

JOANA FERREZ DE CASTRO

**AZIDIOL COMPRIMIDO ESTERILIZADO COMO CONSERVANTE DO
LEITE CRU DESTINADO A CONTAGEM MICROBIANA POR CITOMETRIA
DE FLUXO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Medicina Veterinária.
Área: Tecnologia e Inspeção de
Produtos de Origem Animal.
Orientador: Leorges Moraes da
Fonseca.

Belo Horizonte
UFMG – EV
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação defendida e aprovada em 02 de fevereiro de 2007

**Prof. Leorges Moraes da Fonseca
(Orientador)**

Prof. Marcelo Resende de Souza

Dr. Guilherme Nunes de Souza

AGRADECIMENTOS

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, por me acolher desde a graduação e permitir a realização deste mestrado.

Ao **LabUFMG**, por possibilitar a realização do meu experimento e à toda a sua equipe, em especial Daiane, Débora, Elias, Lisiane, Luana, Maria, Miquéias, Raquel, Rejane, Rose, por sempre me ajudarem com paciência e bom humor.

Ao Prof. Leorges Moraes da Fonseca, pela confiança, orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Marcelo Resende de Souza, pela colaboração nesta banca de defesa, pela amizade construída ao longo do mestrado e por contribuir a todo o momento com as minhas formações acadêmica e humana.

Ao Dr. Guilherme Nunes de Souza, pela contribuição na finalização desta dissertação participando nesta banca de defesa.

À Profa. Mônica Maria de Oliveira Pinho Cerqueira, pela importante colaboração na minha formação acadêmica, pelos incentivos em ministrar aulas sempre com prazer e didática, por me mostrar que o papel do veterinário na melhoria da qualidade do leite é essencial.

À Profa. Cláudia Freire Andrade Moraes Penna por me apresentar à pesquisa, sendo a minha primeira orientadora de iniciação científica, pela amizade que se construiu a partir deste relacionamento orientadora-orientada, pelo ombro amigo de todas as horas, por me encorajar nos momentos de fraqueza e, sem dúvida, pela minha formação acadêmica.

Ao Prof. Ronon Rodrigues, pela sua alegria e sabedoria compartilhada com todos e pelos seus valiosos conselhos.

À Fernanda Andrade Pinto, que foi minha estagiária, fundamental na execução do meu projeto de mestrado, por sua gentileza, calma e apoio.

A todos os professores do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Escola de Veterinária da UFMG, em especial profa. Mônica Oliveira Leite e prof. Afonso de Liguori Oliveira.

Ao Colegiado de pós-graduação, em especial à Nilda pela organização, calma e simpatia.

A todos os funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, principalmente aqueles do DTIPOA, do colegiado de pós-graduação, da Biblioteca, da equipe do Xerox (Cleyton, Hélio, Tiaguinho e Wagner), faxineiras e porteiros. Mas em especial à Maura, por me ensinar com precisão, disciplina e paciência a arte das técnicas de microbiologia; ao Miltinho, por sempre ajudar com alegria e bom humor e por sempre me escutar; à Valéria, Fatinha e Marco Antônio por me tratarem com carinho e à Roselene por me auxiliar com disposição e paciência na normalização bibliográfica e nos “segredos” de uma boa pesquisa bibliográfica.

Aos professores/amigos Andrey Pereira Lage, Humberto Pereira Oliveira, Iran Borges, Israel José da Silva e José Sérgio de Resende por sempre me ouvirem, me darem conselhos e cuidarem de mim.

Aos colegas de mestrado, em especial Fernando Ferreira, Luciana Nogueira, Moisa e Pedro pelo companheirismo e carinho; e **Li** (Liana Lara Lima) e **Déa** (Andréa Melo Garcia de Oliveira) por tornarem esta conquista ainda mais saborosa. Mas principalmente por me ensinarem a compartilhar com amor as nossas diferenças, a enxergar que nas dificuldades, estando ao lado de quem a gente ama, a gente amadurece com menos sofrimento e ganha de Deus um presente precioso: irmãs de coração!

Às amigas eternas, por compreenderem com carinho as minhas ausências (em ordem alfabética!): Ana, Brízia, Dani mãe, Ká, Lala, Rosa, Sahrinha e Tati Coutinho (mineiras); Ana, Bia, Cris, Fabris, Lina, Si, Tati (cariocas pertencentes ao grupo “meninas veneno”) e Carol Marins e Jú Rothier (cariocas amigas de infância).

Ao compadre Gustavo (Goiás) pela amizade sincera, pelo exemplo de profissional competente e por me incentivar a entrar no mestrado e tornar viável o meu retorno à Belo Horizonte.

Às companheiras de república, ou melhor dizendo, de “lar doce lar”, *Cati* e *Flor* por me ouvirem, me incentivarem, me darem atenção, carinho e mimos, por me ensinarem a viver em grupo com harmonia e por tornarem os almoços de domingo divertidos e saborosos mesmo longe de nossas famílias! Amos vocês!

A toda a minha família **Ferrez** e **Castro**, que eu amo muito, em especial à minha querida vó Odélcia; à mais animada e incentivadora tia Iza, ao meu querido e otimista paizão, ao meu “paidrasto” por incentivar meu mestrado e por desde pequena, e até hoje, me ensinar a ser “safo”; a minha mana/amiga predileta Lulu e a minha super mãe Helena por me amar tanto e confiar em mim, por me ensinar que é preciso fazer qualquer coisa com amor e que é importante ser generosa, fazer o bem e amar ao outro.

À CAPES pelo apoio com a bolsa de mestrado.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

**"Da escola de guerra da vida –
o que não me mata
torna-me mais forte"**

(Friedrich Nietzsche)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU.....	12
2.1.1 Principais fontes de contaminação do leite	14
2.2. MÉTODOS DE CONTAGEM BACTERIANA EM LEITE	15
2.2.1 <i>Contagem padrão em placas</i>	15
2.2.2 <i>Microscopia direta</i>	16
2.2.3 <i>Citometria de fluxo</i>	16
2.3 IMPORTÂNCIA DA AMOSTRAGEM CORRETA	18
2.4 CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE PARA ANÁLISES LABORATORIAIS	19
2.4.1 EVOLUÇÃO DOS CONSERVANTES	19
2.4.2 USO DO AZIDIOL COMO CONSERVANTE DO LEITE CRU	21
2.5 ESTERILIZAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E EMBALAGENS	22
2.5.1 <i>Radiação ionizante</i>	22
2.5.2 <i>Óxido de etileno</i>	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS	24
3.3 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	24
3.3.1 <i>Contagem Padrão em Placas (CPP)</i>	25
3.3.2 <i>Contagem Bacteriana por citometria de fluxo</i>	25
3.3.3 <i>Análise de composição e contagem de células somáticas do leite</i>	25
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
3.4.1 <i>Contagem bacteriana por citometria de fluxo</i>	25
3.4.2 <i>Contagem padrão em placas (CPP)</i>	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	32
ANEXO I: Algumas diferenças nos processos de esterilização por radiação gama, óxido de etileno e vapor.....	37
ANEXO 1: Conservantes de amostras de leite cru destinadas às análises laboratoriais de composição, CCS e CBT.....	37
ANEXO III: Resultados de contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, pelo método de contagem padrão em placas, valores em log UFC/ml de 53 amostras de leite cru refrigerado em função do tipo de tratamento (sem conservante/"técnica padrão" e com azidiol líquido/"técnica modificada").....	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.ESQUEMA DO PERCURSO DA AMOSTRA NO FLUXO LAMINAR (<i>FLOW CELL</i>) NUM EQUIPAMENTO DE CITOMETRIA DE FLUXO	17
--	----

FIGURA 2. MÉDIAS DAS CONTAGENS BACTERIANAS POR CITOMETRIA DE FLUXO EM 76 AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO SEM CONSERVANTE (SC), ADICIONADAS DE AZIDIOL LÍQUIDO (AL), AZIDIOL COMPRIMIDO NÃO ESTERILIZADO (CO) E AZIDIOL COMPRIMIDO IRRADIADO (C10, C15 E C20)	28
FIGURA 3. MÉDIAS DAS CONTAGENS MICROBIANAS POR CITOMETRIA DE FLUXO EM 14 AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO ADICIONADAS DE AZIDIOL LÍQUIDO (AL), AZIDIOL COMPRIMIDO NÃO ESTERILIZADO (CO) E AZIDIOL COMPRIMIDO ESTERILIZADO PELO ÓXIDO DE ETILENO (COE) E PELA RADIAÇÃO GAMA (C10, C15 E C20)	29
FIGURA 4. LINHAS DE TENDÊNCIAS DOS RESULTADOS DE CONTAGEM MICROBIANA PELO MÉTODO DE CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS (APHA, 1992) DE 53 AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO SEM CONSERVANTE (“TÉCNICA PADRÃO”) E COM ADIÇÃO DE AZIDIOL LÍQUIDO (“TÉCNICA MODIFICADA”)	29
FIGURA 5. LINHAS DE TENDÊNCIAS DOS RESULTADOS DE CONTAGEM MICROBIANA (VALORES ATÉ 1.000.000 UFC/ML) PELO MÉTODO DE CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS (APHA, 1992) DE 14 AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO SEM CONSERVANTE (“TÉCNICA PADRÃO”) E COM ADIÇÃO DE AZIDIOL LÍQUIDO (“TÉCNICA MODIFICADA”).....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. MÉDIAS DOS RESULTADOS DE COMPOSIÇÃO (GORDURA, PROTEÍNA, LACTOSE, EXTRATO SECO TOTAL E EXTRATO SECO DESENGORDURADO) E DE CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) DE 76 AMOSTRAS (N) DE LEITE CRU COLHIDAS EM CAMINHÕES-TANQUE ANALISADAS EM EQUIPAMENTO ELETRÔNICO E OS RESPECTIVOS PADRÕES ESTABELECIDOS NA IN-51/2002 (MAPA)	27
TABELA 2. MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DOS RESULTADOS DE CONTAGEM MICROBIANA POR CITOMETRIA DE FLUXO, VALORES REAIS (UFC/ML X 1000) E TRANSFORMADOS (LOG UFC/ML) EM 76 AMOSTRAS DE LEITE CRU, EM FUNÇÃO DO TIPO DE TRATAMENTO (ADIÇÃO OU NÃO DE CONSERVANTE AZIDIOL)	27
TABELA 3. MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DOS RESULTADOS DE CONTAGEM BACTERIANA POR CITOMETRIA DE FLUXO, VALORES REAIS (UFC/ML X 1000) E TRANSFORMADOS (LOG UFC/ML) EM 14 AMOSTRAS DE LEITE CRU EM FUNÇÃO DO TIPO DE TRATAMENTO (COMPRIMIDOS DE AZIDIOL ESTERILIZADOS OU NÃO)	28
TABELA 4. MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DOS RESULTADOS DE CONTAGEM DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS AERÓBIOS, PELO MÉTODO DE CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS (APHA, 1992), VALORES EM LOG UFC/ML DE 53 AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO EM FUNÇÃO DO TIPO DE TRATAMENTO (SEM CONSERVANTE/”TÉCNICA PADRÃO” E COM AZIDIOL LÍQUIDO/”TÉCNICA MODIFICADA”).....	29

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo comparar o conservante bacteriostático azidiol nas formas líquido e comprimido, esterilizado ou não por radiação gama ou óxido de etileno, para conservação de leite cru e posterior análise de contagem microbiana eletrônica por citometria de fluxo. As contagens foram realizadas no equipamento Bactocount IBC 150[®] e os resultados foram automaticamente convertidos de Contagem Bacteriana Individual para Unidade Formadora de Colônia. Foram analisadas 76 amostras de leite cru (40ml cada) de caminhões tanques isotérmicos, provenientes de uma indústria de laticínios situada em Belo Horizonte, Minas Gerais, coletadas no período de julho a agosto de 2006. O uso inédito de azidiol na forma de comprimidos esterilizados, por radiações gama à 10, 15 e 20 kGy ou injeção de gás de óxido de etileno, foi avaliado frente ao uso tradicional do azidiol líquido. 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 os tratamentos não apresentaram nenhuma diferença estatística ($p > 0,05$) quanto à contagem microbiana realizada no equipamento Bactocount IBC 150[®]. Desta forma o azidiol líquido pode ser substituído pelo comprimido, sendo mais indicada a utilização do comprimido irradiado à 10 kGy para assegurar a inocuidade das amostras não expondo o comprimido a altas doses de radiação. A esterilização do comprimido por óxido de etileno também é viável.

