada a uma seringa contendo o corante tampão. O instrumento requer o uso do corante fluorescente brometo de etídio (pastilhas de Glocount[™] - Bentley..., 1997), para corar o DNA das células. Em seguida 50µL da amostra são conduzidos por um fluido carreador para o citômetro de fluxo, onde recebem incidência de raio *laser*. A luz emitida passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de onda apropriados e é captada como pulso elétrico. Este pulso é ampliado, filtrado e convertido em contagem de células somáticas (Bentley..., 1997).

3.2.3. Análise estatística

Utilizou-se o delineamento estatístico de parcelas subdivididas, em que cada amostra assumiu o papel de um bloco e os tratamentos foram dispostos em arranjo fatorial 3 X 3 X 5, sendo três temperaturas de incubação nas parcelas e o fatorial 3 X 5 (três conservantes X cinco tempos de análise) nas subparcelas (Sampaio, 2002). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Duncan. Os resultados originais obtidos de CCS (contagem de células somáticas) e de UFC (unidades formadoras de colônias/mL) por equipamento eletrônico ou por contagem em placas foram transformados para logaritmo na base 10 (Log₁₀).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise das médias do logaritmo de UFC, em relação ao efeito do conservante, verificou-se que não houve diferença significativa entre as amostras que foram adicionadas de azidiol líquido e azidiol comprimido (Tabela 3.1). Este resultado indica que o azidiol na forma líquida, conservante atualmente usado nos laboratórios da RBQL, pode ser substituído pela forma de comprimido, sem que haja qualquer prejuízo nos resultados das análises. Esta substituição proporcionará maior facilidade aos responsáveis pela coleta das amostras de leite, que são geralmente os próprios carreteiros. Além disso, espera-se que ocorra um menor número de não conformidades ocorridas em amostras de leite que são recebidas diariamente nos Laboratórios da RBQL. De acordo com Fonseca (2005), dentre as não conformidades, relacionadas ao protocolo de coleta e envio de amostras, ocorridas em 50.434 amostras de leite recebidas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG, durante o período de dezembro de 2003 a

janeiro de 2005, 173 estavam relacionadas com erros na adição do conservante, em amostras destinadas à contagem bacteriana. Dentre estas, 100 amostras não foram adicionadas de conservante, 52 continham conservante em excesso, cinco continham azidiol e bronopol e 16 estavam com pouco conservante. A adição errônea de conservantes, principalmente o azidiol, pode resultar em alteração dos resultados na contagem bacteriana (Fonseca, 2005).

Na Figura 3.1 estão mostradas as médias das contagens bacterianas por citometria de fluxo nas amostras adicionadas de azidiol líquido e azidiol comprimido durante armazenamento por até 10 dias em

temperatura de refrigeração. Pode ser observado que não houve diferença estatística significativa entre as duas formas de conservante. Os comprimidos de azidiol foram elaborados de acordo com um criterioso protocolo de produção da indústria farmacêutica, o que garante que as concentrações de azida sódica e cloranfenicol que constam nos comprimidos, sejam as mesmas contidas no conservante líquido. Esta equivalência de princípio ativo e a boa solubilidade da formulação testada resultaram em igualdade entre os tratamentos com as diferentes formas de azidiol, líquido e comprimido.

Tabela 3.1. Média e desvio-padrão dos resultados de contagem bacteriana, por citometria de fluxo, de amostras de leite cru refrigerado em função do conservante adicionado.

Conservante	Médias das contagens por citometria de fluxo (log UFC/mL)	Desvio-padrão (DP)
Azidiol comprimido	5,76 ^A	0,99
Azidiol líquido	5,68 ^A	1,01

^A Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($p > 0,05$)

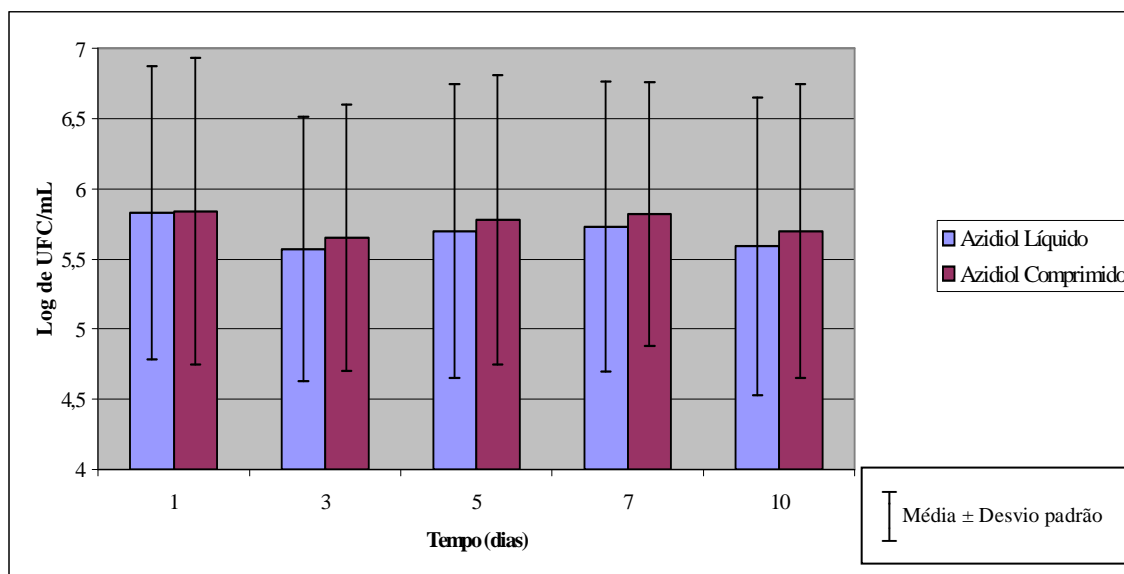


Figura 3.1. Médias das contagens bacterianas por citometria de fluxo em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido e azidiol comprimido durante armazenamento por 10 dias em temperatura de refrigeração.

Em relação à influência do azidiol em sua forma líquida ou em comprimido na conservação de amostras de leite cru destinadas às análises de composição centesimal, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os teores de extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD) e lactose. No entanto, os dados apresentados pela Tabela 3.2, referentes às análises dos teores médios de EST e ESD, em relação ao efeito dos conservantes, demonstram que não ocorreu diferença estatística significativa pelo teste de Duncan ($p > 0,05$) entre o conservante bronopol e o azidiol na forma líquida, mas sim, entre os dois conservantes citados e o azidiol comprimido. Quanto às médias de lactose, o efeito do conservante azidiol (forma líquida e em comprimido) foi diferente em relação ao bronopol, sendo observada redução dos valores (Tabela 3.2). Estes resultados coadunam com os de Cassoli (2005), que também observou resultados médios inferiores nas análises de teor de lactose quando o conservante azidiol foi usado. Cassoli (2005) relatou ainda que os teores médios de gordura também reduziram, o que não foi observado neste experimento (Tabela 3.2). Os teores médios de proteína também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos estudados (Tabela 3.2).

Sanchez *et al.* (2005) obtiveram menores médias dos teores de proteína, lactose, gordura e sólidos totais em amostras de leite

de cabra conservadas com azidiol, quando comparadas com amostras adicionadas de bronopol.

A partir dos resultados dos teores de EST, ESD e lactose (Figuras 3.2, 3.3 e 3.4), observa-se que os valores obtidos quando o bronopol foi usado como conservante foram ligeiramente superiores aos obtidos quando o azidiol líquido foi usado, sugerindo que, assim como ocorre com o azidiol comprimido, também o comprimido de bronopol contribui para a elevação dos valores citados. Estas observações também foram relatadas em outros estudos realizados com amostras de leite de vaca (Lee *et al.*, 1986) em que amostras adicionadas de bronopol apresentaram maiores teores de proteína do que amostras não adicionadas de conservante ou do que amostras conservadas com dicromato de potássio (Bertrand, 1996). Sanchez *et al.* (2005) em análises de leite de cabra, relatam que amostras adicionadas de bronopol apresentaram maiores médias de proteína, lactose e sólidos totais.

Leite cru adicionado de azidiol comprimido apresentou maiores concentrações de EST, ESD e lactose em função de sua composição. Para ser usado em substituição ao bronopol, novas pesquisas são necessárias visando esclarecer possíveis efeitos das substâncias químicas contidas no excipiente do azidiol comprimido na determinação dos componentes do leite.

Tabela 3.2. Média e desvio padrão de diferentes parâmetros físico-químicos de amostras de leite cru refrigerado adicionadas de conservantes.

Conservante	Parâmetros (g/100 g)				
	Gordura (Média \pm s)	Proteína (Média \pm s)	Lactose (Média \pm s)	ESD (Média \pm s)	EST (Média \pm s)
Azidiol comprimido	3,67 \pm 0,14 ^A	3,21 \pm 0,15 ^A	4,53 \pm 0,12 ^A	8,74 \pm 0,14 ^A	12,38 \pm 0,23 ^A
Bronopol	3,68 \pm 0,13 ^A	3,19 \pm 0,12 ^A	4,36 \pm 0,10 ^B	8,52 \pm 0,12 ^B	12,20 \pm 0,18 ^B
Azidiol líquido	3,67 \pm 0,14 ^A	3,20 \pm 0,14 ^A	4,33 \pm 0,11 ^C	8,50 \pm 0,16 ^B	12,17 \pm 0,22 ^B

^{A,B}Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

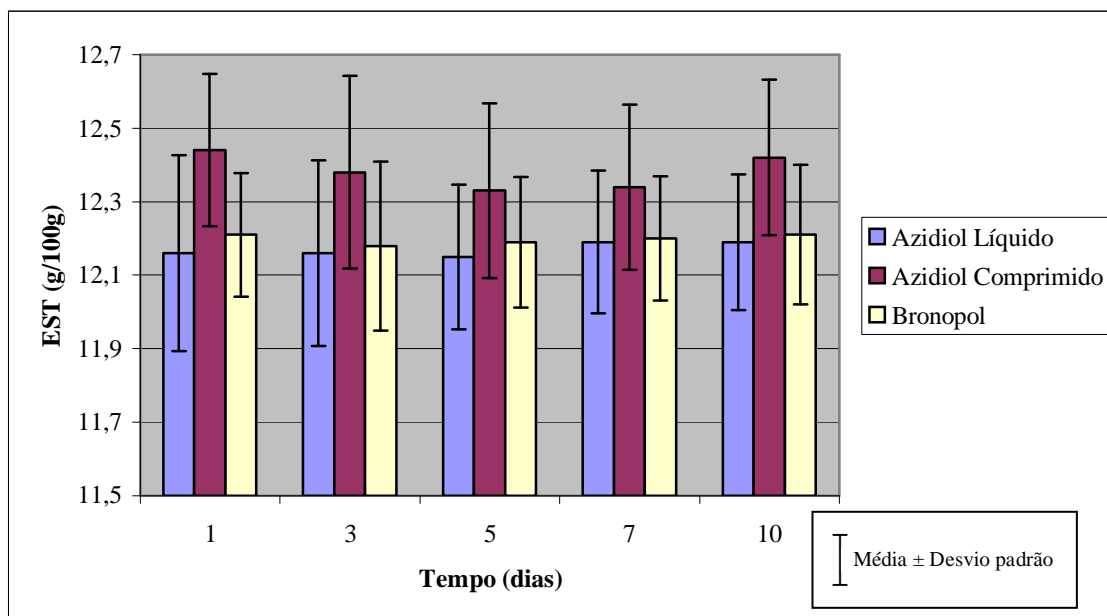


Figura 3.2. Médias dos valores de extrato seco total (EST) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.