Palavras-chave: azidiol, contagem bacteriana total, qualidade de leite, citometria de fluxo.

ABSTRACT

The objective of the present work was to compare preservative bacteriostatic azidiol in the liquid and compressed forms, sterilized or not for gamma radiation or ethylene oxide, in the preservation of raw milk for the analysis of microbial counting by flow cytometry (Bactocount IBC 150[®], Bentley Inc.). The results were automatically converted through a curve of lineal regression calibrated of Individual Bacteria Count for Unit Colony Former. They were in the total 76 samples of raw milk (40ml each) by trucks isothermal tanks, of a dairy industry in Belo Horizonte, Minas Gerais, collected in the period of July by August of 2006. The unpublished use of azidiol in the form of sterilized compressed (for gamma radiation 10, 15 and 20 kGy and ethylene oxide) was evaluated front to the traditional use of liquid azidiol. The adopted delineation was in subdivided bits, having been accomplished the variance analysis and the averages comparison using itself Duncan's Test. It was concluded that the treatments did not present any statistical difference ($p>0,05$) regarding the microbial counting by flow cytometry (Bactocount IBC 150[®], Bentley Inc.). Thus azidiol liquid can be substituted by the tablet, being more indicated the utilization of the tablet to the 10 kGy to assure for harmless and not exposing the tablet the radiation high doses. The tablet sterilization for ethylene oxide also is viable.

Keywords: Azidiol, total bacteria count, milk quality, flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade higiênico-sanitária do leite cru é uma premissa para a cadeia brasileira de lácteos assegurar a qualidade e inocuidade dos seus produtos e se inserir no mercado internacional.

A condição microbiológica do leite cru está diretamente relacionada ao estado sanitário do rebanho, à higiene na ordenha e aos binômios temperatura/tempo de armazenamento do leite no tanque refrigerador na propriedade leiteira e no seu transporte até a unidade processadora ou à unidade de armazenamento intermediário. Este parâmetro pode ser mensurado, dentre outras metodologias, por meio da contagem microbiana utilizando o método de referência de contagem padrão em placas (CPP) de microrganismos mesófilos aeróbios (APHA, 1992). Trata-se de um método eficiente, porém laborioso e demorado, o que pode torná-lo inviável para grandes quantidades de amostras.

O resultado da contagem microbiana pode ser utilizado como critério no pagamento do leite e fornecer um perfil da qualidade higiênico-sanitária do mesmo por refletir as práticas de produção e armazenamento do leite na fazenda (Hayes et al., 2001).

Em 2002, a Instrução Normativa nº51 (IN-51/2002) aprovou os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade dos Leites tipos A, B e C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Esta Normativa trouxe melhorias nos índices estabelecidos como padrões mínimos de qualidade para o leite, incluindo requisitos físico-químicos, microbiológicos, contagem de células somáticas e pesquisa de resíduos químicos (Brasil, 2002).

A Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) foi criada pelo Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a realização das análises necessárias à implantação do programa de melhoria da qualidade do leite no país. Atualmente, existem oito laboratórios pertencentes à RBQL, distribuídos nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. No estado de Minas Gerais existem dois destes, sendo um na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFG), com recepção de aproximadamente 40.000 amostras/mês, provenientes dos estados de MG, GO, ES, RJ e BA.

O entrave de manutenção da qualidade das amostras de leite cru destinadas a análise durante o seu transporte foi solucionado pela utilização de conservantes que prolongam a vida útil das amostras. Porém, ainda é necessário coletar duas amostras por produtor, pois os conservantes utilizados são diferentes. No caso da análise físico-química e da contagem de células somáticas utiliza-se o bronopol¹ na forma de comprimido, e para a análise bacteriológica, o azidiol², na forma líquida.

Para que a contagem bacteriana se aproxime à obtida logo após a ordenha, a coleta das amostras de leite (aproximadamente 40ml) é feita em frascos esterilizados, adicionados de 130µL de azidiol, que são enviados em caixas isotérmicas com gelos recicláveis para um dos laboratórios da RBQL. As amostras de leite contendo azidiol como conservante são armazenadas a aproximadamente 4°C, mantendo a viabilidade para análise em equipamentos baseados em citometria de fluxo por até dez dias, sem modificação significativa dos seus componentes (Leite, 2006).

¹ 2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol, natamicina e indicador de pH

² Cloranfenicol (0,15g/100mL), azida sódica (3,6g/100mL), citrato de sódio (4,5g/100g) e álcool etílico (1 mL/100mL), azul de bromofenol (35 mg/100mL). Completando volume com água destilada esterilizada.

É necessária a utilização do azidiol em quantidades adequadas para que se obtenha atividade bacteriostática para a conservação da amostra. Entretanto, a posologia e o uso são dificultados pela apresentação na forma líquida. Os transportadores de leite, responsáveis pela coleta da amostra nas propriedades, regularmente adicionam quantidades superiores ou inferiores à recomendada, o que pode gerar resultados duvidosos ou errôneos. Além da dosagem, tem-se o maior risco da manipulação de um composto tóxico na forma líquida e o risco de contaminação da amostra de leite por manipulação excessiva durante a coleta. Para resolver este problema técnico, foi desenvolvido, recentemente, o azidiol na forma de comprimido.

O aparelho BactoCount IBC 150[®] (Bentley Instruments Incorporation, Chaska, Estados Unidos da América) é um instrumento semi-automático que utiliza a citometria de fluxo para a contagem bacteriana individual (CBI) rápida em leite cru. A conversão dos resultados de CBI para contagem bacteriana em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml) por meio de uma equação de regressão linear é feita para adaptar os resultados obtidos por esse equipamento eletrônico aos padrões estabelecidos na legislação brasileira (Brasil, 2002). Nesse caso, é preciso que inicialmente 500 amostras representativas de leite sejam simultaneamente submetidas à análise eletrônica para a CBI e ao método de referência de contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos (APHA, 1992). Posteriormente 25 amostras devem ser analisadas semanalmente. Estes resultados são armazenados no banco de dados do equipamento e, através de uma equação de regressão linear, os resultados de contagem bacteriana são convertidos de CBI para UFC/ml (Bentley Instruments, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo comparar o azidiol nas formas líquido e comprimido, esterilizado ou não por

radiação gama ou óxido de etileno, na conservação de leite cru para a análise de contagem microbiana eletrônica por citometria de fluxo. Além disto, testar a viabilidade de uso de amostras de leite cru conservadas com azidiol na análise de microrganismos mesófilos aeróbios pelo método de contagem padrão em placas (APHA, 1992) para facilitar o processo semanal de análises que visa a manutenção da curva de transformação de resultados em UFC/mL utilizando-se amostras representativas (com variações de resultados, ou seja, contagens baixas, médias e altas de microrganismos).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade microbiológica do leite cru

A qualidade do leite cru é determinada por sua composição e obtenção higiênica. A qualidade composicional do leite é, principalmente, influenciada pela alimentação dos animais, genética, raça e outros. Os parâmetros de higiene, decisivos para a garantia da segurança dos produtos lácteos, podem também influenciar a composição do leite, como ocorre no caso da mastite. Os principais critérios para um leite ser considerado de alta qualidade higiênica incluem: quantidades baixas de microrganismos saprófitas; ausência ou quantidade pequena de microrganismos patogênicos e ausência de resíduos e contaminantes ou, se presentes, em quantidades abaixo dos Limites Máximos de Resíduos (LMR's) (Heeschen, 1996).

Amostras de leite cru coletadas de forma asséptica, de vacas limpas e saudáveis, sem infecção intramamária, normalmente possuem contagem padrão em placas menores do que 10^3 UFC/ml (APHA, 1992). Quando contagens mais elevadas acontecem, isto sugere que os microrganismos alcançaram o leite por outras fontes variadas. A causa mais frequente de

contaminação é a limpeza e a desinfecção incorreta dos equipamentos de ordenha. A presença de resíduos de leite nas superfícies dos equipamentos proporciona condições para o crescimento e multiplicação dos microrganismos que contaminam o leite durante as ordenhas subsequentes. Outras causas importantes que contribuem para as contagens microbianas elevadas são as más condições de limpeza do curral e dos locais onde as vacas ficam estabuladas e a ordenha de vacas sujas, além das falhas no resfriamento do leite, que deveria alcançar 4°C o mais rápido possível e ser mantido nesta temperatura até a sua coleta (Hamann, 1991; APHA, 1992; Murphy e Boor, 2000; Jayarao et al., 2004).

Se as vacas em lactação estiverem com mastite, microrganismos responsáveis pela infecção, poderão contaminar o leite e contribuir para o incremento da contagem bacteriana, caso o leite destes animais não seja descartado. Estes microrganismos podem diferir quanto ao tipo de mastite. Na mastite contagiosa, os agentes mais comumente associados são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, enquanto que o grupo dos coliformes, *Pseudomonas spp.* e *Streptococcus uberis* e *S. dysgalactiae*, estão mais relacionados com a mastite ambiental (Kleter, 1974; Stadhouders, 1975; Jeffrey e Wilson, 1987; APHA, 1992; Murphy e Boor, 2000; Hayes et al., 2001).

Em leite cru de boa qualidade bacteriológica a microbiota predominante é composta por bactérias Gram positivo, enquanto que em altas contagens o número de bactérias Gram negativo aumenta (Slaghuis, 1996; Suhren e Reichmuth, 2000). Usualmente, são encontradas no leite cru as bactérias dos gêneros: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*. (APHA, 1992; Murphy e Boor, 2000; Hayes et al., 2001).

As bactérias Gram negativo, como *Campylobacter*, *Escherichia Coli* enterohemorrágica, *Salmonella* e *Yersinia spp.* têm uma grande importância para a saúde pública e, apesar de presentes em pequenas percentagens em leite de tanque, têm sido associadas a muitos surtos de doenças relacionadas ao consumo de leite cru (Rohrbach et al., 1992; Jayarao e Wang, 1999).

Foram isoladas 234 bactérias Gram negativo de 130 amostras de leite de tanque (Fultonville, Nova Iorque - EUA), das quais 201 pertenciam a 28 espécies. Os coliformes corresponderam a menor proporção, 32,9%. No grupo dos não coliformes (67,1%), dentre os 15 gêneros encontrados, os principais foram *Pseudomonas spp.* (73,9%), *Hafnia spp.* (7,0%), *Bordetella spp.* (3,8%) e *Serratia spp.* (2,5%). Pode-se destacar a presença do gênero *Pseudomonas*, em 49,6% do total de bactérias Gram negativo isoladas, sendo *P. fluorescens* (29,9%) e *P. putida* (11,9%) as espécies predominantes (Jayarao e Wang, 1999). Isso pode ser explicado por se tratarem de bactérias psicrotróficas que têm um tempo de geração curto em baixas temperaturas. Além disso, têm a habilidade de produzir exopolissacarídeos adesivos, que facilitam a formação de biofilmes, podendo se tornar importantes reservatórios de bactérias no sistema de ordenha por resistirem aos efeitos de produtos químicos e sanitizantes (Mosteller e Bishop, 1983; Jayarao e Wang, 1999).

Em um estudo com rebanhos leiteiros da Dinamarca, nas amostras de leite de tanques considerados de pior qualidade (contagens superiores a $3,0 \times 10^4$ UFC/ml), verificou-se que os microrganismos predominantes pertenciam a um mesmo tipo de microbiota: bactérias Gram negativo e Oxidase positivo (Holm et al., 2004).

2.1.1 Principais fontes de contaminação do leite

As principais fontes de contaminação do leite são o interior do úbere, a superfície do teto e do úbere e os equipamentos de ordenha e de armazenamento do leite (Cousins, 1972; Bramley e McKkinon, 1990; Slaghuis, 1996).

Antes da ordenha, reduções significativas de contaminação do teto podem ser conseguidas com o *pré-dipping*. Durante a ordenha, a principal fonte desta contaminação bacteriana está no contato do leite com as superfícies dos equipamentos de ordenha e do tanque de refrigeração do leite. No entanto, muitas das bactérias que contaminam o leite após a sua ejeção, geralmente, não crescem muito bem sob refrigeração e, por este motivo, a sua quantidade no tanque de refrigeração não se eleva significativamente (APHA, 1992; Murphy e Boor, 2000).

Após a ordenha e durante o armazenamento e o transporte do leite, a microbiota deste sofre alterações favorecendo o aumento da população de psicotróficos (Cousins, 1972; Bramley e McKkinon, 1990; Slaghuis, 1996). Algumas conseqüências deste crescimento são o aparecimento de defeitos no leite como sabor amargo, à fruta, ranço e sujo que persistem após o seu processamento, assim como reações de proteólise e lipólise devido à produção de enzimas termoestáveis, levando a uma diminuição da qualidade e da vida de prateleira dos produtos lácteos (Stadhouders, 1975; APHA, 1992; Celestino et al., 1996; Boor et al., 1998; Murphy e Boor, 2000).