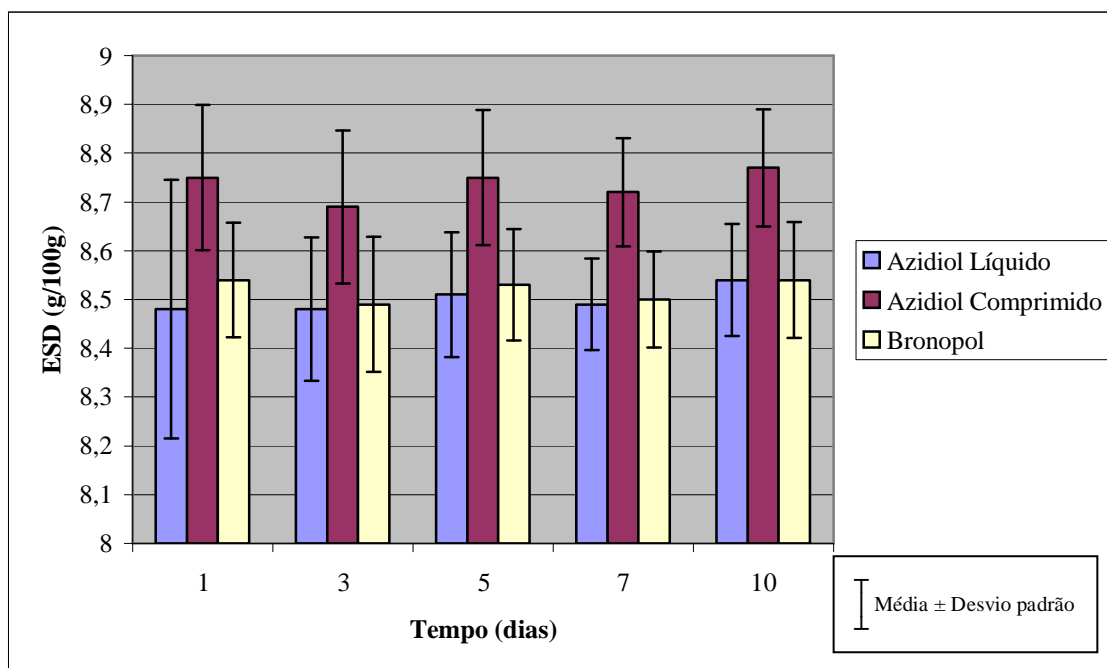


Figura 3.3. Médias dos valores de extrato seco desengordurado (ESD) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.

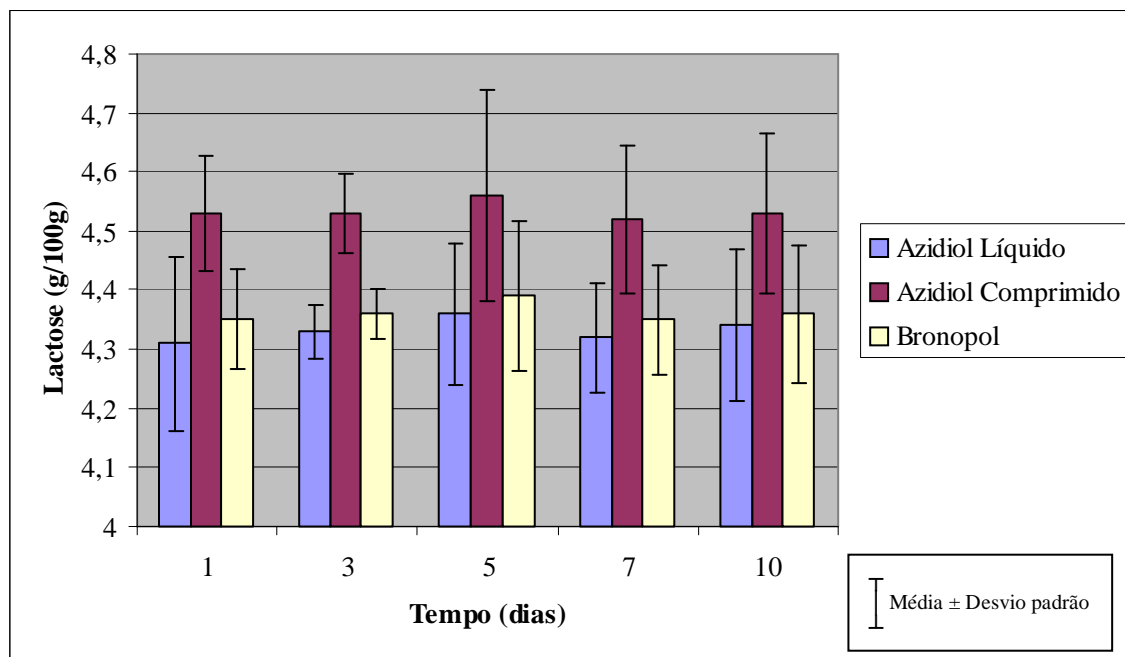


Figura 3.4. Médias dos valores de lactose em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.

Observou-se redução significativa das contagens de células somáticas (CCS) em amostras adicionadas do conservante azidiol, em suas duas formas de apresentação (Tabela 3.3). Estes resultados coadunam com os de Martinez *et al.* (2003) que observaram valores médios de CCS de 5,52 log céls./mL e 5,34 log céls./mL em amostras de leite de ovelha adicionadas de bronopol e azidiol, respectivamente. Sanchez *et al.* (2005) também observaram resultados médios inferiores na CCS, quando o conservante azidiol (5,803 log

céls./mL) foi usado em comparação com o bronopol (5,877 log céls./mL) em amostras de leite de cabra, assim como outros autores em amostras de leite de ovelha (Gonzalo *et al.*, 2003 e Gonzalo *et al.*, 2004) e em amostras de leite de vaca (Cassoli, 2005). Ardo (1982), sugere que o bronopol possibilite uma melhor difusão do brometo de etídio nas células, propiciando um sinal de fluorescência mais intenso quando a CCS é efetuada pelo princípio de citometria de fluxo, em equipamentos eletrônicos.

Tabela 3.3. Média e desvio-padrão dos resultados da CCS (log céls./mL) e da CBT (log UFC/mL) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de conservantes.

Conservante	Parâmetros	
	CCS (log céls./mL)	CBT (log UFC/mL)
Bronopol	5,52 ± 0,25 ^A	5,53 ± 0,96 ^B
Azidiol comprimido	5,48 ± 0,25 ^B	5,76 ± 0,99 ^A
Azidiol líquido	5,47 ± 0,25 ^B	5,68 ± 1,01 ^A

^{A,B} Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

Com base nos resultados obtidos, o azidiol líquido pode ser usado como conservante de amostras destinadas às análises de contagem bacteriana total e composição centesimal, exceto na determinação do teor de lactose. Entretanto, ainda assim, seria necessária a coleta de uma segunda amostra de leite cru, adicionada de bronopol para as análises de lactose e CCS, o que não justificaria a alteração nos procedimentos de coleta.

Não houve interação entre o efeito dos conservantes e os tempos e as temperaturas de armazenamento, quando o azidiol foi usado em amostras de leite cru refrigerado destinadas às análises de composição centesimal e contagem de células somáticas.

Em relação ao uso do conservante bronopol em amostras de leite cru refrigerado destinadas à contagem bacteriana em equipamento eletrônico, verificou-se que o efeito do conservante foi estatisticamente significativo pelo teste de Duncan ($p < 0,05$), com redução das contagens em comparação com amostras adicionadas de azidiol (Tabela 3.3 e Figura 3.5). Cassoli (2005) obteve resultados semelhantes aos encontrados neste experimento, e segundo o autor, tal fato pode ser explicado pela ação bactericida do bronopol, que provoca danos às células bacterianas, não permitindo a sua identificação pelo sistema óptico do equipamento eletrônico.

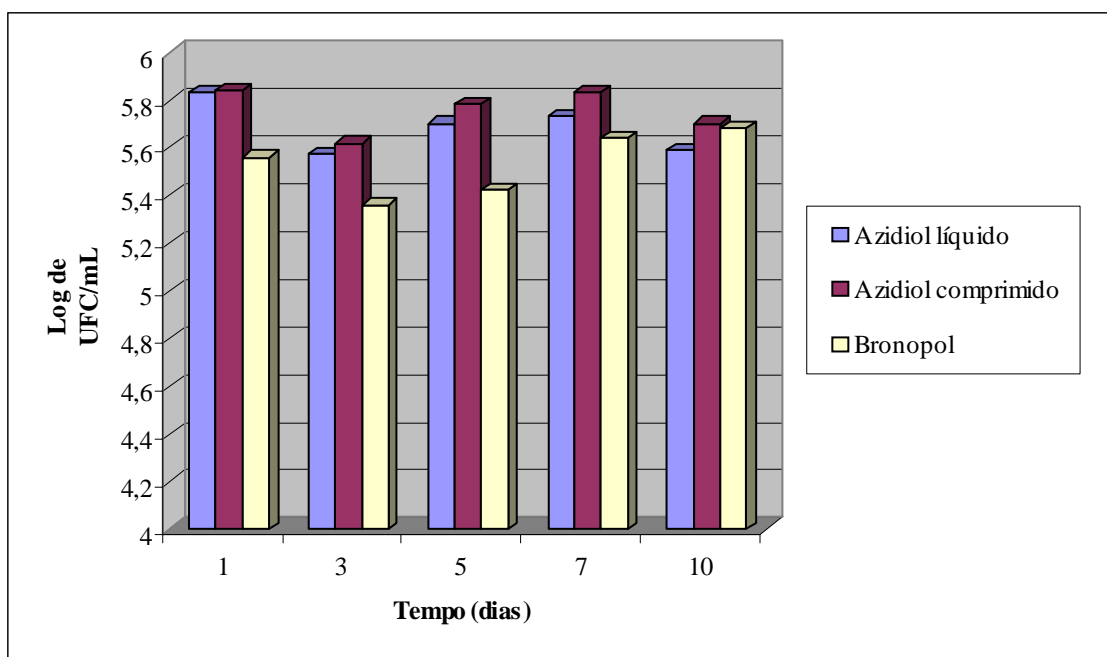


Figura 3.5. Médias das contagens bacterianas por citometria de fluxo em amostras de leite cru refrigerado, adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol, armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.

Quando o bronopol foi usado em amostras destinadas à contagem padrão em placas, houve interação entre os efeitos de conservante e tempo (Tabela 3.4). Embora as médias obtidas em amostras conservadas com bronopol sejam inferiores às obtidas em amostras conservadas com o azidiol líquido e

comprimido, apenas em amostras com um dia de armazenamento, esta redução foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Nos demais dias, os efeitos dos três conservantes foram iguais, já que o azidiol promoveu redução nas contagens no decorrer do armazenamento, ocasionando a aproximação

das médias dos diferentes conservantes. É interessante observar que, embora o bronopol seja considerado uma substância bactericida, ele não promoveu a redução das contagens

bacterianas em placas, havendo, inclusive, um ligeiro aumento da população durante o armazenamento, porém, não estatisticamente significativo (Figura 3.6).

Tabela 3.4. Média das contagens padrão em placas (log de UFC/mL) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de conservante e armazenadas sob refrigeração.