Em alguns estudos no Brasil, sobre o padrão microbiológico do leite de conjunto, valores de contagens de mesófilos menores ou iguais a 10^6 UFC/ml, em média, foram superiores a 80%. Neste caso os autores consideram que a maioria dos produtores necessita melhorar as condições higiênicas

durante a ordenha e o armazenamento do leite e a sua refrigeração rápida a temperatura de 4° C, para que em 2011 atendam aos requisitos microbiológicos definitivos estabelecidos pela IN-51/2002 de 10^5 UFC/ml (Brasil, 2002) (Fonseca, 2005; Nero et al., 2005; Arcuri et al., 2006; Mesquita et al., 2006).

A importância da aplicação de produtos de limpeza, tanto no equipamento de ordenha como no tanque de refrigeração, em relação à contagem de mesófilos foi verificada por Arcuri et al. (2006). Os autores encontraram uma associação ($p < 0,05$) entre contagens acima de 500.000 UFC/ml e o emprego de apenas um ou nenhum produto de higienização (detergente alcalino, detergente ácido e sanitizante).

A refrigeração correta do leite na propriedade sem a presença do transporte granelizado, prejudica a manutenção da qualidade do leite com relação à contagem de microrganismos mesófilos, como ficou evidenciado num trabalho realizado por Nero et al. (2005). Neste, em ausência de transporte do leite em caminhões isotérmicos até o laticínio, a frequência de amostras com contagens desses microrganismos acima de 10^6 UFC/ml foi alta (68%).

Com relação à mastite, esta pode influenciar na contagem microbiana do leite do tanque, dependendo da espécie de microrganismo envolvido no processo inflamatório da glândula mamária, do estágio deste processo e da percentagem de animais afetados no rebanho. Uma vaca com mastite tem o potencial de elevar a contagem microbiana em seu leite em 10^7 bactérias/ml. Caso a produção desta vaca corresponda a 1% do total do leite do tanque, a contagem bacteriana do tanque, sem levar em conta outras fontes de contaminação, pode ser de 10^5 bactérias/ml (Bramley e McKkinon, 1990).

A microbiota inicial do leite cru, as condições de processamento do leite e a contaminação pós-pasteurização influenciam na qualidade microbiológica do leite e seus derivados. A garantia desta qualidade começa na fazenda e termina nas mãos do consumidor. Portanto, o mais importante é concentrar esforços para minimizar a quantidade inicial de microrganismos no leite cru (Stadhouders, 1975; APHA, 1992).

2.2. Métodos de contagem bacteriana em leite

A contagem bacteriana pode ser usada como ferramenta no monitoramento da qualidade microbiológica do leite cru na fazenda, e até mesmo nas indústrias, nos diferentes pontos do seu processamento, possibilitando o direcionamento do leite para diferentes processamentos.

O método de referência para enumeração de microrganismos é o de contagem padrão em placas (CPP), porém existem outras técnicas tais como microscopia e citometria de fluxo. Cada um destes métodos expressa os resultados de forma diferente e, portanto, não podem ser comparados entre si. Para que sejam substituídos pela CPP é necessário que as análises sejam feitas em ambos os métodos, com as mesmas amostras para, em seguida, se fazer uma correlação entre as metodologias, levando-se em conta os aspectos que diferem nos seus princípios de contagem (Suhren et al., 1992; Suhren et al., 2001). É preciso compreender que fatores como a microbiota predominante no leite e o tipo de agregação bacteriana afetam o resultado obtido por diferentes técnicas. Essas detectam em graus diferentes as espécies presentes e se baseiam em princípios distintos, por exemplo, contagem individual de bactérias (citometria de fluxo) ou de contagem de unidades formadoras de colônias (CPP) (Suhren e Reichmuth, 2000).

Logo, nenhum método microbiológico permite a determinação exata do número de

microrganismos presentes nos alimentos. Embora alguns métodos sejam melhores do que outros em situações específicas, todos eles possuem limitações que são inerentes às próprias técnicas (Jay, 1996).

Na IN-51/2002 foi estabelecido o padrão para microrganismos mesófilos aeróbios (Enumeration..., 1991), expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml). Para leite cru refrigerado o valor máximo é $1,0 \times 10^6$ até janeiro de 2008 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e, a partir de julho de 2011, para estas regiões, o padrão fixado é de no máximo $1,0 \times 10^5$, semelhante aos padrões internacionais. Essa análise deve ser realizada nos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), credenciados pelo MAPA (Brasil, 2002).

2.2.1 Contagem padrão em placas

A contagem padrão em placas de leite cru é o método de referência que estima o número total de microrganismos aeróbios mesófilos presentes no leite. Essa técnica se baseia na habilidade dos microrganismos presentes na amostra crescerem e formarem colônias visíveis macroscopicamente que poderão ser contadas em unidades formadoras de colônias (UFC) (APHA, 1992, Suhren e Reichmuth, 2000). Seu objetivo é indicar as condições de higiene na produção do leite na propriedade com relação à contaminação microbiana e o resultado pode ser utilizado como critério de pagamento por qualidade nos laticínios ou como ferramenta para monitorar a qualidade da matéria-prima (Murphy e Boor, 2000; Hayes et al., 2001; Jayarao et al., 2004).

Esse método possui a vantagem de ser de fácil execução, não exigir equipamentos sofisticados nem mão de obra tecnicada, apenas bem treinada. Contudo, existem algumas restrições, como: 1. somente são detectados aqueles microrganismos que

podem se multiplicar àquelas condições específicas do método (nutrientes, disponibilidade de oxigênio, tempo/temperatura de incubação); 2. uma colônia pode ser originada tanto a partir de um único microrganismo como a partir de agregados de microrganismos; 3. tempo prolongado para disponibilizar os resultados (mínimo 48-72 horas em média); 4. inviabilidade de análises de grandes quantidades de amostras diárias (Jay, 1996; Suhren e Reichmuth, 2000; Broutin, 2004).

2.2.2 Microscopia direta

Essa técnica consiste na realização de esfregaços de leite em lâminas de microscópio que são corados com um corante apropriado. As células são visualizadas e contadas com a ajuda de um microscópio. Depois de secado, o esfregaço é fixado na lâmina e imerso num corante. Neste método é necessária uma régua calibrada para estabelecer o fator de correção do microscópio (Jay, 1996).

Dentre as vantagens dessa técnica está a simplicidade, a possibilidade de análise da morfologia celular e do emprego de marcadores celulares fluorescentes. As desvantagens incluem o próprio método de microscopia que gera fadiga no analista, a não diferenciação entre células mortas e vivas, a possibilidade da presença de artefatos que podem se confundir com microrganismos, a dificuldade de contar células agrupadas, o erro de células fracamente coradas não serem contadas, além de, invariavelmente, a contagem por microscopia direta ser mais elevada quando comparada com a CPP (Jay, 1996).

2.2.3 Citometria de fluxo

No campo da Microbiologia, importantes mudanças têm ocorrido nos últimos anos, principalmente com o uso da citometria de fluxo e o uso de corantes marcadores celulares. Segundo Álvarez-Barrientos et al.

(2000) esses avanços têm possibilitado não somente a detecção rápida de microrganismos, mas também a identificação de bactérias com base nas suas características citométricas. A maior contribuição tem sido em testes de microrganismos de crescimento lento, como micobactérias e fungos, e a detecção de populações mistas que podem responder a agentes antimicrobianos de formas diferentes.

A citometria de fluxo é extremamente sensível, evita a necessidade de procedimentos de cultura ou enriquecimento, e pode ser tanto qualitativa quanto quantitativa, sendo capaz de identificar células individuais em uma população heterogênea (Mackenzie, 1987; Shapiro, 1988; Dasen et al., 1991; Davey e Kell, 1996; Álvarez-Barrientos et al., 2000; Ninane et al., 2000; Broutin, 2004; Silva, 2006).

Em um típico equipamento de citometria de fluxo microbiológico, partículas individuais passam com o auxílio de um fluido carreador, sob uma zona de iluminação. Detectores apropriados (fotomultiplicadores) registram a passagem das células eletronicamente, medindo a magnitude do pulso representada pela extensão da luz dispersa. A magnitude destes pulsos é classificada eletronicamente permitindo o desenvolvimento de histogramas do número de células (Mackenzie, 1987; Shapiro, 1988; Dasen et al., 1991; Davey e Kell, 1996; Álvarez-Barrientos et al., 2000; Ninane et al., 2000; Silva, 2006).

O aparelho BactoCount IBC 150[®] (Bentley Instruments Incorporation, Chaska, Estados Unidos da América) é um instrumento semi-automático que utiliza a citometria de fluxo para a rápida contagem bacteriana individual (CBI) em leite cru, assim como o BactoScan (Foss Electric A/S, Hillerød/DK). No início, é realizada a incubação da amostra com uma solução tamponante, composta por enzimas

proteolíticas, detergente e um corante fluorescente (brometo de etídeo), com o objetivo de, respectivamente, lisar as proteínas e células somáticas, solubilizar os glóbulos de gordura e corar o DNA microbiano. Dessa forma, essa etapa consegue reduzir e dispersar os constituintes do leite suscetíveis de interferirem na contagem bacteriana (proteínas, células somáticas, glóbulos de gordura etc.). Na etapa seguinte, a amostra é “sonicada” com uma haste ultrassônica. Esses processos auxiliam a separação química das partículas interferentes, rompendo as colônias bacterianas remanescentes para melhorar a detecção de microrganismos distintos e reduzir a fluorescência de outras substâncias. (Ninane et al., 2000; Bentley

Instruments, 2002). Em seguida, uma alíquota dessa amostra é transferida por uma solução carreadora em um fluxo laminar na célula de leitura do equipamento. O material nucléico dos microrganismos é excitado ao serem expostos a um intenso feixe de laser para ativar o corante a emitir fluorescência. Este sinal fluorescente é coletado por sensores ópticos (lentes), filtrado e detectado por um fotomultiplicador. A altura e intensidade destes pulsos fluorescentes são registradas e transformadas em contagem bacteriana individual (CBI), convertida em contagem bacteriana total, expressa em UFC/ml (Dasen et al., 1991; Ninane et al., 2000; Bentley Instruments, 2002; Silva, 2006) (Figura 1).

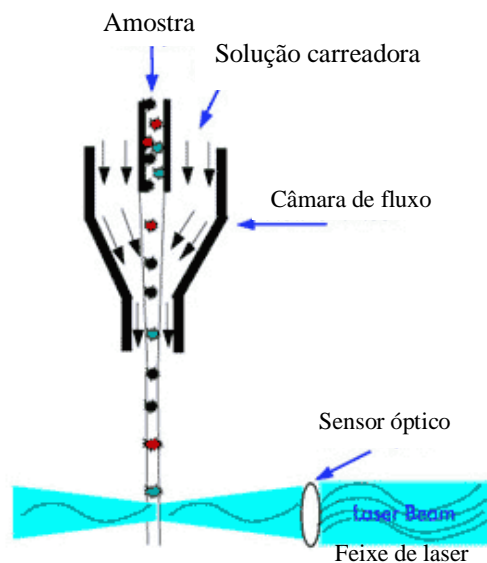


Figura 1. Esquema do percurso da amostra no fluxo laminar (*flow cell*) num equipamento de citometria de fluxo

A conversão dos resultados de contagem bacteriana individual (CBI/ml) para contagem bacteriana em UFC/ml por meio de uma equação de regressão linear é feita para adaptar os resultados obtidos por esse

equipamento eletrônico à legislação vigente no Brasil. A calibração do equipamento para obter esta transformação é feita alimentando-se o banco de dados do equipamento com a leitura de CBI e os resultados obtidos paralelamente das amostras plaqueadas em ágar padrão para

contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e incubadas por 48 horas a 32°C (APHA, 1992). Deve-se, inicialmente, utilizar cerca de 500 amostras, com atualização semanal com a inclusão de aproximadamente 25 amostras. Os pontos extremos são excluídos e é feita uma análise estatística para estimativa da curva de regressão linear que fica armazenada no sistema do equipamento (Suhren e Walte, 2000; Bentley Instruments, 2002). A amostragem representativa é importante para que haja uma variação das contagens e também do tipo de microbiota. Para facilitar essa calibração com atualização semanal do equipamento, uma solução seria utilizar as próprias amostras, adicionadas de azidiol, que são enviadas aos laboratórios da RBQL, não havendo a necessidade de fazer uma coleta de amostras de leite isentas de conservantes somente para essa finalidade. Kaluwa (2006) realizou a contagem padrão em placas de amostras de leite sem conservante (controle) e dois tratamentos: adição de azidiol e de ácido bórico nas amostras de leite. Quando as amostras foram conservadas a 10°C foi possível realizar a análise nas amostras adicionadas de conservantes até 72 horas após a coleta, mantendo resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$) quando comparados com a amostra controle analisada no mesmo dia da coleta (dia “zero”). Porém, são necessárias mais pesquisas sobre o uso de azidiol na CPP. É importante fazer ensaios no Brasil utilizando as amostras características enviadas aos laboratórios da RBQL.

A metodologia para conversão dos resultados tem sido questionada pelos diversos laboratórios e indústrias devido à falta de precisão dos resultados finais, o que ocorre em virtude da variabilidade de microbiota no leite cru, entre outros fatores. Portanto, esta conversão transforma um dado preciso e mais abrangente (CBI) em um dado estimado (UFC/ml). O erro estatístico inerente à transformação reflete a interferência de muitos fatores, como a

região de coleta das amostras, a qualidade higiênica da ordenha, a estação do ano, as condições de estocagem, a desinfecção dos tetos dos animais ordenhados e a microbiota contaminante (Suhren e Walte, 2000).

2.3 Importância da amostragem correta

A principal causa de variação na estimativa tanto da composição quanto da contagem bacteriana de amostras de leite de tanques é a agitação incorreta. Esta variação é devida, principalmente, a menor densidade da gordura e a associação dos microrganismos com os glóbulos de gordura, concentrando tanto a gordura quanto os microrganismos, na superfície do tanque. Por isso, antes das coletas, é necessária uma homogeneização intensa do leite resfriado, porém não excessiva, para que não haja perda na qualidade causada pelo rompimento dos glóbulos de gordura (Jackson, 1981).

Com relação às células somáticas, também existem algumas evidências de que elas se acumulam na superfície de tanques mal homogeneizados (APHA, 1992). Desta forma, utilizando uma técnica correta de amostragem de leite de tanque, é possível utilizar apenas uma amostra, e não duplicata, para representar com veracidade a condição microbiológica do leite de conjunto, utilizando o método de contagem padrão em placas (Hayes et al., 2001).

Uma agitação por cinco minutos, no caso de tanques de até 3800 L, ou 10 minutos, para tanques acima deste volume, pode assegurar uma boa homogeneização (Dairy Practices Council, 2003; citado por Goodridge et al., 2004).

Uma estratégia para diminuir o tempo de agitação sem influenciar na qualidade da coleta é a agitação intermitente, isto é, de forma automática, os agitadores são ligados periodicamente durante alguns minutos. A frequência e o tempo de duração da agitação intermitente não são especificados, mas a

recomendação, neste caso, é de um a dois minutos de homogeneização imediatamente antes da coleta (Milk..., 1995). Além da vantagem da diminuição do tempo de permanência do caminhoneiro na propriedade, este procedimento evita a adesão de gordura na superfície das laterais dos tanques de refrigeração (Marshall e Shelley, 1981). Todavia, o aumento do número de agitações contínuas do leite pode ter impacto na qualidade como o aumento na ocorrência de lipólise e outras conseqüências ainda desconhecidas (Goodridge et al, 2004).

2.4 Conservação das amostras de leite para análises laboratoriais

2.4.1 Evolução dos conservantes

O desenvolvimento de análises laboratoriais rápidas e a implantação de programas de melhoria da qualidade para o leite, juntamente com o pagamento por qualidade, demandam o uso de amostras seguras e representativas do volume original. Alguns conservantes para leite cru foram desenvolvidos, principalmente, para preservar as características físico-químicas nas análises de composição e de contagem de células somáticas (Dunham et al., 1978; Kroger, 1985; Barcina et al., 1987; Van de Voort et al., 1987; Monardes et al., 1996).

Na década de 1960, foi aprovado, nos Estados Unidos, o uso do cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) como conservante, apesar da sua ação corrosiva e sua toxicidade. Mais tarde, sua utilização foi questionada devido aos riscos ao meio ambiente. O dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) passou a ser adotado como o conservante de escolha em amostras de leite devido às menores limitações comparado a outros conservantes, como o peróxido de hidrogênio e o formaldeído (Kroger, 1985). O peróxido de hidrogênio, apesar de inibir a proliferação microbiana, tem as desvantagens de ser líquido, incolor e ter um prazo de ação relativamente curto.

Quanto ao formaldeído, igualmente líquido, por interferir nos resultados de análise do teor de proteína do leite, teve seu uso também descartado (Kroger, 1985).

A maioria dos conservantes usados nas décadas de 1970 e 1980 foi testada, principalmente, para a manutenção da composição do leite, uma vez que os programas de melhoramento da sua qualidade - como da Associação de Melhoramento da Qualidade do Leite (*Dairy Herd Improvement Association* - DHIA), dos Estados Unidos - buscavam, sobretudo, o aumento nos teores de gordura e proteína no leite, garantindo assim melhores preços. Esse fato está diretamente ligado ao grande interesse econômico das indústrias de laticínios, pois estes componentes estão relacionados a um maior valor nutricional do leite e a maiores rendimentos nos derivados lácteos, como queijo, manteiga e leite em pó (Dunham et al., 1978; Kroger, 1985; Barcina et al., 1987; Bertrand, 1996).

Nos laboratórios da DHIA observou-se uma associação entre o aumento da manipulação e armazenamento das amostras de leite conservadas com o $K_2Cr_2O_7$, com a diminuição do teor de gordura do leite em análises de composição (*Milko-Tester Automatic*). Outra restrição a este conservante foi a confirmação de fortes respostas alérgicas nos técnicos de laboratório que manipulavam este conservante por um período prolongado (Kroger, 1970; Dunham et al., 1978).

A busca por novos e melhores conservantes continuou na tentativa de encontrar o conservante químico mais apropriado capaz de não interferir nos resultados das análises, ter uma ação contra muitos microrganismos do leite, ser efetivo em baixas concentrações, ser estável, ter uma cor como indicador de sua presença no leite, ser efetivo durante certo período de tempo, não ser alergênico e nem apresentar toxicidade aos manipuladores e outros que entram em

contato com o produto e, ainda, após o seu descarte, não representar um risco ao meio ambiente (Kroger, 1985).

Na intenção de encontrar novos substitutos ao $K_2Cr_2O_7$, Dunham et al. (1978) propuseram a substituição pela Hexamina Clorada Quaternária³ (*Chlorinated Quaternized Hexamine*), disponibilizada na forma de comprimido. Nesse estudo, os teores de gordura para amostras de leite com o $K_2Cr_2O_7$ foram 0,10 menores ($p < 0,01$) quando comparados com as amostras adicionadas de hexamina clorada quaternária, para os dias dois e cinco de armazenamento da amostra em temperatura ambiente. Também, ficou comprovada a eficácia da hexamina clorada quaternária através dos resultados obtidos na técnica de contagem padrão em placas, na qual um comprimido em 56ml de leite controlou o crescimento bacteriano por três semanas. Concluiu-se que esta substância pode ser substituída, sem problemas para a diminuição no teor de gordura, podendo ser armazenada por mais tempo e não ter problema de resposta alérgica como ocorre com o $K_2Cr_2O_7$. A sua desvantagem estaria no armazenamento, que se torna crítico por promover alterações na cor do comprimido ao longo do tempo e necessitar de refrigeração e baixa unidade (Kroger, 1985).

O bronopol também surgiu como uma alternativa ao dicromato para a conservação de amostras de leite destinadas à análises de composição. Trata-se de um conservante bactericida, também utilizado na conservação de cosméticos e preparações farmacêuticas, que tem a vantagem de não causar reações alérgicas (Ardö, 1978).

Em 1982, Ardö avaliou a possibilidade do uso deste mesmo conservante (0,02%) na

análise de contagem de células somáticas (Fossomatic[®], Foss Electric A/S, Hillerød/DK) e verificou ser satisfatório na proporção de 0,02g/100ml em amostras com menos de cinco dias de armazenamento em temperatura ambiente. Outra constatação importante foi a presença de sinais fluorescentes mais fortes emitidos em amostras com bronopol quando comparados com aquelas sem conservante. A explicação proposta pelo pesquisador é que, na presença do bronopol, a concentração do complexo DNA-brometo de etídeo nas células é aumentada. Visto que o bronopol altera a permeabilidade da membrana celular e, considerando este mesmo efeito nas células somáticas, significaria uma maior penetração do brometo de etídeo dentro das células e, portanto, maior reação com o DNA, o que geraria sinais fluorescentes mais intensos (Stretton e Manson, 1973, citados por Ardö, 1982). Concluindo, os resultados de CCS para amostras sem conservantes são subestimados pelo equipamento Fossomatic[®] (Foss Electric A/S, Hillerød/DK) e as diferenças das médias podem alcançar 10% entre amostras com bronopol e sem conservante (Ardö, 1982).

Em um estudo no Canadá, os benefícios do uso do bronopol também foram comprovados em análises de composição (gordura e proteína) e de células somáticas em leite, em contrapartida ao dicromato de potássio (Monardes et al., 1996). Dentre os tratamentos testados, comparou-se a diferença entre o bronopol na forma de comprimido e na forma líquida. Tanto na análise de composição (método de infravermelho) quanto na CCS (Foss-O-Matic 215) não foi encontrada diferença estatística. A única vantagem encontrada no produto na forma líquida foi que, devido a sua fórmula conter substâncias inibidoras de

³ [1-(3-chloroallyl)-3, 5, 7-triaza-1-azoniaadamantane chloride]
W-A tablets, Agro-Chemical Products, Inc.,
Long Island City, NY.

mofa e levedura⁴, as amostras podiam ser mantidas por três dias sem refrigeração, mesmo em condições de calor.

A evolução dos equipamentos automatizados para a contagem bacteriana permitiu maior demanda de amostras para esta análise, que a princípio, pelo método de referência, demorava em torno de 48 a 72 horas, além de ser laborioso, o que tornava inviável grandes quantidades de amostras diárias. Os equipamentos de citometria de fluxo reduziram esse tempo para dez minutos, introduzindo a contagem bacteriana na rotina dos laboratórios. Essa mudança gerou a necessidade de utilização de um conservante bacteriostático nas amostras de leite, de forma a retratar a contagem bacteriana mais próxima da encontrada nos tanques no momento da coleta. Por isso, a viabilidade do uso do bronopol nas análises microbiológicas é contraditória e as pesquisas são escassas (Cassoli, 2005; Leite, 2006; Martins et al., 2006).

2.4.2 Uso do azidiol como conservante do leite cru

A vasta extensão territorial e o grande número de propriedades leiteiras no Brasil tornam obrigatório o uso de conservantes nas amostras de leite destinadas às análises de composição, CCS e contagem bacteriana. A presença de apenas oito laboratórios pertencentes à RBQL, localizados em regiões centrais, também contribuiu para a necessidade de aumentar a vida útil dessas amostras. Atualmente, é feita a coleta de duas amostras de leite, uma adicionada de bronopol, para análise de composição e CCS, e outra adicionada de azidiol, para análise da contagem bacteriana. A coleta de duas amostras contribuiu para o maior tempo de retenção do carreteiro na propriedade e para o aumento do custo com o transporte.

⁴ 20% de 2 - bromo - 2 - nitropropano - 1,3 - diol; 20% de 2 - bromo - 2 - nitropropanol e 60% de substâncias inertes.

O azidiol é composto de azida sódica, cloranfenicol, etanol, citrato de sódio e azul de bromofenol. O efeito bacteriostático se deve a ação da azida sódica na inibição do processo de respiração aeróbia, por interferir na cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria (Leite, 2006). A viabilidade do uso de azidiol como conservante do leite foi testada em 1987 para análise química (Milko-Scan[®]), bacteriológica (Bactoscan[®], Foss Electric A/S, Hillerød/DK) e citológica (Fossomatic[®], Foss Electric A/S, Hillerød/DK). O objetivo foi utilizar apenas uma amostra para estas distintas análises, reduzindo custos de coleta e de transporte. Nesse experimento, a eficácia foi comprovada e o tempo de vida da amostra sugerida pelos autores foi de pelo menos uma semana armazenada a 4°C (Barcina, et al., 1987).