Conservante	Tempo				
	1	3	5	7	10
Azidiol Líquido	6,01 ^{Aa}	5,94 ^{ABa}	5,70 ^{ABa}	5,66 ^{ABa}	5,52 ^{Ba}
Azidiol Comprimido	6,07 ^{Aa}	5,98 ^{Aa}	5,84 ^{Aa}	5,76 ^{Aa}	5,70 ^{Aa}
Bronopol	5,51 ^{Ab}	5,55 ^{Aa}	5,54 ^{Aa}	5,63 ^{Aa}	5,65 ^{Aa}

A, B, a, b Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas e minúsculas nas linhas e colunas, respectivamente, não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

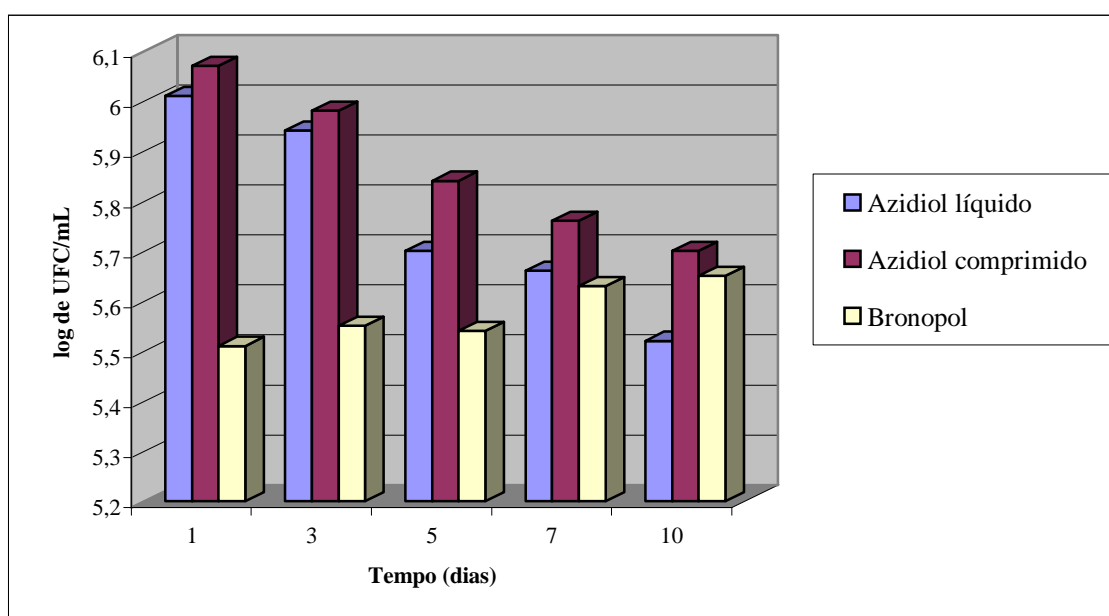


Figura 3.6. Médias das contagens padrão em placas em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.

3.4. CONCLUSÕES

O azidiol comprimido pode ser usado, como conservante de amostras de leite cru, em substituição ao azidiol na forma líquida, sem que haja qualquer prejuízo nos resultados das contagens bacterianas por citometria de fluxo.

O uso do conservante azidiol em amostras destinadas às análises de composição

centesimal e de contagem de células somáticas não é recomendado pelas interferências na determinação do teor de lactose e na contagem de células somáticas.

Não é indicado o uso do bronopol em amostras destinadas à contagem bacteriana total, por subestimar a população microbiana no leite cru.

4. Capítulo 2

EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO EM AMOSTRAS SUBMETIDAS ÀS ANÁLISES ELETRÔNICAS DA QUALIDADE DO LEITE CRU

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade do uso de amostras conservadas por azidiol e bronopol na contagem bacteriana de leite cru e nas análises de composição e contagem de células somáticas, respectivamente, a 30°C por até oito dias de armazenamento e sob refrigeração (4, 7 e 10°C) por até 10 dias. As análises de composição e contagem de células somáticas foram efetuadas em equipamento eletrônico Bentley Combi System 2300® e a avaliação da contagem bacteriana total foi realizada em equipamento eletrônico IBC BactoCount (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América) e por contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em placas. O delineamento adotado foi em parcelas subdivididas, tendo sido realizadas a análise de variância e a comparação das médias usando-se o teste de Duncan. Concluiu-se que amostras armazenadas a 30°C podem ser analisadas, quanto à contagem de células somáticas e análise de composição centesimal até o quinto e quarto dia, respectivamente, após a coleta. Amostras destinadas às análises de contagem de células somáticas e composição centesimal armazenadas sob refrigeração, podem ser analisadas em até dez dias após a coleta das mesmas. Amostras destinadas à contagem bacteriana não podem ser armazenadas em temperatura ambiente, sendo que, em temperatura de refrigeração podem ser mantidas por até dez dias.

Palavras-chave: qualidade de leite, leite cru, temperatura de armazenamento, tempo de armazenamento, bronopol, azidiol, citometria de fluxo.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the viability of using raw milk samples conserved with azidiol or bronopol for analysis of, respectively, total bacterial count (TBC), the somatic cell count (SCC) and composition, at room temperature for until eight days of storage and under refrigeration (4, 7 and 10°C) for until ten days. An electronic equipment, Bentley Combi System 2300® was used for the composition and SCC analyses. The total bacterial counting (TBC) was done using an electronic equipment Bactocount IBC - Bentley® and standard plate counting for mesophilic aerobic microorganisms. The design was split-split, and the results were evaluated by Analysis of Variance with analysis of minimal significant difference by Duncan Test. The results show that samples stored at 30°C can be analyzed for composition and SCC until the fourth and fifth day, respectively, after collection. Cooled samples can be analyzed for composition, SCC and TBC until 10 days after collection. However the samples are not suitable for TBC if stored at room temperature.

Keywords: milk quality, raw milk, temperature of storage, time of storage, bronopol, azidiol, flow cytometry.

4.1. INTRODUÇÃO

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade de Leite (RBQL) visando monitorar a qualidade do leite estabelecida pela Instrução Normativa nº51 (BRASIL, 2002), por meio da geração de dados de composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total nas diferentes regiões. Estes laboratórios possuem equipamentos eletrônicos que analisam, com rapidez e precisão, um grande número de amostras de leite por hora. As amostras de leite cru refrigerado destinadas às análises de composição e contagem de células somáticas são adicionadas do conservante bronopol e àquelas destinadas ao equipamento de contagem bacteriana total são adicionadas do conservante azidiol. A adição destes conservantes é efetuada no momento da coleta das amostras, nas propriedades rurais, visando possibilitar a manutenção das características físico-químicas e microbiológicas do leite cru desde o momento da coleta até a análise destas nos laboratórios credenciados. Durante o transporte, as amostras são conservadas sob refrigeração, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e chegando aos laboratórios são mantidas em geladeira até o momento das análises, o que deve ocorrer em no máximo quatro dias. Pouco se sabe a respeito das alterações pelas quais as amostras adicionadas de conservantes passam no decorrer do intervalo entre a coleta e a análise, havendo dúvidas sobre o tempo e a temperatura máximos a que as amostras podem ser submetidas sem que ocorra comprometimento dos resultados. Sendo assim, com o objetivo de avaliar o efeito do armazenamento em temperatura ambiente e sob refrigeração de amostras de leite cru, adicionadas de bronopol e azidiol, nas análises de composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total, foi realizado este trabalho.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Amostras

Seis amostras de leite cru refrigerado (aproximadamente três litros por amostra) foram coletadas de silos de indústrias de laticínios de Minas Gerais no período de dezembro de 2004 a junho de 2005. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas e transportadas em condições isotérmicas em caixas contendo gelo reciclável até o Laboratório de Microbiologia, onde foram subdivididas e adicionadas de conservantes. As amostras foram subdivididas, em condições de esterilidade, em 69 subamostras de 40 mL, e então acondicionadas em frascos plásticos esterilizados com capacidade de 50 mL. Destas 69 subamostras, 23 foram adicionadas de quatro gotas de azidiol líquido (130 µL), 23 receberam a adição de uma unidade de azidiol comprimido e 23, de um comprimido de bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) na concentração de oito miligramas do ingrediente ativo para cada 40 mL da amostra. Após a adição dos conservantes, os frascos foram homogeneizados por inversão até completa dissolução dos conservantes, foram então, incubados nas temperaturas de armazenamento, sendo, 24 subamostras em estufa a 30°C, 15 sub-amostras a 4°C, outras 15 a 7°C e as últimas a 10°C. As subamostras incubadas a 30°C foram analisadas no dia da coleta e nos sete dias subsequentes, enquanto aquelas incubadas sob refrigeração foram analisadas após um, três, cinco, sete e 10 dias de armazenamento. Após a incubação nas quatro temperaturas nos diferentes tempos, efetuaram-se as análises.

As análises de composição, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos foram realizadas nos laboratórios do Departamento

de Tecnologia e Inspeção da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As análises eletrônicas do leite (composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total) foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG) e a contagem bacteriana padrão em placas, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

4.2.2. Análises realizadas

Nas amostras contendo bronopol foram efetuadas as análises de composição e contagem de células somáticas em equipamento eletrônico Bentley Combi System 2300[®] (Bentley..., 1997; Bentley..., 1998), calibrado com amostras padrão de origem canadense. Em relação às amostras contendo azidiol, inicialmente foi realizada a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em placas (Brasil, 2003), no Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Em seguida, os frascos contendo as amostras foram imediatamente encaminhados ao LabUFMG onde se procedeu a avaliação da contagem bacteriana total em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley[®] (Bentley..., 2002).

4.2.2.1. Contagem padrão em placas

No momento da análise das amostras, foram preparadas diluições sucessivas empregando como diluente a água peptonada tamponada a 0,1%. Foi transferido, a partir de três diluições selecionadas, 1 mL do diluído para placas de Petri, em duplicata. Em seguida, foi vertido nas placas, sobre o inóculo, o meio de cultura ágar padrão para contagem (DIFCO). Após a realização de movimentos circulares nas placas (visando a incorporação do inóculo ao meio de cultura) e a solidificação do ágar, as placas foram incubadas invertidas em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 3 horas. Após a incubação, foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) (Brasil, 2003).

4.2.2.2. Contagem bacteriana total

A contagem bacteriana total foi efetuada em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley Instruments Incorporated[®], Chaska, Estados Unidos da América (Bentley..., 2002), que tem por princípio a citometria de fluxo. Na análise em equipamento eletrônico, a amostra de leite contendo conservante foi aspirada para a cavidade do carrossel circular em rotação, onde foi aquecida a 50°C . Durante este período o material de análise entrou em contato com uma solução de incubação constituída por enzimas proteolíticas e brometo de etídio, usado como marcador fluorescente de DNA (Bentley..., 2002). Esta solução teve como objetivo lisar células somáticas, solubilizar glóbulos de gordura e proteínas, permeabilizar bactérias e corar o DNA. Durante a incubação a mistura foi *sonicada* por meio de duas sondas ultrassônicas para auxiliar a quebra de partículas interferentes, romper colônias bacterianas remanescentes para melhorar a detecção de bactérias individuais e reduzir a fluorescência de fundo.

Após o período de incubação, uma porção da mistura foi transferida para o citômetro de fluxo onde as bactérias foram alinhadas dentro de um tubo capilar e expostas a um raio *laser* quando ocorreu a emissão de fluorescência a partir das moléculas de brometo de etídio. O sinal fluorescente foi coletado pelos receptores ópticos, filtrado e captado por um fotomultiplicador. A intensidade e a amplitude dos pulsos de fluorescência foram registradas e usadas como parâmetros para os resultados. Os pulsos captados foram traduzidos em contagem individual de bactérias e, finalmente, em UFC/mL após transformação estatística automática baseada em uma curva de calibração previamente elaborada. O equipamento foi automaticamente limpo após cada análise, por retro-lavagem, com solução tampão (RBS) (Bentley..., 2002; Broutin, 2004; Fonseca, 2005).

4.2.2.3. Composição centesimal

A análise composicional e a contagem de células somáticas foram realizadas no equipamento Bentley Combi System 2300[®], composto por uma unidade do equipamento Bentley 2000 trabalhando conjuntamente com uma unidade do equipamento Somacount 300, com capacidade de até 300 amostras por hora.

O equipamento Bentley 2000 realiza análise por meio da mensuração da absorção de energia, utilizando quatro comprimentos de onda selecionados por quatro filtros, os quais passam por um feixe de raio *laser* durante cada ciclo de análise. Três destes comprimentos de onda são específicos para alguns macro componentes (5,73 μ m para gordura, 6,46 μ m para proteína e 9,53 μ m lactose) e o quarto trata-se de um comprimento de referência (Bentley..., 1998; International..., 2000).

A amostra de leite, aquecida a 40°C, é agitada, aspirada e finalmente homogeneizada, a fim de reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura, e recebe irradiação pelo feixe de luz infravermelha em uma cubeta. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho e é quantificada e transformada automaticamente em teores de componentes, tendo como referência a curva de calibração (Bentley..., 1998; Fonseca, 2005).

As calibrações do equipamento Bentley Combi System 2300[®] foram realizadas mensalmente no laboratório LabUFMG com checagem quinzenal, usando amostras padrão elaboradas no Canadá.