Porém, estudos recentes mostraram o contrário. O uso de azidiol na análise de CCS causou uma diminuição nos valores quando comparado ao tratamento com o bronopol, em amostras de leite refrigeradas de ovelha (Gonzalo et al., 2003) e de vaca (Cassoli, 2005; Leite, 2006), talvez pelo fato de o bronopol propiciar sinais fluorescentes mais intensos em equipamentos eletrônicos baseados na citometria de fluxo (Ardö, 1982). Por outro lado, o bronopol foi testado na análise de contagem bacteriana e não foi indicado por subestimar a população microbiana no leite cru (Cassoli, 2005; Leite, 2006; Martins et al., 2006). Os danos provocados nas células microbianas pela ação bactericida do bronopol, provavelmente, alteram a identificação destes microrganismos pelo sistema óptico do equipamento (Cassoli, 2005).

O conservante azidiol na forma líquida, que é adicionado no momento da coleta das amostras na propriedade rural, colabora para o risco de contágio da amostra por manipulação excessiva, perigo de contato físico com o composto tóxico (azida sódica),

contaminação acidental do leite enviado ao laticínio e dosagem errada do conservante (excesso ou escassez). Na tentativa de solucionar este problema, foi elaborado e viabilizado comercialmente o azidiol na forma de comprimido. Um teste inicial mostrou resultados estatisticamente iguais aos do azidiol na forma líquida, garantindo a concentração de 4,79 mg de azida sódica e 0,2 mg de cloranfenicol (Leite, 2006). Com essa substituição, espera-se que ocorra um menor número de não conformidades, relacionadas ao protocolo de coleta e envio de amostras. De acordo com Fonseca (2005), dentre as não conformidades ocorridas em 50.434 amostras de leite recebidas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (EV – UFMG), durante o período de dezembro de 2003 a janeiro de 2005, 173 estavam relacionadas com erros na adição do conservante em amostras destinadas a CBT: 100 amostras sem adição de conservante, 52 com conservante em excesso, 16 com pouco conservante e 5 continham azidiol e bronopol.

A vida útil das amostras de leite cru para análise da CBI (Bactocount IBC 150[®], Bentley Instruments Incorporation, Chaska, Estados Unidos da América), foi sugerida por Cassoli (2005) no período máximo de uma semana de armazenamento da amostra refrigerada e por Leite (2006) num prazo de até 10 dias, para amostras conservadas em temperaturas de 4 a 10°C. Isto tem grande importância, pois em 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, são obrigadas a fazer uma nova coleta, gerando custos e dificuldades operacionais. Para o laboratório, excepcionalmente, no caso de falhas nos equipamentos eletrônicos, poderiam analisar as amostras por um período um pouco maior, sem comprometer a confiabilidade dos resultados (Leite, 2006).

2.5 Esterilização de produtos farmacêuticos e embalagens

Uma das etapas cruciais na produção farmacêutica é a esterilização. Existem vários métodos, como o emprego do vapor, do gás óxido de etileno, raio de elétron e radiação gama (Halls, 1994; Garcia et al., 2006).

O óxido de etileno, apesar de ser muito empregado, tem a desvantagem do perigo de deixar resíduos tóxicos e cancerígenos (Halls, 1994; Satomi, 2005; Garcia et al., 2006). O raio de elétron é um método muito rápido de esterilização, mas não é capaz de penetrar muito bem em materiais densos. A radiação gama possui maiores vantagens que os outros métodos, apesar de poder causar alguma alteração do produto (por exemplo, química ou sensorial) ou do material de embalagem submetido a esta energia (Satomi et al., 2005; Garcia et al., 2006).

Face ao poder penetrante da radiação gama, os produtos podem ser esterilizados após o envasamento e mesmo após a embalagem, eliminando assim os riscos de contaminações durante o processo (Guidolin et al., 1988). Os principais benefícios desse método, em comparação aos outros, são: não deixar resíduos como o óxido de etileno, ter maior poder de penetração (50 cm) nos produtos e embalagens do que os raios de elétrons (5 cm), não elevar muito a temperatura do produto e ser um processo de validação simples (Garcia, 2006).

2.5.1 Radiação ionizante

A radiação pode ser definida como a emissão e propagação de energia através do espaço ou de um meio material. A radiação ionizante é definida como aquela com até 2000 Å de comprimento de onda, como é o caso das partículas alfa e raios beta, gama e X. Nesses casos, a energia é capaz de destruir microrganismos sem elevar muito a temperatura da matéria (alimentos,

embalagens, fármacos, materiais médico-odonto-hospitalares, cosméticos, etc.) e por isso esse processo é chamado de “esterilização fria” (Jay, 1996; Brasil, 2001; Smith e Pillai, 2004).

Essa radiação ioniza os átomos da substância a ela submetida, sem que a energia liberada ultrapasse o limiar das reações nucleares, que poderiam induzir radioatividade nos produtos irradiados (Jay, 1996; Brasil, 2001; Smith e Pillai, 2004).

2.5.1.1 Radiação gama

Os raios gama são radiações eletromagnéticas emitidas pelos núcleos de átomos excitados de elementos como os isótopos radioativos de Cobalto-60 ou Césio-137. Estes têm excelente poder de penetração, diferente dos raios beta, e possuem energia suficiente para remover dos átomos os seus elétrons e formar íons ou radicais livres. Através deste princípio, são capazes de destruir certos microrganismos, pois esses elétrons livres colidem com as cadeias químicas das moléculas do material nucléico dos microrganismos e as quebram. A energia ionizante pode interagir com os microrganismos por meio de dois mecanismos: direto e indireto. No caso do mecanismo direto a ação é direta na cadeia de ácidos nucléicos do microrganismo, provocando sua inviabilidade ou impossibilitando-o de se reproduzir. No mecanismo indireto, o dano causado ao material genético ocorre em moléculas adjacentes ao ácido nucléico, mas que reagem com ele (Jay, 1996; Smith e Pillai, 2004).

São variadas as finalidades do uso da radiação gama. A esterilização de material médico-hospitalar, odontológico, de laboratório, frascos, embalagem de medicamentos, de alimentos, de fármacos, e muitos outros é uma delas. Outras utilizações são a descontaminação, desinfestação e redução de carga microbiana

(alimentos, cosméticos, fitoterápicos, etc.) e a modificação de materiais, como a coloração de vidros e tratamento de pedras preciosas.

O tratamento de alimentos através da radiação gama tem o intuito de reduzir a contagem bacteriana e aumentar o tempo de preservação do produto, sendo um método muito conhecido, bastante difundido com a Segunda Guerra Mundial e aprovado no Brasil desde 1985, por uma legislação que foi revista e ampliada através da Resolução RDC nº21 de 26 de janeiro de 2001. Esse processo físico consiste em submeter o alimento, já embalado ou a granel, a doses controladas de radiação ionizante, com finalidades sanitárias, fitossanitárias e/ou tecnológicas (Halls, 1994; Brasil, 2001; Smith e Pillai, 2004).

A sensibilidade relativa de diferentes microrganismos à radiação ionizante está relacionada aos respectivos valores de D_{10} , ou seja, a dose requerida para reduzir 90% de uma população de microrganismos. Dessa forma, quanto menor for este valor, maior a sensibilidade (radiossensibilidade) do microrganismo. Entretanto, outras características como a carga microbiana no alimento, a presença ou ausência de oxigênio, a fase de crescimento do microrganismo e o estado físico em que o alimento se encontra (por exemplo, congelado), interferem na radiossensibilidade dos microrganismos (Jay, 1996; Smith e Pillai, 2004).

2.5.2 Óxido de etileno

A exposição ao óxido de etileno é um método eficaz de esterilização. Entretanto, devido ao risco relacionado aos efeitos carcinogênicos e mutagênicos dos resíduos, seu uso tem sido restringido ou, até mesmo, proibido em certos países, como os da União Européia.

Outra restrição é o tempo de 14 dias de aeração forçada para eliminação total dos resíduos (Halls, 1994; Satomi, 2005).

Segundo a Portaria Interministerial nº482 (16/04/99), o uso de óxido de etileno para esterilização, reesterilização, reprocessamento ou outros processos de redução de carga microbiana, está proibido em produtos que não materiais e artigos médico-hospitalares (Brasil, 1999).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Durante o período de julho a agosto de 2006 foram coletadas 76 amostras de leite cru (aproximadamente 40ml cada), provenientes de uma indústria de laticínios situada em Belo Horizonte, Minas Gerais.

As amostras foram coletadas após homogeneização do leite nos caminhões isotérmicos na plataforma de recepção. Para caminhão pequeno foi feita uma amostragem com misturas (“pool”) de leites das duas aberturas do tanque do caminhão e em caminhão duplo (“romeu e julieta”) das três aberturas dos tanques. No momento da coleta a temperatura da mistura foi medida com um termômetro digital calibrado (Delta TRAK) e anotada. O volume deste “pool” foi de aproximadamente 400ml.

Antes de cada amostra ser utilizada, foi retirada uma alíquota para a análise de crioscopia (ITR MK-540).

No laboratório de análises físico-químicas do próprio laticínio, cada amostra foi dividida em sete alíquotas de aproximadamente 40 ml de leite que foram acondicionadas em frascos de polietileno estéril com identificação. Cada uma destas subamostras recebeu um tratamento:

T1-Sem adição de azidiol (controle);

T2-Adição de azidiol líquido (quatro gotas);
T3-Adição de um comprimido de azidiol não esterilizado;

T4-Adição de um comprimido de azidiol esterilizado (10 KGy);

T5-Adição de um comprimido de azidiol esterilizado (15 KGy);

T6-Adição de um comprimido de azidiol esterilizado (20 KGy);

T7-Adição de um comprimido de bronopol;

T8-Adição de um comprimido de azidiol esterilizado pelo óxido de etileno (apenas em 14 amostras).

Em seguida, as subamostras foram homogeneizadas por agitação suave e acondicionadas em caixa de material isotérmico com gelo reciclável. A homogeneização por agitação suave foi repetida após 30 minutos da adição dos conservantes.

3.2 Identificação e transporte das amostras

A identificação das amostras foi feita por etiquetas com códigos de barra que caracterizavam o número da amostra e o tratamento.

Durante o período de coleta, as amostras foram acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável, mantendo uma temperatura média de aproximadamente 7°C.

Após o término da coleta, as amostras foram transportadas de carro diretamente para o Laboratório de Análise da Qualidade do Leite e o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, ambos situados na Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG).

3.3 Análises laboratoriais

Ao chegar à EV - UFMG as amostras foram direcionadas para as análises de contagem bacteriana individual, composição, CCS e

contagem padrão em placas num período de até 6 horas após a coleta.

3.3.1 Contagem Padrão em Placas (CPP)

No Laboratório de Microbiologia Alimentos (EV - UFMG) os tratamentos T1 e T2 foram submetidos à análise microbiológica de contagem de microrganismos mesófilos à 32°C±1°C, segundo a técnica descrita pela *American Public Health Association* (APHA, 1992). O diluente utilizado foi água peptonada tamponada a 0,1% e o meio de cultura foi ágar padrão para contagem (DIFCO). Todas as amostras foram analisadas em duplicata com pelo menos três diluições cada. Após a incubação por 48 horas±3 horas em estufa as placas contendo entre 25 e 250 colônias foram contadas.

3.3.2 Contagem Bacteriana por citometria de fluxo

Terminado o plaqueamento das amostras relativas aos tratamentos T1 e T2, as respectivas alíquotas destas amostras foram processadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite, onde juntamente com as amostras relativas aos tratamentos T3, T4, T5, T6 e T8 foram submetidos à análise de contagem bacteriana no equipamento Bactocount IBC 150® (Bentley Instruments®) (Bentley Instruments, 2002). Este equipamento realiza a contagem individual de bactérias pelo método de citometria de fluxo.

Estas análises também foram feitas em duplicata, utilizando-se um comando no software do equipamento que permite que duas alíquotas de cada subamostra sejam analisadas num mesmo lote.

A contagem individual de bactérias é transformada em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml) por meio de uma curva de regressão linear, gerada de forma automática após a calibração do equipamento (Bentley Instruments, 2002).

3.3.3 Análise de composição e contagem de células somáticas do leite

No Laboratório de Análise da Qualidade do Leite, o tratamento T7 foi analisado no equipamento Bentley Combsystem® (Bentley Instruments®) para composição centesimal e contagem de células somáticas, de acordo com o fabricante (Bentley Instruments, 1997; Bentley Instruments, 1998), após calibração com amostras padrão de leite cru de origem canadense.

Esta análise foi necessária para certificar que o leite se encontrava dentro dos padrões normais para estes parâmetros, ou seja, teor de gordura mínimo de 3g/100ml, teor mínimo de proteína de 2,9g/100ml e extrato seco desengordurado mínimo de 8,4g/100ml, e contagem de células somáticas máxima de $1,0 \times 10^6$ células/ml, de acordo com os valores preconizados na IN-51 (Brasil, 2002). Juntamente com o índice crioscópico essas análises aumentaram as chances de rastrear possíveis amostras fraudadas, como por exemplo, por adição de água e/ou reconstituintes, ou amostras provenientes de coletas mal homogeneizadas.

3.4 Análise Estatística

3.4.1 Contagem bacteriana por citometria de fluxo

Para analisar as diferenças estatísticas entre as médias dos diferentes tratamentos das amostras de leite cru refrigerado (adição de conservante azidiol comprimido submetido ou não a diferentes processos de esterilização), o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado e as médias comparadas segundo o teste de Duncan, com 95% de intervalo de confiança. Os resultados originais de unidades formadoras de colônia/ml (UFC/ml) obtidos pelo equipamento eletrônico ou pela contagem padrão em placas foram transformados em logaritmo na base 10 (log) (Sampaio, 1998).

3.4.2 Contagem padrão em placas (CPP)

Para analisar a possibilidade de substituir o método de referência de contagem padrão em placas, realizado com amostras de leite cru, pelo método de referência modificado, realizado com amostras de leite cru adicionadas do conservante azidiol, utilizou-se o modelo de regressão linear (MINITAB 12). No eixo X considerou-se a “técnica padrão” (método de referência) e no eixo Y a “técnica modificada” a ser testada:

$$Y_i = b_0 + b_1x_i + e_i$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras chegaram ao laticínio com temperatura igual ou inferior a 10°C e aquelas com índice crioscópico acima de 0,530°H foram desconsideradas e a maioria dos resultados encontrados de composição e de contagem de células somáticas (CCS) esteve de acordo com aqueles estabelecidos pela IN-51/2002 (Brasil, 2002) (Tabela 1). Exceto por uma única amostra com valor de CCS um pouco acima de 10⁶ cels/ml e sete amostras (9,2%) com valor de ESD abaixo de 8,4g/100mg, provavelmente por causa dos valores relativamente baixos encontrados para o teor de lactose nessas amostras (≤4,4g/100g) e, no caso de uma das amostras, também CCS elevada (1,4 x10⁶ cels/ml). Segundo Harding (1995), no leite de bovinos, os teores de lactose relatados na literatura variam de 4,8 a 4,9%. Em Minas Gerais, num estudo utilizando 50.434 amostras, os valores médios e desvios-padrão encontrados para ESD e lactose foram de, respectivamente, 8,69±0,24 e 4,51±0,12 g/100g (Fonseca, 2005). Mas, os valores em desacordo com a IN-51/2002 não foram considerados suspeitos, pois estas

variações de composição são perfeitamente normais e estão relacionadas a fatores genéticos, fisiológicos e ambientais (Harding, 1995). A utilização de amostras idôneas previne possíveis interferências nas respostas das amostras estudadas. No caso da homogeneização incorreta da amostra, segundo Jackson (1981), é possível coletar maior ou menor teor de gordura que pode carrear maior ou menor quantidade de microrganismos, respectivamente.

Pela análise das médias dos logaritmos de UFC/ml, verificou-se que não houve diferença estatística significativa (p>0,05) entre as amostras adicionadas de diferentes formas do conservante azidiol (tratamento com azidiol líquido, comprimido e comprimido irradiado) (Figura 2). Os valores das médias e desvios padrão das contagens bacterianas se encontram na Tabela 2.

Leite (2006) também não constatou diferença significativa (p>0,05) nas contagens bacterianas utilizando o mesmo equipamento, em seis amostras de leite cru conservadas com o azidiol líquido e com o azidiol comprimido não esterilizado, encontrando médias semelhantes a esse estudo e desvio-padrão um pouco maiores: 5,68±1,01 e 5,76±0,99 log UFC/ml, respectivamente. O comprimido de azidiol contém uma concentração final de 4,79mg de azida sódica e 0,2mg de cloranfenicol, equivalente a 130µL gotas de azidiol líquido. Esta equivalência de princípio ativo e a boa solubilidade da formulação testada resultaram em igualdade entre os tratamentos com azidiol líquido e comprimido por até 10 dias de estocagem da amostra sob refrigeração (Leite, 2006).

Tabela 1. Médias dos resultados de composição (gordura, proteína, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado) e de contagem de células somáticas (CCS) de 76 amostras (n) de leite cru colhidas em caminhões-tanque analisadas em equipamento eletrônico e os respectivos padrões estabelecidos na IN-51/2002 (MAPA)

Variáveis analisadas	n	Média±desvio padrão	Mínimo	Máximo	Padrão estabelecido IN- 51
Gordura (g/100g)	76	3,64±0,18	3,20	4,18	≥3
Proteína (g/100g)	76	3,14±0,11	2,86	3,35	≥2,9
Lactose (g/100g)	76	4,47±0,08	4,25	4,61	Sem padrão
Extrato seco total (g/100g)	76	12,19±0,27	11,46	12,78	Sem padrão
Extrato seco desengordurado (g/100g)	76	8,55±0,17	8,11	8,90	≥8,4
CCS (cels/ml)	76	4,64x10 ⁵ ±1,9x10 ⁵	1,9 x10 ⁵	1,4 x10⁶	≤1,0x10 ⁶

Tabela 2. Médias e desvios-padrão dos resultados de contagem microbiana por citometria de fluxo, valores reais (UFC/ml x 1000) e transformados (log UFC/ml) em 76 amostras de leite cru, em função do tipo de tratamento (adição ou não de conservante azidiol)

Tratamento	n	Média (UFC/ml)	Média (log UFC/ml)
		± desvio padrão	± desvio padrão
		Valores reais (x 1000)	Dados transformados
Sem conservante	76	2.557±2.023	6,17 ^A ±0,56
Azidiol líquido	76	948± 905	5,68 ^B ± 0,60
Azidiol comprimido não esterilizado	76	1.176± 1.094	5,80 ^B ± 0,56
Azidiol comprimido 10	76	1.217± 1.148	5,80 ^B ± 0,58
Azidiol comprimido 15	76	1.155± 1.117	5,77 ^B ± 0,59
Azidiol comprimido 20	76	1.222± 1.142	5,80 ^B ± 0,59

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

A substituição do conservante azidiol líquido pelo comprimido elimina a etapa de produção do azidiol líquido nos próprios laboratórios da RBQL, tornando a fase de preparação das amostras mais rápida para serem enviadas aos laticínios e diminuindo o tempo de permanência do carreteiro nas propriedades. Além disso, são reduzidas as chances de contaminação da amostra de leite e do próprio leite que está sendo coletado dos tanques de refrigeração, pela manipulação excessiva do produto na forma líquida e aumenta o prazo de validade do azidiol na forma de comprimido para mais de um mês, gerando menos danos ambientais e perdas com dosagem excessiva.

De acordo com Fonseca (2005), das 50.434 amostras de leite provenientes de tanques refrigeradores de Minas Gerais analisadas no Laboratório de Análises da Qualidade do Leite (EV-UFMG), durante o período de dezembro de 2003 a janeiro de 2005, foram detectadas pelo menos 3.281 não conformidades relacionadas ao protocolo de

coleta e envio de amostras para contagem bacteriana. Dessas, 100 amostras não foram adicionadas de azidiol, 52 continham azidiol em excesso, 16 foram adicionadas de pouco conservante e cinco foram adicionadas de azidiol e bronopol. A solução imediata para estas não conformidades, que têm impacto nos resultados, é o uso do conservante azidiol na forma sólida (Fonseca, 2005).

Apesar do tratamento com azidiol comprimido não esterilizado (C0) ter sido estatisticamente igual aos outros, não seria adequada a recomendação do uso deste sem o processo de esterilização, já que em condições normais de obtenção e envase ocorre muita manipulação, podendo tornar-se uma potencial fonte de contaminação do leite. No entanto, o uso do comprimido irradiado a 10 KGy (C10) garante a assepsia do comprimido e do frasco e a baixa dose de radiação evita possíveis modificações na estrutura do comprimido, assim como dos componentes ativos.

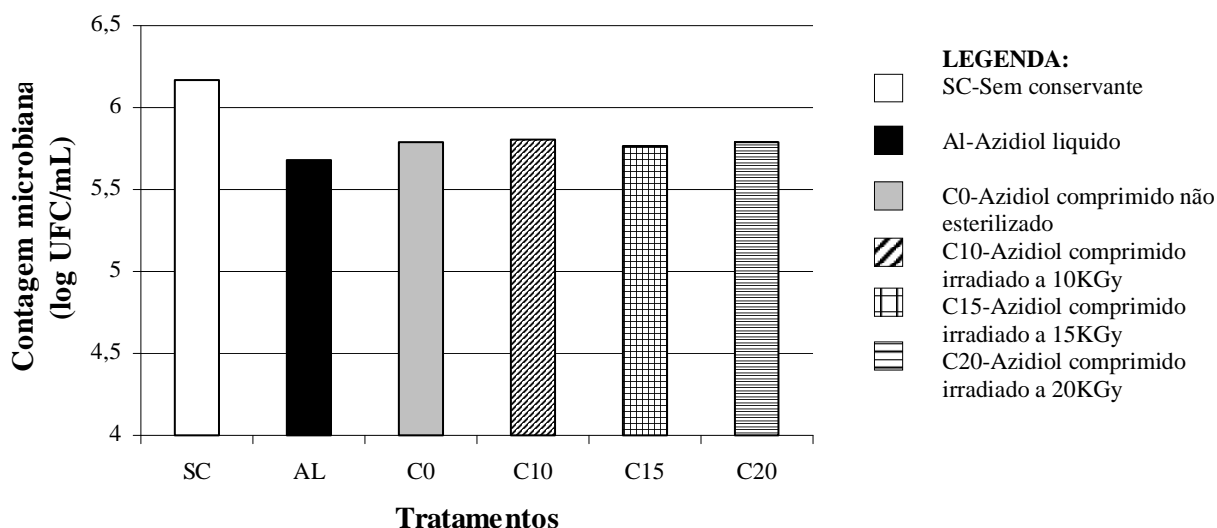


Figura 2. Médias das contagens bacterianas por citometria de fluxo em 76 amostras de leite cru refrigerado sem conservante (SC), adicionadas de azidiol líquido (AL), azidiol comprimido não esterilizado (C0) e azidiol comprimido irradiado (C10, C15 e C20)

Nesse trabalho, testou-se também a possibilidade de esterilizar o comprimido de azidiol pela injeção de gás de óxido de etileno (COE). Do total de 76 amostras, 14 receberam o tratamento 8 (COE) e foram analisadas pelo equipamento eletrônico Bactocount IBC 150[®] e os resultados foram comparadas com os outros tratamentos de esterilização ou não (C0, C 10, C15 e C20) e com o tratamento controle (AL). Pela análise das médias dos logaritmos de UFC/ml, não verificou-se diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3 e Figura 3).