4.2.2.4. Contagem de células somáticas

A contagem de células somáticas foi realizada no equipamento Bentley Combi

System 2300[®], que tem como princípio básico a citometria de fluxo. Uma alíquota da amostra, pré aquecida a 40°C, é sugada para dentro do equipamento e levada a uma seringa contendo o corante tampão. O instrumento requer o uso do corante fluorescente brometo de etídio (pastilhas de Glocount[™] - Bentley..., 1997), para corar o DNA das células. Em seguida, 50 μ L da amostra são conduzidos por um fluido carreador para o citômetro de fluxo, onde recebem incidência de raio *laser*. A luz emitida passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de onda apropriados e é captada como pulso elétrico. Este pulso é ampliado, filtrado e convertido em contagem de células somáticas (Bentley..., 1997).

4.2.3. Análise estatística

Na análise estatística dos resultados encontrados nas amostras armazenadas a 30°C utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, em que cada amostra assumiu o papel de um bloco, sendo os tratamentos os tempos de incubação. Foram realizadas a análise de variância e a comparação das médias usando-se o teste de Duncan de acordo com Sampaio (2002). Os resultados originais de CCS (contagem de células somáticas) e UFC (unidades formadoras de colônias) obtidas por equipamento eletrônico ou por contagem em placas foram transformados para logaritmo na base 10 (Log_{10}).

Para a análise dos resultados das amostras incubadas sob refrigeração utilizou-se o delineamento em parcelas subdivididas, testando o fatorial 3 X 5 (três temperaturas nas parcelas e cinco tempos nas subparcelas), com seis repetições. Foram realizadas a análise de variância e a comparação das médias usando-se o teste de Duncan de acordo com Sampaio (2002). Os resultados originais de CCS (contagem de células somáticas) e UFC (unidades formadoras de colônias) obtidas por

equipamento eletrônico ou por contagem em placas foram transformados para logaritmo na base 10 (Log_{10}).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias, desvio-padrão e os valores mínimos e máximos dos resultados obtidos nas análises de composição centesimal e contagem de células somáticas, efetuadas em equipamentos eletrônicos, de amostras de leite cru refrigerado, armazenadas a 30°C por oito dias, podem ser vistas na Tabela 4.1. Não houve diferença significativa entre as médias dos teores de extrato seco desengordurado, proteína e gordura durante o período de armazenamento (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3). As médias dos demais parâmetros analisados apresentaram diferenças nos resultados no decorrer do armazenamento (Tabela 4.2). Os teores de extrato seco total se reduziram, progressivamente, durante todo o período, mas nos quatro primeiros dias não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Quanto às concentrações de lactose e às contagens de células somáticas, esta redução também pode ser observada, sendo que apenas após cinco dias de armazenamento, os resultados foram considerados diferentes.

Estes resultados são preocupantes, visto que parte das amostras analisadas no Brasil não é armazenada nas temperaturas recomendadas, sendo enviadas aos laboratórios em temperatura ambiente (Souza *et al.*, 2005). De acordo com Brito *et al.* (2003), apenas 60% do total das amostras de leite proveniente dos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro chegam aos laboratórios em até cinco dias após a coleta. Nessa situação, valores subestimados da contagem de células somáticas em amostras de leite do rebanho podem causar prejuízos à indústria, caso se adote o critério de pagamento pela qualidade com base na CCS. Além disso, causam também prejuízos ao produtor, que tem um falso indicador do

estado de saúde da glândula mamária do rebanho (Souza *et al.*, 2005).

Souza *et al.* (2005) encontraram resultados semelhantes quando as amostras de leite cru refrigerado, destinadas à contagem de células somáticas, foram armazenadas em temperaturas de 27, 32 e 36°C, por períodos de um, três, cinco e sete dias. Em temperaturas de 27 e 32°C os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa por até três dias de armazenamento, enquanto que a 36°C houve diferença nos resultados obtidos após o primeiro dia. De acordo com Cassoli (2005), amostras armazenadas a 24°C podem ser analisadas, quanto à composição centesimal, até o quinto dia após a coleta da amostra.

Gonzalo *et al.* (2003) ao efetuar a contagem de células somáticas em amostras de leite de ovelha concluiu que amostras mantidas sob refrigeração apresentaram médias mais elevadas do que aquelas mantidas em temperatura ambiente. Os autores sugerem que esta diferença se deva ao fato da refrigeração conservar a integridade da célula somática.

A Federação Internacional de Laticínios (International..., 1995) estabelece que para a determinação da contagem de células somáticas e a composição centesimal, as amostras de leite com conservante, devem ser mantidas entre dois e 6°C, por até três dias. No entanto, dados de laboratórios que realizam análises para a determinação da qualidade do leite no Brasil, mostram que, uma alta porcentagem de amostras é enviada ao laboratório em temperatura ambiente e analisada após cinco dias de coleta (Brito *et al.*, 2003; Ribas *et al.*, 2003). Isso indica a necessidade de adequar os procedimentos de coleta, envio de amostras e realização de análises a condições que não propiciem distorções nos resultados ocasionando possíveis prejuízos ao setor produtivo laticinista e aos produtores de leite.

Tabela 4.1. Média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo dos resultados de composição centesimal e contagem de células somáticas em amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 30 °C durante oito dias.

Variáveis analisadas	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Extrato Seco Total (g/100g)	12,06 ± 0,23	11,48	12,48
Extrato seco desengordurado (g/100g)	8,51 ± 0,18	7,91	8,86
Lactose (g/100g)	4,27 ± 0,18	3,80	4,46
Proteína (g/100g)	3,26 ± 0,16	2,85	3,64
Gordura (g/100g)	3,55 ± 0,24	2,62	3,93
Contagem de células somáticas (log céls./mL)	5,34 ± 0,32	4,46	5,85

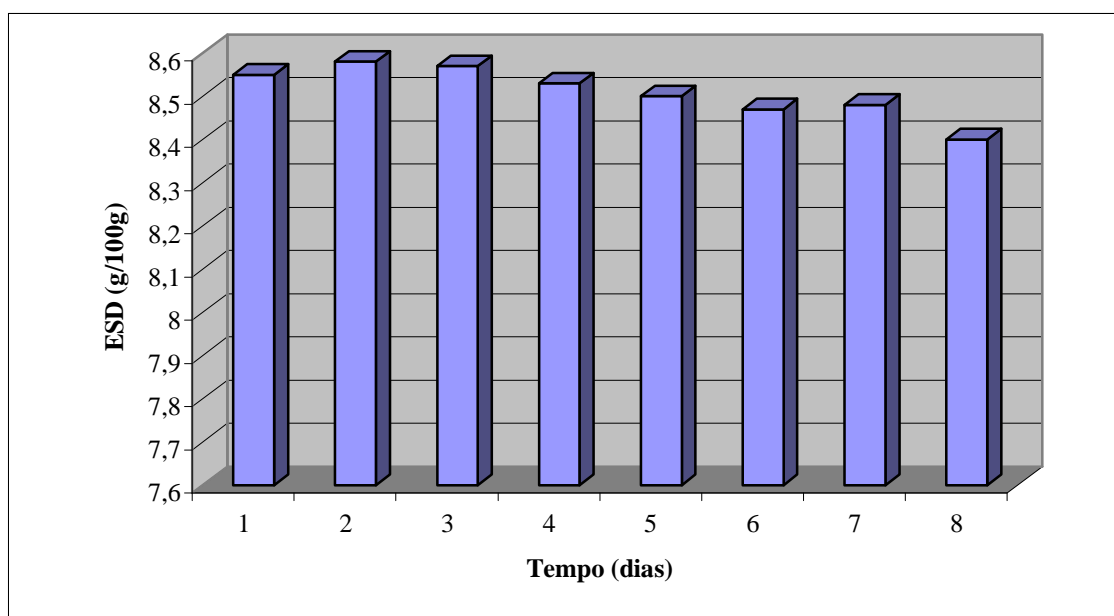


Figura 4.1. Médias dos valores de extrato seco desengordurado (ESD) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas a 30 °C durante oito dias.

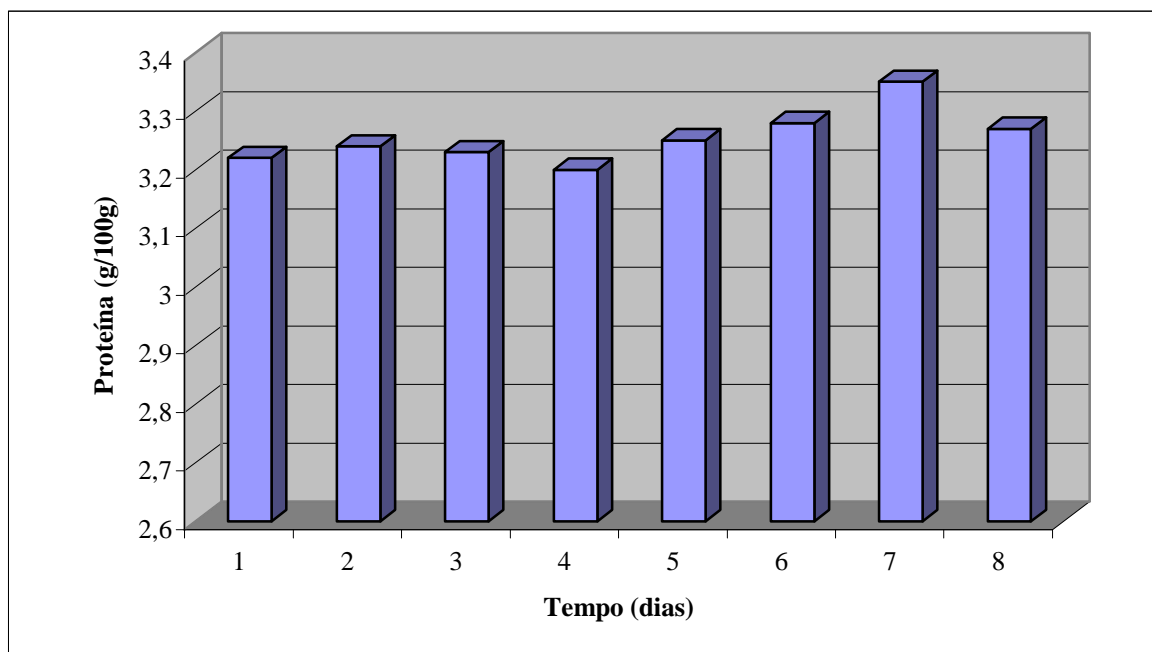


Figura 4.2. Médias dos valores de proteína em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas a 30 °C durante oito dias.

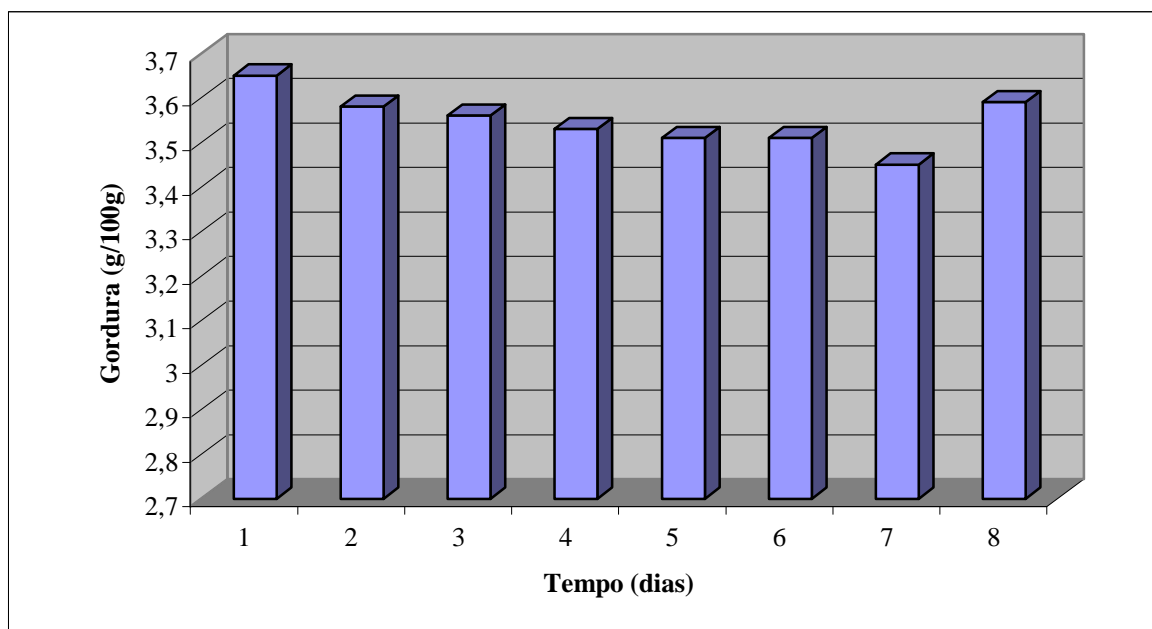


Figura 4.3. Médias dos valores de gordura em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas a 30 °C durante oito dias.