O uso do comprimido esterilizado por óxido de etileno também pode ser uma alternativa. Porém, mesmo este método podendo ser empregado em produtos médico-hospitalares, materiais de laboratórios, embalagens, substâncias farmacêuticas, dentre outros (Brasil, 1999), é relevante o fato de o óxido de etileno ser altamente tóxico, cancerígeno e mutagênico (Halls, 1994). Embora o óxido de etileno não esteja mais presente após o processo de esterilização por ser volátil.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão dos resultados de contagem bacteriana por citometria de fluxo, valores reais (UFC/ml x 1000) e transformados (log UFC/ml) em 14 amostras de leite cru em função do tipo de tratamento (comprimidos de azidiol esterilizados ou não)

Tratamento	n	Média (UFC/ml)	Média (log UFC/ml)
		± desvio padrão	± desvio padrão
		Valores reais (x 1000)	Valores transformados
Azidiol líquido	14	730±642	5,61 ^A ± 0,55
Azidiol comprimido não esterilizado	14	887± 749	5,74 ^A ± 0,51
Azidiol comprimido esterilizado óxido etileno	14	790± 727	5,69 ^A ± 0,49
Azidiol comprimido irradiado 10KGy	14	899± 714	5,74 ^A ± 0,53
Azidiol comprimido irradiado 15KGy	14	878± 707	5,72 ^A ± 0,54
Azidiol comprimido irradiado 20KGy	14	913± 741	5,74 ^A ± 0,54

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

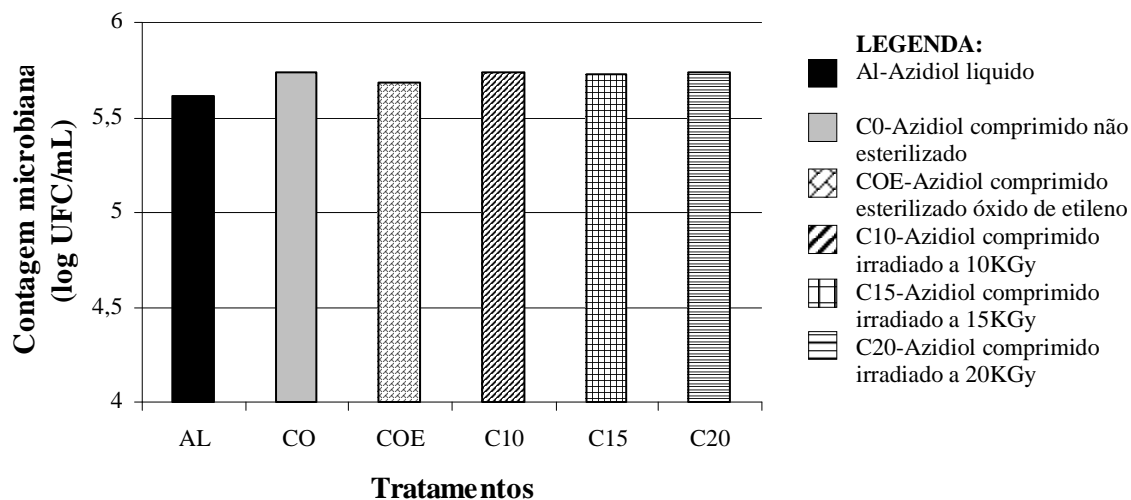


Figura 3. Médias das contagens microbianas por citometria de fluxo em 14 amostras de leite cru refrigerado adicionadas de azidiol líquido (AL), azidiol comprimido não esterilizado (CO) e azidiol comprimido esterilizado pelo óxido de etileno (COE) e pela radiação gama (C10, C15 e C20)

Ainda nesse experimento, as amostras de leite cru sem conservantes e as adicionadas de azidiol líquido foram plaqueadas segundo o método de referência para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos (APHA, 1992) totalizando 53 amostras (amostras descartadas referem-se a contagens superiores a 250 ou inferiores a 25 colônias ou contaminadas). Os resultados obtidos utilizando a “técnica padrão” que utiliza leite cru sem conservante foram comparados com os obtidos pela “técnica modificada”, utilizando o leite adicionado de azidiol e as médias e desvios-padrão podem ser observados na Tabela 4.

Através de uma curva de regressão linear, para analisar a possibilidade de substituição da “técnica padrão” pela “técnica modificada” chegou-se a seguinte fórmula (baseada em $Y_i = b_0 + b_1x_i + e_i$):

$$\log \text{UFC/ml ("técnica modificada")} = 1,31 + 0,733 \log \text{UFC/ml ("técnica padrão")}$$

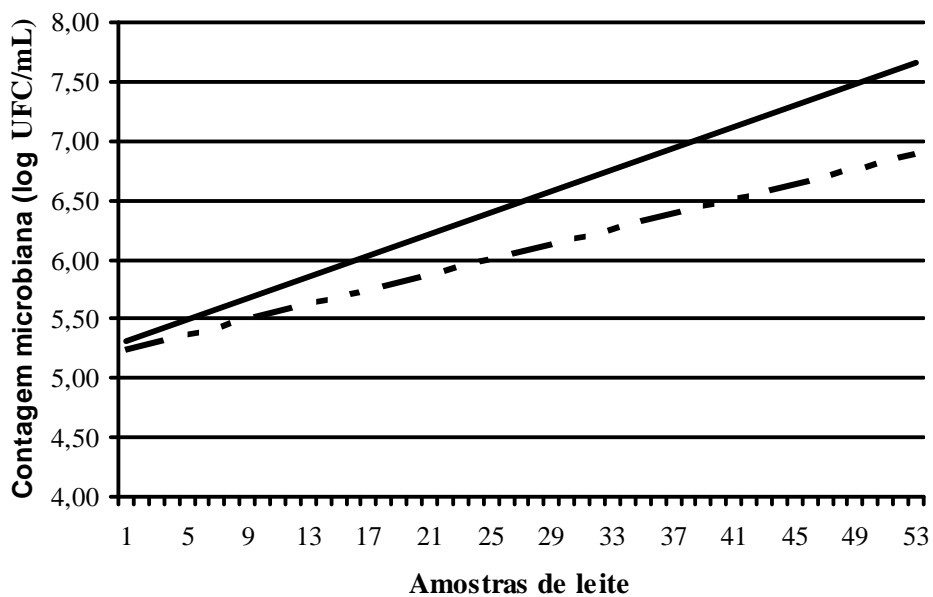
A análise mostrou que as duas técnicas são diferentes, já que b_0 foi diferente de zero.

Porém, através de uma análise de correlação, concluiu-se que essa é alta, como pode ser observado nas curvas de tendência (Figura 4). A correlação é maior ainda quando se exclui os valores de contagem microbiana na “técnica padrão” maiores que 1.000.000 UFC/mL (Figura 5).

Numa pesquisa semelhante realizada por Kaluwa (2006) testou-se além do tratamento com azidiol um segundo com o conservante ácido bórico. Através da análise de variância, do teste de Newman-Keuls e do coeficiente de correlação foram encontrados resultados estatisticamente iguais ($p > 0,05$) na técnica de contagem padrão em placas comparando-se amostras de leite cru sem conservantes com amostras de leite cru adicionadas de conservantes (azidiol ou ácido bórico). Para o autor a pesquisa foi realizada com poucas amostras, mas está de acordo com os resultados obtidos por outros pesquisadores (Kaluwa, 2006).

Tabela 4. Médias e desvios-padrão dos resultados de contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, pelo método de contagem padrão em placas (APHA, 1992), valores em log UFC/ml de 53 amostras de leite cru refrigerado em função do tipo de tratamento (sem conservante/"técnica padrão" e com azidiol líquido/"técnica modificada")

Tratamentos	n	Média (log UFC/ml) \pm desvio padrão
Sem conservante	53	6,49 \pm 0,71
Azidiol líquido	53	6,08 \pm 0,64



LEGENDA: ——— "Técnica padrão"
 - - - - - "Técnica modificada"

Figura 4. Linhas de tendências dos resultados de contagem microbiana pelo método de contagem padrão em placas (APHA, 1992) de 53 amostras de leite cru refrigerado sem conservante ("técnica padrão") e com adição de azidiol líquido ("técnica modificada")

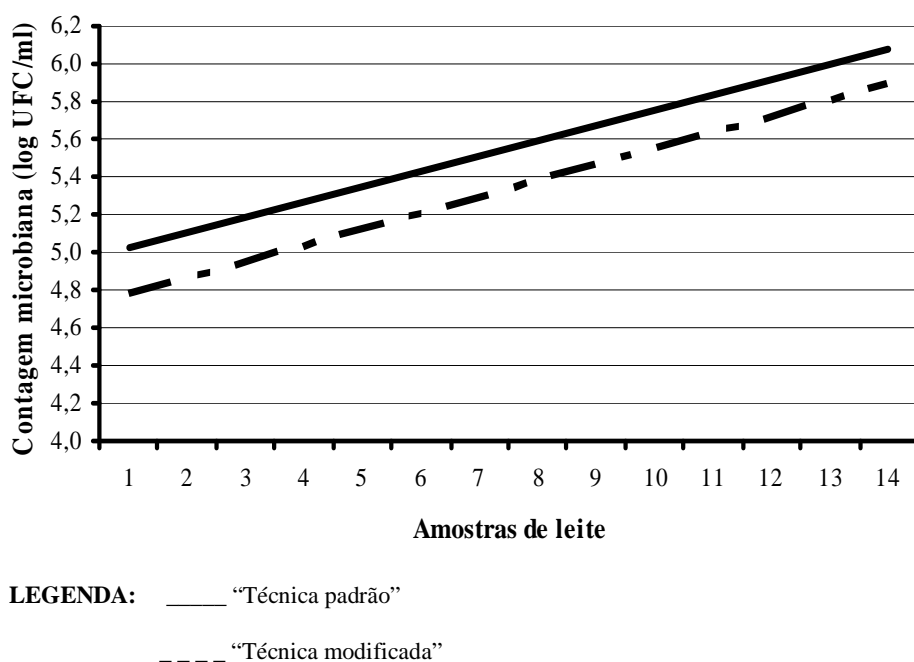


Figura 5. Linhas de tendências dos resultados de contagem microbiana (valores até 1.000.000 UFC/mL) pelo método de contagem padrão em placas (APHA, 1992) de 14 amostras de leite cru refrigerado sem conservante ("técnica padrão") e com adição de azidiol líquido ("técnica modificada")

5. CONCLUSÕES

Há viabilidade técnica para a substituição do conservante azidiol líquido pelo azidiol comprimido nas amostras de leite cru para a análise de contagem bacteriana do leite por citometria de fluxo.

Para assegurar esterilidade comercial, é recomendável que o azidiol na forma de comprimido seja esterilizado dentro do frasco, com radiações gama de 10 KGY, evitando maiores manipulações durante a coleta da amostra e não expondo o comprimido a altas doses de radiação. A esterilização do comprimido por óxido de etileno também é viável.

O uso das amostras com azidiol para contagem padrão em placas (APHA, 1992) é uma alternativa para realizar a calibração semanal do equipamento visando a contagem microbiana por citometria de fluxo, porém maiores estudos são necessários para estabelecer melhor esta correlação já que a análise de regressão linear encontrada nesse trabalho mostrou que as técnicas são diferentes apesar da alta correlação, principalmente em contagens menores do que 1.000.000 UFC/mL.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ÁLVAREZ-BARRIENTOS, A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R. et al. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.2, p.167-195, 2000

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16th ed. Washington: APHA, 1992. 546p.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, 2006.

ARDÖ, Y. Bronopol as a preservative in Milk. **Milchwissenschaft**, v.34, n.1, p.14-16, 1979.

ARDÖ, Y. Bronopol as a preservative in milk samples for the determination of cell content using fossomatic. **Milchwissenschaft**, v.37, n.3, p.139-142, 1982.

BARCINA, Y.; ZORRAQUINO, M.A.; PEDAUYE, J. et al. Azidiol as a preservative for milk samples. **An. Vet. (Murcia)**, v.3, p.65-69, 1987.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. **Somacount 300 operator's manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997. 116p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. **Bentley 2000 operator's manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 79p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. **BactoCount 150 operator's manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49p.

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

BOOR, K.J.; BROWN, D.P.; MURPHY, S.C. et al. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.6, p.1743-1748, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial nº482, artigo 7º, de 16 de abril de 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/482_99.htm> Acesso em: 10/11/2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução – RDC nº21 de 26/01/2001. Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/21_01_rdc.htm> Acesso em: 10/11/2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº51 de 18/09/2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da coleta de Leite Cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 de setembro de 2002, 39p.

BRAMLEY, A.J.; McKINNON, C.H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology**. 2ª ed. Londres: Elsevier Science Publishers, 1990. v.1, p.163-208.

BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: Dürr, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. (Org.). **O compromisso**

com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. p.317-331.

CASSOLI, L.D. Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru. 2005. 46p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **Australian Journal Dairy Technology**, v.51, p.59- 63, 1996.

COUSINS, C.M. Sources of bacteria in farm bulk tank milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.25, n.4, 1972.

DASEN, A.; OLID, R.M.; PITON-MALLERET, C.; GRAPPIN, R. Évaluation du bactoScan 8000 pour la numération automatique et rapide de la flore microbienne du lait cru. **Lait**, v.71, p.661-670, 1991

DAVEY, H.M.; KELL, D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. **Microbiological Reviews**, v.60, n.4, p.641- 696, dec. 1996.
DAIRY PRACTICES COUNCIL. **Subject: Guidelines for the Dairy Industry: DPC 50 - Farm Bulk Tank Collection Procedures.** 1991. Disponível em: <<http://www.dairypc.org/glabstracts.htm>> Acesso: Julho 2003.

DUNHAM, J.R.; BECHTLE, R.M.; OBERLANDER, M. Chlorinated quaternized hexamine and potassium as preservative for milk samples. **Journal Dairy Science**, v.61, n.12, p.1696-1699, 1978.

ENUMERATION of microorganisms. Colony count technique at 30°C.

International IDF Standard, n.100B, 1991.

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

GARCIA, R.; HOWARD, B.; LARUE, R. et al. Sterilization: strategies for gamma sterilization of pharmaceuticals. **Pharmaceutical & Medical Packaging News**, maio, 2004. Disponível em: <<http://www.devicelink.com/pmpn/archive/04/05/004.html>> Acesso em: 17/12/2006.

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.

GOODRIDGE, L.; HILL, A.R.; LENCKI, R.W. A Review of international standards and the scientific literature on farm milk bulk tank sampling protocols. **Journal Dairy Science**, v.85, n.9, p.3099-3104, 2004.

GUIDOLIN, R.; CORRÊA, A; CICALI, R.M.B. *et al.* Sterilization of sera and vaccines by cobalt gamma radiation. **Revista Saúde Pública**, v.22, n.2, 1988. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101988000200007&lng=en&nrm=iso> Acesso 15/12/2006.

HALLS, N.A. **Achieving sterility in medical and pharmaceutical products.** New York: M. Dekker, 1994. 281 p.

HAMANN, J. Milking hygiene, milking and mastitis. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.11, n.5, p.260-264, 1991.

HARDING, F. **Milk Quality**. New York: Blackie Academic & Professional, 1995. 165p.

HAYES, M.C.; RALYEA, R.D.; MURPHY, S.C.; CAREY, N.R.; SCARLETT, J.M.; BOOR, K.J. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. **Journal Dairy Science**, v.84, n.1, p.292-298, 2001.

HEESCHEN, W.H. Legal requirements and payments systems: Situation in the EU and IDF-member countries. In: SYMPOSIUM ON BACTERIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK, 1996, Wolfpassing. **Proceedings**...Brussels: International Dairy Federation, 1996. p.1-18.

HOLM, C.; JEPSEN, L; LARSEN, M.; JESPERSEN, L. Predominant microflora of downgraded danish bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.5, p. 1151–1157, 2004.

JACKSON, A.C. Agitation and sampling of tankers and storage tanks. **Journal Society of Dairy Technology**, v.34, p.98-103, 1981.

JAY, J.M. **Modern Food Microbiology**. 7.ed. New York: Springer Science, 2005. 790 p.

JAYARAO, B.M.; WANG, L. A Study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.82, n. 12, p.2620-2624, 1999.

JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; SAWANT, A.A. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.10, 2004.

JEFFREY, D.C.; WILSON, J. Effect of mastitis-related bacteria on total bacterial count of bulk milk supplies. **Journal of the**

Society of Dairy Technology, v.40, n.2, 1987.

KALUWA, O.L. Influence of various chemical preservatives on the bacteriological quality of raw milk samples. Freie Universität Berlin. Disponível em: <<http://early.vetmed.fu-berlin.de/diss-abstracts/80280.html>> Acesso em: 20/12/2006.

KLETER, G. The bacterial flora in aseptically drawn milk. **Netherland Milk Dairy Journal**, v.28, p.220-237, 1974.

KROGER, M. Instrumental Milk Fat Determination. I. Effects of potassium dichromate concentration and sample storage time on milko-tester results. **Journal Dairy Science**, v.54, n.5, p.735-737, 1970.

KROGER, M. Milk sample preservation. **Journal Dairy Science**, v.68, n.3, p.783-787, 1985.

LEITE, M.O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol. 2006**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (não publicada).

MACKENZIE, N.M.; PINDER, A.C. Flow cytometry and its applications in veterinary medicine. **Research in Veterinary Science**, v. 42, p. 131-139, 1987.

MARSHALL, R.T.; SHELLEY, D.S. Comparisons of tests of milk samples taken conventionally and with an automatic in-line sampler. **Journal of Food Protection**, v.44, p.257-262, 1981.

MARTINS, M.E.P.; OLIVEIRA, A.N.; NICOLAU, E.S. et al. Efeito do conservante bronopol e azidiol quanto binômio tempo e temperatura sobre a contagem bacteriana total do leite cru. In: Congresso Brasileiro de

Qualidade do Leite, 2, 2006, Goiânia. **Anais...** p.9 – 21.

MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; COELHO, K.O. et al. A qualidade do leite na região Centro-Oeste. In: MESQUITA, A.J.; DÜRR, J.W. e COELHO, K.O. (Org.). *Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006.

MILK and Milk Products: Guidance on Sampling. International IDF Standard, n.50C, 1995.

MONARDES, H.G.; MOORE, R.K.; CORRIGAN, B.; RIOUX, Y. Preservation and storage mechanisms for raw milk samples for use in milk-recording schemes. **Journal of Food Protection**, v.59, n.2, p.151-154, 1996.

MOSTELLER, T.M.; BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Troubleshooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.20, n.8, p.606-611, 2000.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, 2005.

NINANE, V.; REU, K.; OGER, R. et al. Évaluation du Bactoscan FC pour la numération des bactéries du lait cru. **Lait**, v.80, p. 527-538, 2000.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SATOMI, L.C.; SORIANI, R.R.; PINTO, T.J.A. Descontaminação de drogas vegetais empregando irradiação gama e óxido de etileno: aspectos microbianos e químicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.4, p.445-450, 2005.

SHAPIRO, H.M. **Practical flow cytometry**. New York: Alan R. Liss, Inc., 2, 1988. 353p.

SILVA, T.L.; REIS, A.; HEWITT, C. et al. Citometria de fluxo-Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, v.74, p.32-40, 2005. Disponível em: <<http://dequim.ist.utl.pt/bbio/77/pdf/citometria2.pdf>> Acesso em: 11/09/2006.

SLAGHUIS, B.A. Contaminating microorganisms and their sources: sources and significance of contaminants on different levels of raw milk production. In: SYMPOSIUM ON BACTERIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK, 1996, Wolfpassing. **Proceedings...**Brussels: International Dairy Federation, 1996. p.19-27.

SMITH, J.S.; PILLAI, S. Irradiation and food safety. **Food Technology**, v.58, n.11, p. 48-55, 2004.

STADHOUDERS, J. Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v.29, p.104-126, 1975.

STRETTON, R.J.; MANSON, T.W. Some aspects of the mode of action of the antimicrobial compound Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol). **Journal of Applied Bacteriology**, v.36, p.61-76, 1973.

SUHREN, G.; REICHMUTH, J.; HEESCHEN, W. Relative detection of pure cultures by various methods relating to macrocolony counts as reference method.

Milchwissenschaft, v.47, n.4, p.231-236, 1992.

SUHREN, G.; REICHMUTH, J. Interpretation of quantitative microbiological results. **Milchwissenschaft**, v.55, n.1, p.18-22, 2000.

SUHREN, G.; WALTE, H.G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. **Bulletin of the IDF**, n. 358, p. 36- 48, 2000.

SUHREN, G.; REICHMUTH, J.; WALTE, H.G. Bacteriological quality of raw milk: Conversion of Bactoscan-FC counts onto the scale of the official method. **Milchwissenschaft**, v.56, n.7, p.380-384, 2001.

ROHRBACH, B.W.; DRAUGHON, F.A.; DAVIDSON, P.M.; OLIVER, S.P. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campilobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, e *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. **Journal of Food Protection**, v.55, n.2, p.93-97, 1992.

VAN DE VOORT, F.R.; KERMASHA, S.; SMITH, J.P.; MILLS, B.L.; NG-KWAI-HANG, K.F. A Study of the stability of record of performance milk samples for infrared milk analysis. *Journal Dairy Science*, v.70,n.8, p.1515-1523, 1987.

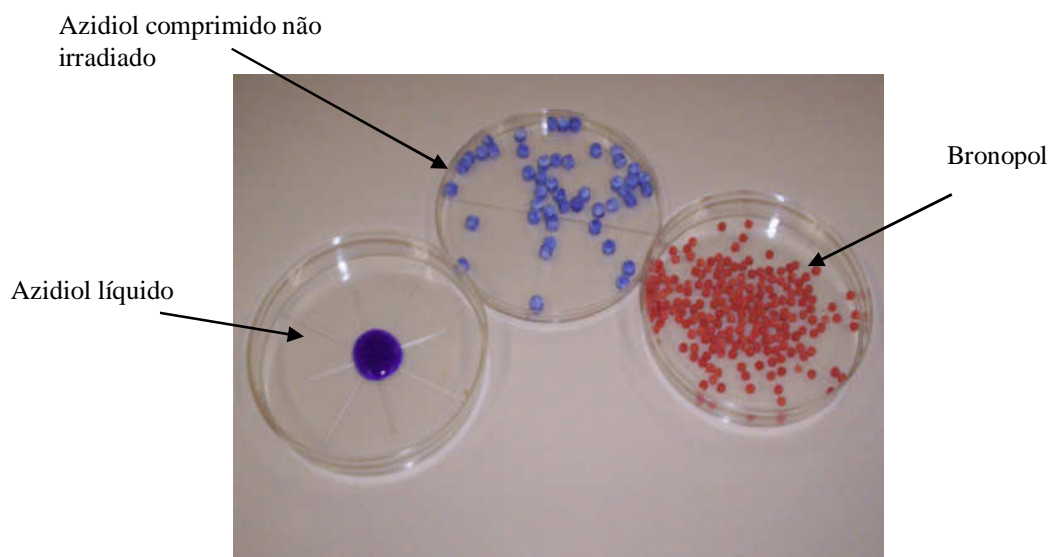
ANEXOS

Anexo 2. Algumas diferenças nos processos de esterilização por radiação gama, óxido de etileno e vapor.

Variáveis	Tipo de esterilização		
	Radiação gama	Óxido de etileno	Vapor
Estrutura do produto	Sem restrições. Penetram em todas as porções do produto	Não atinge cavidades fechadas, este gás é um esterilizante de superfície	Não atinge cavidades fechadas, o vapor é um esterilizante de superfície
Embalagem	Sem restrições. Não exerce danos sobre materiais e selos	Necessita material permeável ou um segundo processo de embalagem, além de previsão de expansão da embalagem. Os selos têm de suportar o vácuo ou o esforço de pressão	Necessita material permeável ou um segundo processo de embalagem, além de previsão de expansão da embalagem. Os selos têm de suportar o vácuo, o esforço de pressão e a umidade
Parâmetros a serem controlados durante o processo	Tempo	Concentração de gás, vácuo, temperatura, umidade relativa, tempo	Vácuo, pressão, temperatura, umidade relativa, tempo
Período de quarentena	Não	5-14 dias	7-14 dias
Tratamento pós-esterilização	Não	Aeração para remover produtos tóxicos	Secagem do produto

Fonte: Adaptado do boletim Embrarad n° 21, disponível em http://www.embrarad.com.br/radacao_comp.asp

Anexo 3. Conservantes de amostras de leite cru destinadas às análises laboratoriais de composição, CCS e CBT



Anexo 4. Resultados de contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, pelo método de contagem padrão em placas, valores em log UFC/ml de 53 amostras de leite cru refrigerado em função do tipo de tratamento (sem conservante/"técnica padrão" e com azidiol líquido/"técnica modificada")

Número da amostra	Técnica padrão (Log UFC)	Técnica modificada (Log UFC)
1	5,09	4,89
2	5,11	5,15
3	5,13	4,78
4	5,14	4,90
5	5,35	5,12
6	5,43	5,02
7	5,45	5,10
8	5,62	5,60
9	5,72	5,10
10	5,88	5,70
11	5,91	5,85
12	5,93	5,83
13	5,94	5,60
14	5,97	5,98
15	6,01	5,90
16	6,07	5,99
17	6,10	5,69
18	6,12	5,93
19	6,23	5,80
20	6,30	5,87
21	6,40	6,07
22	6,41	5,76
23	6,41	5,81
24	6,48	5,88
25	6,49	6,12
26	6,49	6,25
27	6,52	6,14
28	6,53	6,19
29	6,58	6,28
30	6,74	6,52
31	6,74	7,05
32	6,80	6,39
33	6,82	6,21
34	6,99	6,78
35	6,99	6,69
36	7,03	6,66
37	7,04	7,59
38	7,07	6,41
39	7,07	6,67
40	7,08	6,55
41	7,09	6,13
42	7,17	6,67
43	7,18	6,64
44	7,23	6,76
45	7,26	6,66
46	7,26	6,92
47	7,30	5,78
48	7,32	6,26
49	7,33	6,02
50	7,33	7,17
51	7,45	6,76
52	7,48	7,09
53	7,53	5,72
Média ± Desvio padrão	6,49 ± 0,71	6,08 ± 0,64