Tabela 4.2. Médias dos valores de EST, lactose e CCS em amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 30°C durante oito dias.

Tempo (dias)	Média de EST (g/100g)	Média de lactose (g/100g)	Média CCS (log céls./mL)
1	12,20 ^A	4,35 ^A	5,53 ^A
2	12,16 ^{AB}	4,35 ^A	5,44 ^{AB}
3	12,12 ^{ABC}	4,35 ^A	5,40 ^{ABC}
4	12,06 ^{ABCD}	4,35 ^A	5,38 ^{ABC}
5	12,01 ^{BCD}	4,26 ^{AB}	5,33 ^{ABCD}
6	11,98 ^{CD}	4,20 ^B	5,29 ^{BCD}
7	11,93 ^D	4,13 ^B	5,15 ^D
8	12,01 ^{BCD}	4,17 ^B	5,20 ^{CD}

A, B, C, D Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

Quando as amostras, destinadas à análise de composição centesimal e contagem de células somáticas, foram conservadas sob refrigeração por períodos de um, três, cinco, sete e dez dias, não foi observado efeito significativo do tempo de armazenamento

sobre os resultados médios obtidos em todos os parâmetros avaliados, indicando que amostras, adicionadas de bronopol, armazenadas sob refrigeração podem ser analisadas em até dez dias após a coleta das mesmas (Figuras 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9).

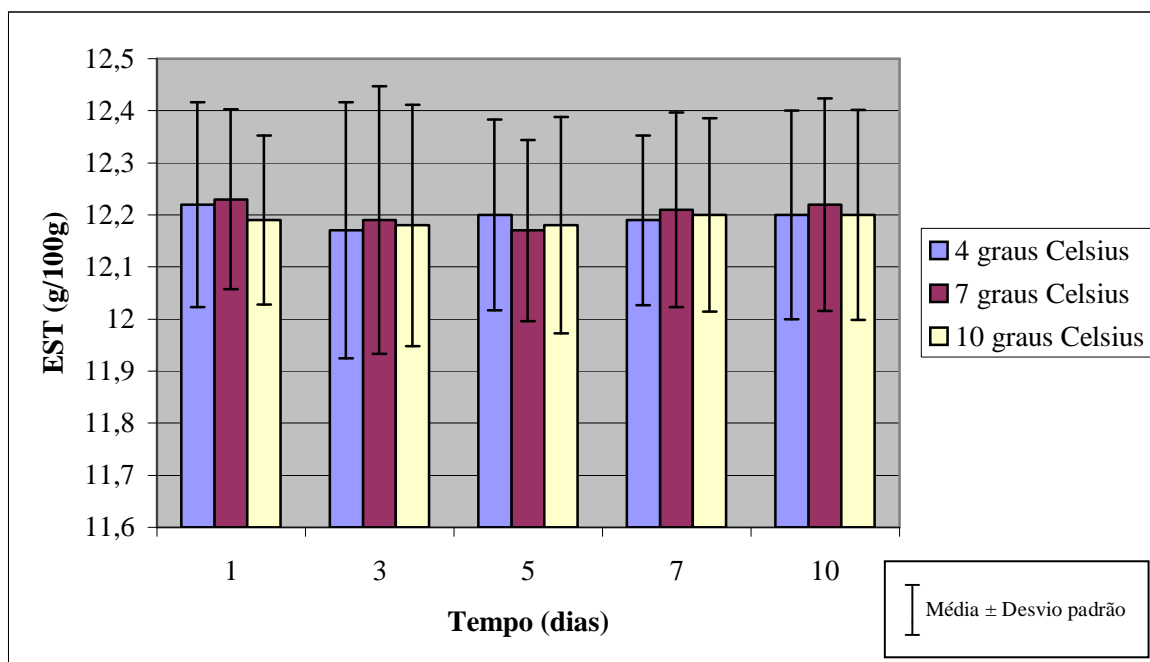


Figura 4.4. Médias dos valores de EST em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.

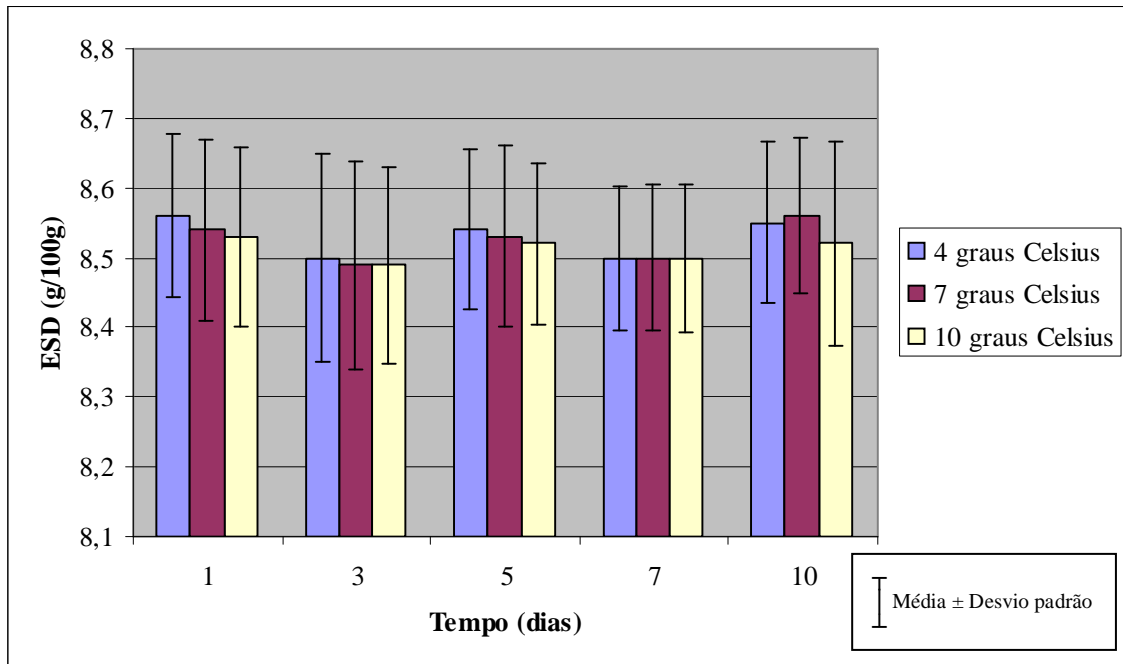


Figura 4.5. Médias dos valores de ESD em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.

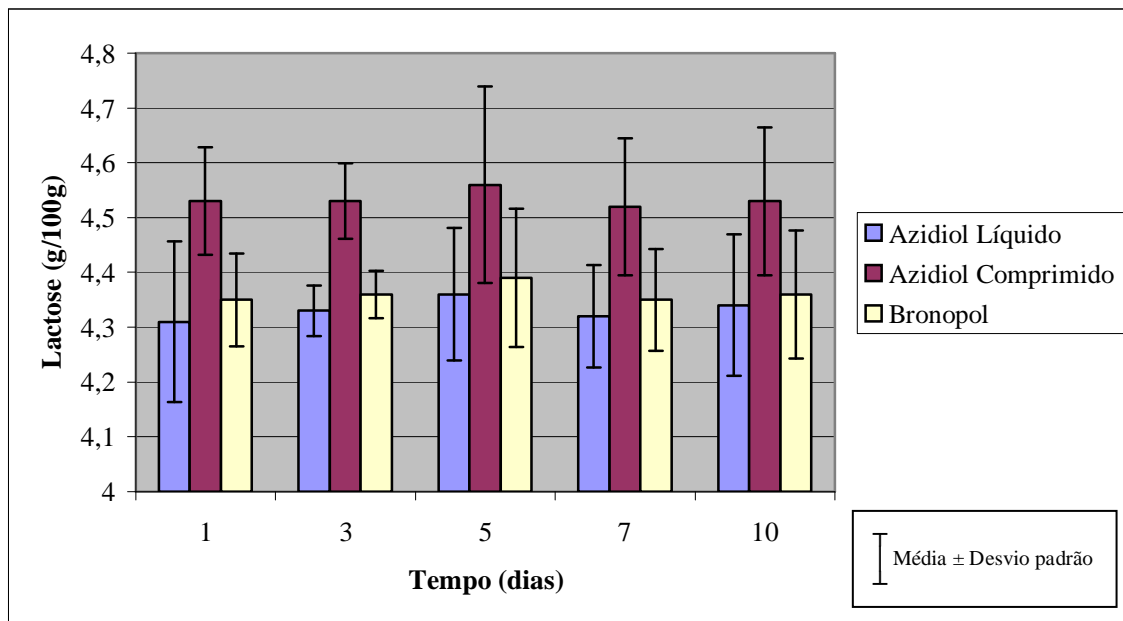


Figura 4.6. Médias dos valores de lactose em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.

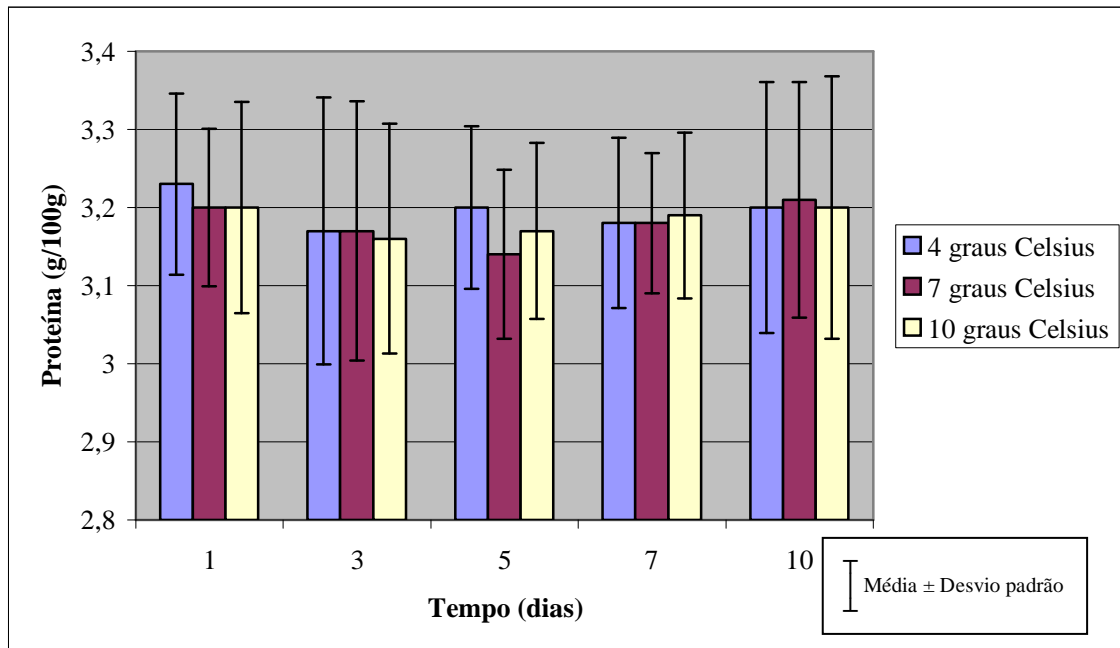


Figura 4.7. Médias dos valores de proteína em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.

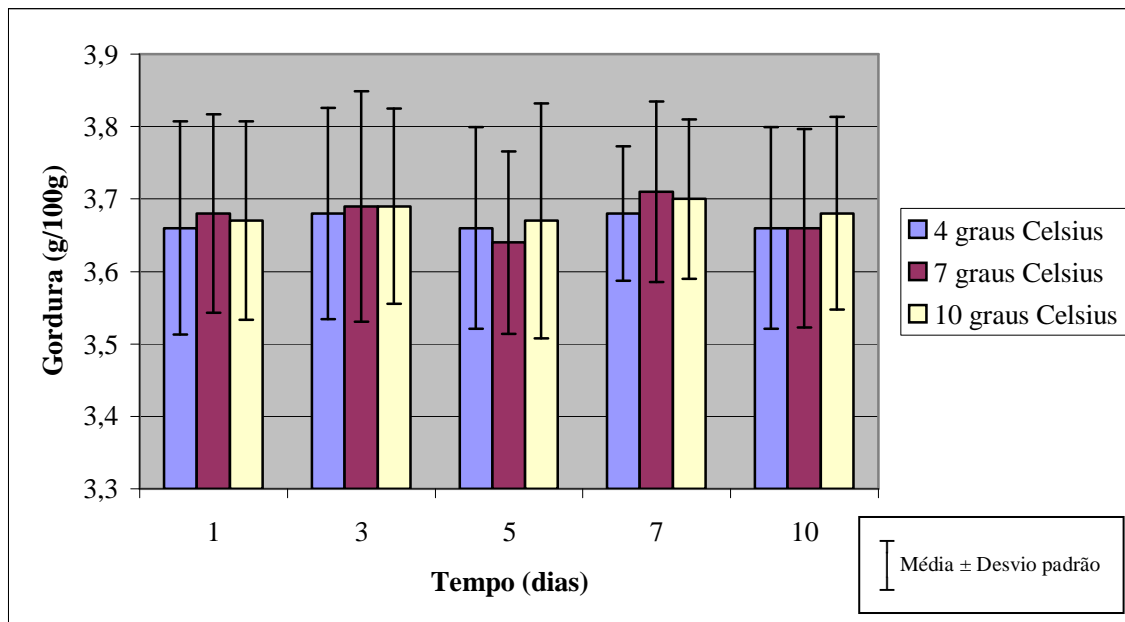


Figura 4.8. Médias dos valores de gordura em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.

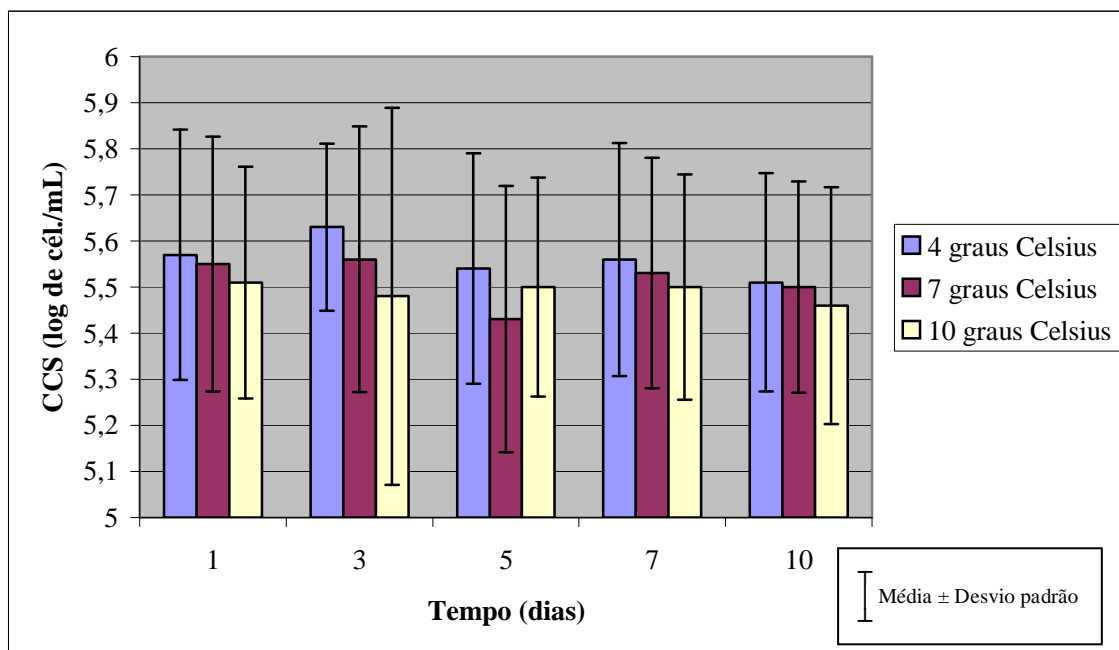


Figura 4.9. Médias dos resultados da CCS em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias.

Estes resultados coadunam com os encontrados por Cassoli (2005) que armazenou amostras adicionadas de bronopol a 7°C por até sete dias, e efetuou análises de composição centesimal e contagem de células somáticas, obtendo resultados estatisticamente semelhantes durante todo o período de armazenamento. Souza *et al.* (2005) também relatam que, amostras armazenadas sob refrigeração podem ser destinadas à análise de contagem de células somáticas em até sete dias após a coleta. Sanchez *et al.* (2005) armazenaram amostras de leite de cabra, adicionadas de bronopol, sob refrigeração durante 42 dias e não observaram diferenças nos teores de proteína e sólidos totais durante todo o período de estocagem.

Outros autores, no entanto, obtiveram resultados contrários, como Vermunt *et al.* (1995), que armazenaram amostras de leite de vaca, adicionadas de bronopol por longos períodos e relataram decréscimo das médias em 10% após seis semanas e de 16% em dez semanas após a coleta. Em amostras de leite

de ovelha preservadas com bronopol e refrigeradas, os valores de CCS caíram 2,8% após nove dias de estocagem (Gonzalo *et al.*, 2003). Paula *et al.* (2004) relataram que a contagem de células somáticas recebeu grande influência do efeito do tempo de armazenamento da amostra, havendo redução dos valores do primeiro ao quarto dia de armazenamento de 11%. Sanchez *et al.* (2005) armazenaram amostras de leite de cabra, adicionadas de bronopol, sob refrigeração e observaram decréscimo nas médias geométricas da CCS após 10, 25 e 42 dias de armazenamento de cinco, 6,9 e 15%, respectivamente.

No presente estudo os resultados médios de amostras de leite cru, adicionadas de bronopol e mantidas sob refrigeração durante 10 dias, demonstraram tendência de redução dos valores médios entre o primeiro (363.078 céls./mL) e décimo dia de estocagem (309.029 céls./mL) de aproximadamente 15%. Este decréscimo, embora não tenha sido significativo, pode acarretar efeitos econômicos para as

indústrias que efetuam o pagamento pela qualidade do leite baseado na CCS.

No caso da contagem de células somáticas o efeito da temperatura foi significativo, como pode ser observado na Tabela 4.3, indicando que a temperatura de conservação das amostras não deve ultrapassar 7°C, o que resultaria em redução das contagens.

As médias, desvio-padrão e os valores mínimos e máximos dos resultados obtidos nas análises de composição centesimal e contagem de células somáticas, efetuadas em equipamentos eletrônicos, de amostras armazenadas sob refrigeração por até 10 dias, podem ser vistas na Tabela 4.4.

Tabela 4.3. Média e desvio-padrão dos resultados da CCS em amostras de leite cru refrigerado armazenadas sob refrigeração.

Temperatura (°C)	Média (log céls./mL)	Desvio-padrão (DP)
4	5,56 ^A	0,23
7	5,51 ^{A B}	0,25
10	5,49 ^B	0,27

^{A, B} Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($p > 0,05$)

Tabela 4.4. Média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo dos resultados de composição centesimal e CCS em amostras de leite cru refrigerado armazenadas sob refrigeração por 10 dias.

Variáveis analisadas	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Extrato Seco Total (g/100g)	12,20 ± 0,18	11,84	12,5
Extrato seco desengordurado (g/100g)	8,52 ± 0,12	8,23	8,72
Lactose (g/100g)	4,36 ± 0,10	4,2	4,6
Proteína (g/100g)	3,19 ± 0,12	2,9	3,41
Gordura (g/100g)	3,68 ± 0,13	3,4	3,87
Contagem de células somáticas (log céls./mL)	5,52 ± 0,25	4,72	5,87

As médias, desvio-padrão e os valores mínimos e máximos dos resultados obtidos nas contagens bacterianas por citometria de fluxo e em placas, de amostras armazenadas a 30°C por oito dias, podem ser vistas na Tabela 4.5. A conservação de amostras, adicionadas de azidiol líquido e azidiol comprimido, destinadas à contagem bacteriana por citometria de fluxo e contagem padrão em placas, em temperatura de 30°C, resultou em coagulação de 29,17% (14) e 35,42% (17), respectivamente, das 48 subamostras, no decorrer do período de oito dias. As amostras coaguladas não foram analisadas. A ocorrência de coagulação nas amostras pode ser associada com a

qualidade microbiológica inicial das mesmas. Apenas duas amostras, dentre as seis coletadas, não coagularam durante todo o período de incubação. Estas duas amostras apresentaram baixas contagens iniciais de microrganismos aeróbios mesófilos, $8,0 \times 10^4$ e $1,2 \times 10^5$ UFC/mL, enquanto as demais tiveram contagens que variaram de $2,0 \times 10^6$ a $9,5 \times 10^6$ UFC/mL. Estes resultados indicam que embora o azidiol tenha ação bacteriostática, a concentração recomendada para adição em amostras de leite (4,79 mg de azida sódica e 0,2 mg de cloranfenicol/40 mL) não é suficiente para estacionar a multiplicação microbiana quando a população inicial é muito elevada.

Tabela 4.5. Média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo das contagens bacterianas, por citometria de fluxo e em placas, em amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 30°C.

Variáveis analisadas	Conservante	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Contagem bacteriana por citometria de fluxo (log UFC/mL)	Azidiol Líquido	5,74 ± 0,94	3,70	6,81
Contagem bacteriana por citometria de fluxo (log UFC/mL)	Azidiol Comprimido	6,14 ± 0,82	3,90	6,78
Contagem bacteriana em placas (log UFC/mL)	Azidiol Líquido	6,93 ± 1,36	3,81	8,90
Contagem bacteriana em placas (log UFC/mL)	Azidiol Comprimido	7,30 ± 1,19	4,79	8,89

Recomenda-se que amostras conservadas com azidiol sejam analisadas em até quatro dias após a coleta, se mantidas sob refrigeração a 4°C (Gonzalo *et al.*, 2003). O armazenamento de amostras em temperatura ambiente não é indicado, nem mesmo quando adicionado de conservantes. No entanto, o interesse em se conhecer a influência desta prática se justifica por possíveis problemas que possam ocorrer durante o transporte das amostras até os laboratórios da RBQL, prejudicando a temperatura de armazenamento das mesmas.

De acordo com os resultados encontrados, o armazenamento de amostras destinadas às análises microbiológicas em temperatura ambiente, mesmo adicionadas do conservante azidiol, não pode ser recomendada em função da alta incidência de amostras coaguladas.

As médias, desvio-padrão e os valores mínimos e máximos dos resultados obtidos nas contagens bacterianas por citometria de fluxo e em placas, de amostras armazenadas sob refrigeração por até 10 dias, podem ser vistas na Tabela 4.6. Não houve diferença significativa em amostras adicionadas de azidiol, tanto na forma líquida como em comprimido, durante todo o período de armazenamento (Figuras 4.10 e 4.11). Estes resultados coadunam com os obtidos por Cassoli (2005), que determinou que amostras adicionadas de azidiol líquido, conservadas por até sete dias a 7°C, podem ser usadas na contagem bacteriana total (CBT) sem que ocorram diferenças significativas nos resultados encontrados. Souza *et al.* (2006)

obtiveram resultados semelhantes ao armazenarem amostras de leite cru refrigerado a 3,8 e 10°C durante sete dias, concluindo que estas condições de armazenamento não afetam os resultados da contagem bacteriana.

Embora alguns trabalhos descritos na literatura (Marshall, 1992; Cassoli, 2005; Souza, 2005; Souza, 2006) destaquem a importância da realização das análises em período máximo de sete dias, observou-se no presente estudo que as amostras de leite conservadas com o azidiol apresentaram contagens bacterianas similares ($p > 0,05$) por até 10 dias de estocagem. Este achado é importante, pois situações excepcionais, em que não é possível analisar as amostras em até sete dias, geram dificuldades na logística tanto para as indústrias de laticínios como para os laboratórios. No caso das indústrias, o fato dessas amostras não serem analisadas no período, faz com que recoletas sejam necessárias, gerando custos e dificuldades operacionais, o que pode atrasar inclusive a emissão de folha de pagamento dos fornecedores de leite. Destaca-se ainda que, como algumas indústrias no Brasil realizam o pagamento do leite por qualidade, o atraso ou a não realização de tais análises do leite pode gerar transtornos para as indústrias, podendo até comprometer a imagem da indústria perante o produtor. Para os laboratórios, excepcionalmente, no caso de falhas nos equipamentos eletrônicos, podem-se analisar as amostras por um período um pouco maior, sem comprometer a confiabilidade dos resultados.

Tabela 4.6. Média, desvio-padrão e valores mínimo e máximo das contagens bacterianas, por citometria de fluxo e em placas, em amostras de leite cru refrigerado armazenadas sob refrigeração.

Variáveis analisadas	Conservante	Média ± DP	Mínimo	Máximo
Contagem bacteriana por citometria de fluxo (log UFC/mL)	Azidiol Líquido	5,68 ± 1,01	3,48	6,76
Contagem bacteriana por citometria de fluxo (log UFC/mL)	Azidiol Comprimido	5,76 ± 0,99	3,60	6,80
Contagem bacteriana em placas (log UFC/mL)	Azidiol Líquido	5,77 ± 1,34	2,79	7,62
Contagem bacteriana em placas (log UFC/mL)	Azidiol Comprimido	5,87 ± 1,41	2,98	8,40

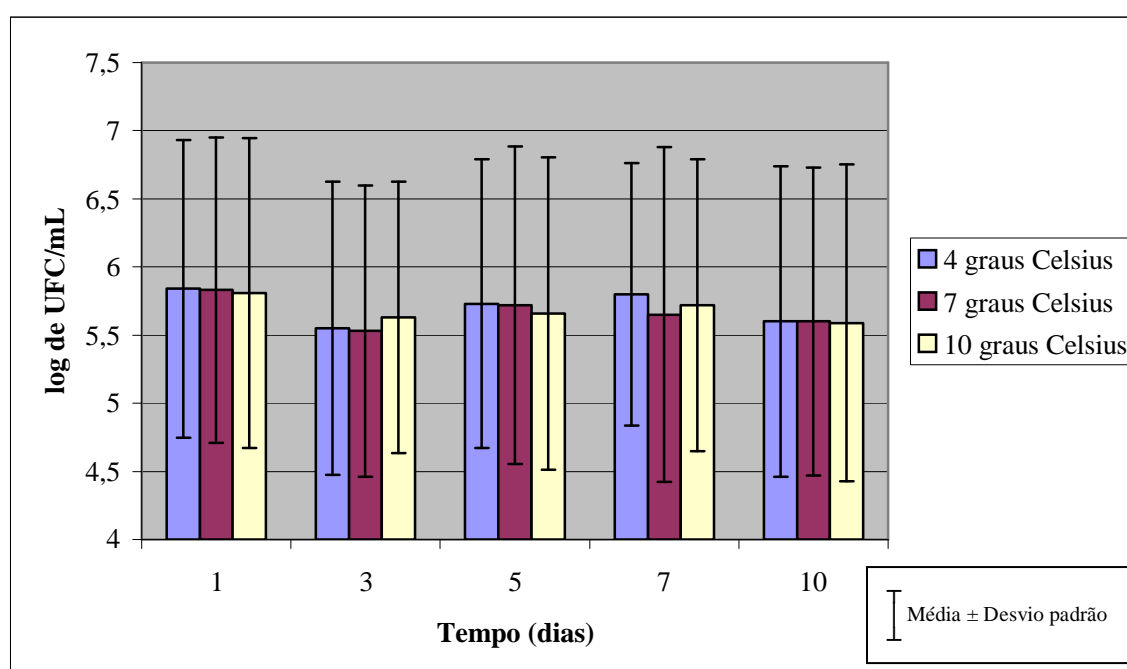


Figura 4.10. Médias das contagens bacterianas, por citometria de fluxo, em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido e armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.

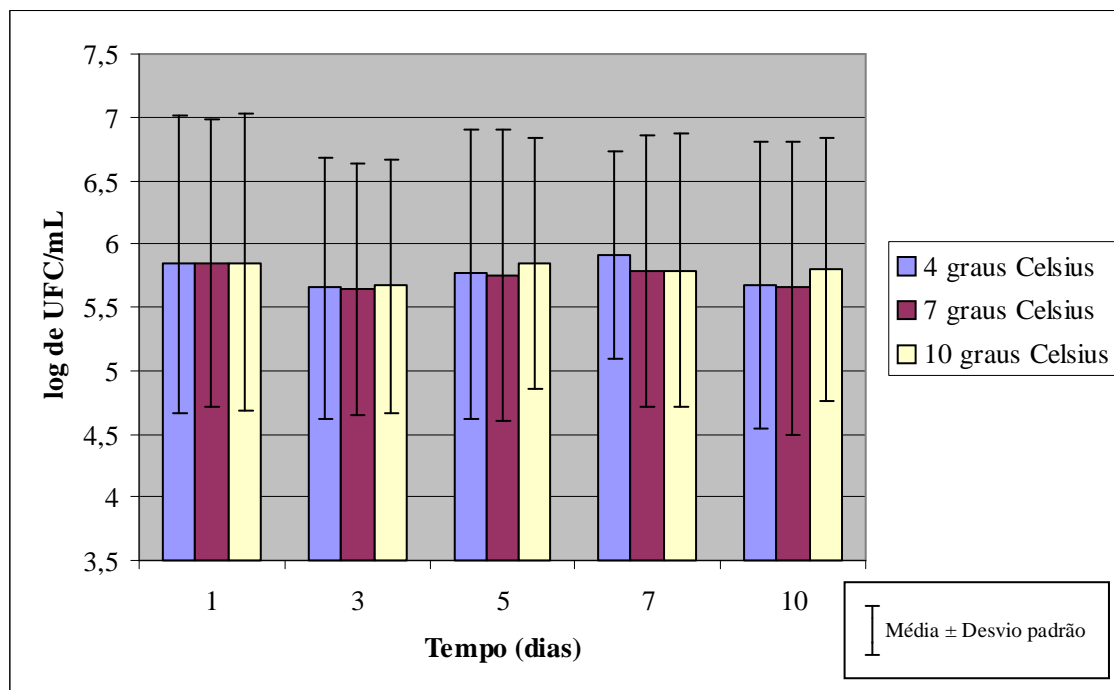


Figura 4.11. Médias das contagens bacterianas, por citometria de fluxo, em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol comprimido e armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.

Quando a contagem bacteriana foi efetuada pela metodologia convencional em placas, o efeito do tempo de armazenamento foi significativo, tanto para as amostras conservadas com azidiol líquido como para as conservadas com azidiol comprimido (Tabela 4.7). Nos dois casos ocorreu redução das contagens no decorrer do tempo de armazenamento das amostras. Esta redução pode ser decorrente de uma das características das técnicas de cultura microbiana, que é a falha na detecção de

microrganismos viáveis, mas que não se desenvolvem nos meios de cultura utilizados, por apresentarem alguma injúria celular (Dansen *et al.*, 1991; White, 1993). A injúria em questão é decorrente da ação do próprio conservante usado, o azidiol, que em sua composição contém a azida sódica, conhecida como um inibidor do processo de respiração aeróbica, por interferir na cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria.

Tabela 4.7. Médias dos resultados de contagem padrão em placas em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido e azidiol comprimido armazenadas sob refrigeração durante 10 dias.

Tempo (dias)	Média da contagem padrão em placas (log UFC/mL)	
	Azidiol líquido	Azidiol comprimido
1	6,01 ^A	6,07 ^A
3	5,94 ^A	5,98 ^{A B}
5	5,70 ^B	5,84 ^{B C}
7	5,66 ^B	5,76 ^{B C}
10	5,52 ^B	5,70 ^C

^{A, B, C} Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

4.4. CONCLUSÕES

Amostras armazenadas a 30°C podem ser analisadas, quanto à contagem de células somáticas até o quinto dia após a coleta. No caso da análise de composição centesimal este período é de apenas quatro dias.

Amostras destinadas às análises de contagem de células somáticas e composição centesimal, adicionadas de bronopol, armazenadas em temperaturas de 4 a 10°C podem ser analisadas em até dez dias após a coleta das mesmas.

O armazenamento em temperatura ambiente, de amostras destinadas às análises microbiológicas, mesmo adicionadas do conservante azidiol, não pode ser recomendada.

Amostras adicionadas de azidiol, conservadas em temperaturas de 4 a 10°C, podem ser usadas na contagem bacteriana por citometria de fluxo, sem que ocorram diferenças significativas nos resultados encontrados, por até 10 dias de armazenamento.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O azidiol comprimido pode ser usado, como conservante de amostras de leite cru, em substituição ao azidiol na forma líquida, sem que haja qualquer prejuízo nos resultados das análises.

Em relação à temperatura de armazenamento de amostras de leite cru refrigerado, concluiu-se que amostras armazenadas a 30°C podem ser analisadas, quanto à contagem de células somáticas até o quinto dia após a coleta. No caso da análise de composição centesimal este período é de apenas quatro dias. Quando as amostras, destinadas às análises de contagem de células somáticas e composição centesimal, são mantidas sob refrigeração e adicionadas de bronopol, o armazenamento pode ser feito por até dez dias após a coleta das mesmas sem que ocorra comprometimento dos resultados.

O armazenamento em temperatura ambiente, de amostras destinadas às análises microbiológicas, mesmo adicionadas do conservante azidiol, não é recomendado. Amostras adicionadas de azidiol, conservadas em temperaturas de 4 a 10°C, podem ser usadas na contagem bacteriana por citometria de fluxo, sem que ocorram diferenças significativas nos resultados encontrados, por até 10 dias de armazenamento.

O uso do conservante azidiol em amostras destinadas às análises de composição centesimal e contagem de células somáticas não é recomendado, por ter apresentado resultados estatisticamente diferentes nos teores de lactose pesquisados, assim como na contagem de células somáticas. O uso do bronopol em amostras destinadas à contagem bacteriana total não é indicado por subestimar a população microbiana no leite cru.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOR, K.B.; BREEUWER, P; VERBAARSCHOT, P. *et al.* Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.5209-5216, 2002.
- ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I. *et al.* Contagem de células somáticas em leite de cabra. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.3, p.396-400, 2001
- ARDO, Y. Bronopol as a preservative in milk samples for the determination of cell content using Fossomatic. *Milchwissenschaft*. v.37, p.139-142, 1982.
- BARHEMA, H.W.; VAN DER SCHANS, J.; SCHUKKEN, Y.H. *et al.* Effect of freezing on somatic cell count of quarter milk samples as determined by a Fossomatic electronic cell counter. *Journal of Dairy Science*. v.80, p.422-426, 1997.
- BARRIENTOS, A.A.; ARROYO, J. CANTÓN, R. *et al.* Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v.13, p.167-195, 2000.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Somacount 300 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997. 116 p.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bentley 2000 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 79 p.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bactocount 150 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49 p.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Rapid and accurate enumeration of individual bacteria in raw milk*. User Manual. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2003.
- BERTRAND, J.A. Influence of shipping container, preservative and breed on analyses of milk components of shipped samples. *Journal of Dairy Science*. v.79, p.145-148, 1996
- BIGGS, D.A., JOHNSON, G.; SJAUNJA, L.O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infra-red absorption. In: Monograph on rapid indirect methods for measurement of the major components of milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.2008, p.21-29, 1987.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto n. 30691 de 29 de março de 1952. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Brasília: SIPA, DILEI, 1980. 166p.
- BRASIL. *Instrução normativa n.51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2002, 39p.
- BRASIL. *Instrução normativa n.62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2003, 123p.
- BRITO, J.R.F.; SOUZA, G.N.; BRITO, M.A.V.P. *et al.* Panorama da qualidade do leite na Região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. In: *DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO LEITE, IMPACTO PARA A INDÚSTRIA E A QUESTÃO DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS*, 2003, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: CBQL, 2003. p. 47-61.
- BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: *O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL*, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UFP, 2004. p.316-331.
- BUENO, V.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S. *et al.* Variações na composição centesimal do leite em função das contagens celular somática e bacteriana total no Estado de Goiás. In: *O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL*, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UPF, 2004. p.301-306.
- BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S. *et al.* Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período

do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural*, v.35, p.848-854, 2005.

BUNTHOF, C.J.; ABEE, T. Development of a flow cytometry method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.2934-2942, 2002.

CASSOLI, L.D. *Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru*. 2005. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.

CERQUEIRA, M.M.O.P.; LEITE, M.O. Doenças transmissíveis pelo leite e derivados. *Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG*, n.13, p.39-62, 1995.

CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; SENA, M.J. *et al.* Fatores determinantes na qualidade do leite: estudo de uma indústria de laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, p.241-245, 1999a.

CERQUEIRA, M.M.O.P.; SENA, M.J.; SOUZA, M.R. *et al.* Avaliação da qualidade do leite estocado em tanque de imersão e expansão por 48 horas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, p.251-254, 1999b.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P.F.; DEMÉTRIO, C.G.B. *et al.* Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, p.623-634, 2004.

COLLINS, S.J.; BESTER, B.H.; MCGILL, A.E.J. Influence of psychotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. *Journal of Food Protection*, v.56, p.418-425, 1993.

DANSEN, A.; OLID, R.M.; PITON-MALLERET, C. *et al.* Evaluation du Bactoscan 8000 pour la numération automatique et rapide de la flore microbienne du lait cru. *Le Lait*, v.71, p.661-670, 1991.

DONNELLY, C.W.; BAIGENT, G.J. Method for flow cytometry detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, p.689-695, 1986.

DÜRR, J.W. Panorama da qualidade do leite na Região Sul (RS). In: *DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO LEITE, IMPACTO PARA A INDÚSTRIA E A QUESTÃO DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS*, 2003, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: CBQL, 2003. p.9-17.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Disponível em <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/dados2003/producao>>. Acessado em: 12 de julho de 2006a.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Disponível em <http://www.cnpqgl.embrapa.br/jornal_leite/jornaldoleitenoticias>. Acessado em: 31 de julho de 2006b.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle da mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FONSECA, L.F.L. Pagamento por qualidade: situação atual e perspectivas para o Brasil. In: *SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE – INTERLEITE*, 5, 2001, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Instituto Fernando Costa – SP, 2001. p.193.

FONSECA, L.M.; RODRIGUES, R.; CESQUEIRA, M.M.O.P. *et al.* 2004. Contagem bacteriana de leite cru granelizado do Estado de Minas Gerais. In: *O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL*, 2004, Passo Fundo. Anais... Passo Fundo: UFP, 2004a.

FONSECA, L.M.; RODRIGUES, R.; CERQUEIRA, M.M.O.P. *et al.* 2004. Contagem de células somáticas e composição de leite cru granelizado do Estado de Minas Gerais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.59, p.485-488, 2004b.

FONSECA, C.S.P. *Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais*. 2005. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2004, Passo Fundo. *Anais...*Passo Fundo: UPF, 2004. p.235-254. 2004.
- GONZALO, C.; MARTINEZ, J.R.; CARRIEDO, J.A *et al.* Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.138-145, 2003.
- GONZALO, C.; BOIXO, J.C.; CARRIEDO, J.A *et al.* Evaluation of rapid somatic cells counters under different analytical conditions in ovine milk. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.3623-3628, 2004.
- GRIFFITHS, M.W. Applications of bioluminescence in the dairy industry. *Journal of Dairy Science*. v.76, p.3118-3125, 1993.
- GUNASEKERA, T.S.; ATTFIELD, P.V.; VEAL, D.A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.1228-1232, 2000.
- GUNASEKERA, T.S.; DORSCH, M.R.; SLADE, M.B. *et al.* Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence *in situ* hybridization using ribosomal RNA directed probes. *Journal of Applied Microbiology*, v.94, p.936-945, 2003.
- HARDING, F. *Milk quality*. New York: Blackie Academic & Professional, 1995.165 p.
- HOLM, C.; JESPERSEN, L. A flow cytometric Gram-staining technique for milk-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.2857-2863, 2003.
- HOLM, C.; MATHIESEN, T.; JESPERSEN, L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *Journal of Applied Microbiology*, v.97, p.935-941, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicad> ores/agropecuaria/producaoagropecuaria. Acessado em: 12 de julho de 2006.
- International Dairy Federation. Enumeration of Microorganisms. Colony count technique at 30°C. *IDF Standard 100B*. Brussels: International Dairy Federation, 1991. 8p.
- International Dairy Federation. Milk: enumeration of somatic cell. *IDF Standard 148A*. Brussels: International Dairy Federation, 1995. 8p.
- International Dairy Federation. Whole milk – determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. *IDF Standard 141C*. Brussels: International Dairy Federation, 2000, 8 p.
- KITCHEN, B.J. Reviews of the progress of dairy science: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, v.48, p.167-188, 1981.
- LEE, K.L.; DAYTON, K.P.; KROLL, G. *et al.* Effects of preservative, storage time and storage temperature on milkfat percent, protein percent and somatic cell counts in dairy goats. *Journal of Dairy Research*, v. 71, p.169-174, 1986.
- MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.
- MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D.; COLDEBELLA, A. *et al.* Panorama da qualidade do leite na Região Sudeste – São Paulo. In: DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO LEITE, IMPACTO PARA A INDÚSTRIA E A QUESTÃO DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS, 2003, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: CBQL, 2003. p.39-45.
- MACKENZIE, N.M.; PINDER, A.C. Flow cytometry and its applications in veterinary medicine. *Research in Veterinary Science*, v.42, p.131-139, 1987.
- MALACRINO, P.; ZAPPAROLI, G.; TORRIANI, S. *et al.* Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry.

Journal of Microbiology Methods, v.45, p.127-134, 2001.

MARSHALL, R.T. *Standard methods for the examination of dairy products*. Baltimore: American Public Health Association, 1992. 546p.

MARTINEZ, J.R.; GONZALO, C.; CORRIEDO, J.A. *et al.* Effect of freezing on Fossomatic cell counting in ewe milk. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p.2583-2587, 2003.

McCLELLAND, R.G.; PINDER, A.C. Detection of low levels of specific *Salmonella* species by fluorescent antibodies and flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*, v.77, p.440-447, 1994a.

McCLELLAND, R.G.; PINDER, A.C. Detection of *Salmonella typhimurium* in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. *Applied Environmental Microbiology*, v.60, p.4255-4262, 1994b.

MENDONÇA, A.H.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P. *et al.* Qualidade físico-química de leite cru resfriado: comparação de diferentes procedimentos e locais de coleta. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.56, n.321, p.276-281, 2001.

OLIVEIRA, L.C.; GOMES, M.F.; VELLOSO, C.R.V. Modernização da Legislação Sanitária Federal sobre Leite e Derivados. In: CASTRO, M.C.D.; PORTUGAL, J.A.B. *Perspectivas a Avanços em Laticínios*. Juiz de Fora. EPAMIG. Centro Tecnológico da Zona da Mata, ILCT, 2000. 278 p.

OSTRENSKY, A. *Efeitos de ambientes sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça holandesa no Paraná*. 1999. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PAULA, M.C.; RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G. *et al.* Contagem de células somáticas em amostras de leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.5, p.1303-1308, 2004.

PEREIRA, A.R.; PRADA E SILVA, L.F.; MOLON, L.K. *et al.* Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite: I-gordura e proteína. *Brazilian Journal of*

Veterinary Research and Animal Science, v.36, n.3, p.121-124, 1999.

PHILPOT, N.W. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE LEITE, 1998. *Anais...Curitiba*: Biblioteca da UFPR, 1998, p.28-35.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Vencendo a luta contra a mastite*. São Paulo: Ed. Milkbiz, 2002. 188p.

PICININ, L.C.A. *Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais*. 2003. 89f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

PINTO, C.L.O. *Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT*. 2004. 97f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PRADA E SILVA, L.F.; PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F. *et al.* Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite: II-lactose e sólidos totais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.37, n.4, p.330-333, 2000.

RAPPOSCH, S.; ZANGERL, P.; GINZINGER, W. Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.2753-2758, 2000.

RIBAS, N.P. Importância da contagem de células somáticas para a saúde da glândula mamária e qualidade do leite. In: INTERLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE, 1999. Caxambu. *Anais...* São Paulo, 1999. p.77-87.

RIBAS, N.P. Laboratório processa 300 mil amostras de leite. *Revista Gado Holandês*, n.489, p.11, 2000.

RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G.; BAJALUK, S. Produção diária de leite, porcentagens de gordura e proteína em vacas da raça holandesa no Estado do Paraná. *Revista Batavo*, n.111, p. 26-31, 2002.

- RIBAS, N.P.; PAULA, M.C.; ANDRADE, U.V.C. Contagem e escore de células somáticas em amostras de leite de tanques nos Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo. In: DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO LEITE, IMPACTO PARA A INDÚSTRIA E A QUESTÃO DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS, 2003, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: CBQL, 2003. p. 27-38.
- RIBAS, N.P.; HARTMANN, W.; MONARDES, H.G. *et al.* Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.33. p.2343-2350. 2004 (Supl.3)
- RIESEBERG, M.; KASPER, C.; REASDON, K.F. *et al.* Flow cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.56. p.350-360. 2001.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- SANCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C. *et al.* Influence of storage and preservation on fossomatic cell count and composition of goat milk. *Journal of Dairy Science*. v.88. p.3095-3100. 2005.
- SANTOS, M.V. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: 2º CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2002. *Anais...* Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, 2002, p.179-188.
- SILVEIRA, T.M.L. *Comparação dos métodos de referência e de análise eletrônica na determinação da composição e da contagem de células somáticas do leite bovino*. 2002. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVEIRA, T.M.L.; FONSECA, L.M.; LAGO, T.B.N. *et al.* Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.1, p.128-132, 2005.
- SMITH, K.L. Standards for somatic cells in milk: physiological and regulatory. *Mastitis Newsletter*, v.21, p.7-9. 1996
- SOUZA, G.N.; SILVA, M.R.; SOBRINHO, F.S. *et al.* Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem de células somáticas no leite. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.5, p.830-834, 2005.
- SOUZA, G.N.; FARIA, C.G.; RIOS, R.J. *et al.* Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem total de bactérias em amostras de leite cru conservadas com azidiol. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. v.61, p.358-361, 2006.
- SUHREN, G.; WALTE, H.G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacteria count in raw milk. *Bulletin of the IDF*, n. 358, p.36-48, 2000.
- VERMUNT, A.E.M.; LOEFFEN, G.J.M.; VOET van der, H. *et al.* Development of reference samples for calibration and quality control of somatic cell count using a Fossomatic instrument. *Netherlands Milk Dairy Journal*. v.49, p.111-123, 1995.
- WHITE, C.H. Rapid methods for estimation and prediction of shelf life of milk and dairy products. *Journal of Dairy Science*. v.76, p. 3126-3132, 1993.