

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**Franciele Rampazzo Vancin**

**Conservação de amostras de leite cru utilizando diferentes concentrações de  
azida sódica e cloranfenicol**

**Passo Fundo**  
**2018**

**Franciele Rampazzo Vancin**  
**Médica Veterinária**

**Conservação de amostras de leite cru utilizando diferentes concentrações de  
azida sódica e cloranfenicol**

Dissertação de Mestrado apresentada para  
obtenção do título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.  
Orientadora: Dra. Laura Beatriz Rodrigues;  
Linha de Pesquisa: Qualidade e Propriedades  
Funcionais de Alimentos.

**Passo Fundo**  
**2018**

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**Conservação de amostras de leite cru utilizando diferentes concentrações de  
azida sódica e cloranfenicol**

Elaborada por

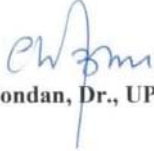
**Franciele Rampazzo Vancin**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Comissão Examinadora

  
Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF  
(Orientadora/Presidente)

  
Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF

  
Carlos Bondan, Dr., UPF

Passo Fundo, RS, Brasil  
2018

CIP – Catalogação na Publicação

---

- V222c Vancin, Franciele Rampazzo  
Conservação de amostras de leite cru utilizando diferentes  
concentrações de azida sódica e cloranfenicol / Franciele  
Rampazzo Vancin. – 2018.  
103 f. : il. color. ; 30 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Laura Beatriz Rodrigues.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)  
– Universidade de Passo Fundo, 2018.
1. Leite - Amostragem. 2. Leite - Conservação. 3. Azida de  
sódio. 4. Cloranfenicol. I. Rodrigues, Laura Beatriz, orientadora.  
II. Título.
- CDU: 637.1

Aos meus pais Ivete e Milton;

Ao meu avô Clementino;

E ao meu marido Claiton.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde, proteção, por acompanhar-me em todos os momentos e por me proporcionar a conclusão de mais uma etapa.

Aos meus pais, Ivete e Milton, minhas bases; por todo o amor, por terem me dado valores, pela confiança e pelo estímulo.... Foram sem dúvida os maiores incentivadores para o meu ingresso no programa de mestrado.

Ao meu avô Clementino, por ser meu exemplo de vida, pelo ensinamento contínuo e especialmente pela amizade.

Ao meu marido Claiton, pela paciência, pela sua incansável boa vontade e por “perder” não um, mas vários fins de semana em que eu precisava estudar. Obrigada pela companhia, pela tolerância, por estar sempre ao meu lado, e pelo amor que nos une.... Te amo!

As minhas irmãs Juliana e Morgana e seus respectivos “anexos”, Marcelo e João Alberto, agradeço pela parceria, compreensão e ajuda de cada um.

Aos meus sogros, Raul e Oneide pelo apoio incondicional, pela confiança, e por todas as vezes em que demonstraram interesse pelos meus estudos.

A minha orientadora querida, Professora Laura, por ter me aceitado, acreditado em mim e permitido trabalhar ao seu lado, pela ajuda em toda trajetória, pela referência profissional e sobretudo pela amizade; fica meu carinho, meu respeito, minha admiração e imensa gratidão.

Aos Professores Luciana e Carlos, por aceitarem compor minha banca de qualificação e posteriormente de defesa, aos quais reitero minha estima e consideração. Não apenas mestres, colegas.... Mas sim, amigos.

Ao Professor Elci Dickel, meu especial reconhecimento, por acreditar em meu potencial, e pela disponibilidade de sempre.

A Professora Luciane Daroit, pelo empenho e preciosismo com que desenvolveu a análise estatística dos dados, bem como pelas “aulas” a cada encontro, fundamentais para o entendimento.

A Universidade de Passo Fundo, minha casa, minha escola, minha formação profissional...

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos da UPF; seu competente corpo docente e prestativos funcionários, pelos ensinamentos e pelo pronto auxílio, agradeço.

Aos colegas de turma do PPGCTA.... Não imagino esse mestrado sem vocês! Nossas conversas, nossos encontros para estudo e nossos momentos de festa.... Tenho enorme carinho por todos!

A Universidade do Contestado, meu local de trabalho, agradeço pelas dispensas para as aulas, pela concessão da estrutura dos seus laboratórios para a realização do experimento, e principalmente pela oportunidade de desenvolver-me profissionalmente.

Ao Laboratório Estadual da Qualidade do Leite – LabLeite, minha segunda família, no qual respondo pela gerência técnica, agradeço por fazer valer meu diploma de Médica Veterinária no emprego dos conhecimentos adquiridos nos bancos da graduação, e pela certeza na escolha da área de trabalho. Orgulho por ser parte desta equipe!

A colega de trabalho Izabel, pela amizade.... Seja nos períodos turbulentos ou navegando em mar calmo...

Aos demais colegas do LabLeite: Ariel, Daisy, Geisa, Ildemar, Janaína, Maicon, Maximiliano, Samantha e Leoneide, o apoio de vocês contribuiu muito para a realização deste, seja nos ensaios, no fracionamento (interminável) do leite em 1440 frascos, ou ainda pelas “eventuais” (para não dizer diárias) queixas pelo odor do leite sem conservante depois do quinto

ou sexto dia de incubação... “Bom Ar” (odorizador) passou a fazer parte da rotina analítica do laboratório.

As queridas Márcia e Kelen Reis, da Embalpharma Embalagens, por disponibilizar o material necessário para a realização do experimento, não medindo esforços para o atendimento às necessidades do projeto e também à Farmacêutica Bioquímica Carine da Cunha, da Milkpharma, por abraçar a ideia e pelo zelo na elaboração dos conservantes.

E não poderia finalizar sem manifestar meu eterno agradecimento aos animais...

*“A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo como seus animais são tratados...” (Mahatma Gandhi)*

Ninguém vence sozinho...

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste, meu mais sincero: MUITO OBRIGADA!!!

*“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrotas, do que formar fileira com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota!”*

*(Theodore Roosevelt)*



## RESUMO

Este teve como objetivo avaliar um método mais eficaz para a conservação de amostras de leite cru, buscando manter sua integridade e confiabilidade na avaliação da qualidade microbiológica, proporcionando a emissão de um resultado seguro e confiável, que retrate as reais condições de produção do leite. Para a realização, foi coletado leite do tanque de refrigeração de duas propriedades rurais com contagens bacterianas previamente conhecidas, abrangendo dois grupos de leite *in natura*: G-1, estando em acordo e G-2, em desacordo, com resultados acima dos parâmetros da normativa vigente para contagem padrão em placas (CPP) obtida eletronicamente. O leite de cada um dos grupos foi fracionado em 720 frascos, compreendendo os seguintes tratamentos: concentração usual de azida sódica e cloranfenicol na pastilha de azidiol (T-1), concentração dupla de azida sódica e cloranfenicol (T-2) e concentração tripla de azida sódica e cloranfenicol (T-3). As amostras foram armazenadas por 14 dias em temperatura de incubação de  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $9^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Foi utilizado como controle, exposto às mesmas variáveis, amostras sem a adição do conservante (T-4). As amostras foram analisadas diariamente ao longo do período de incubação, utilizando para a realização dos ensaios o equipamento *Bentley Bactocount IBC<sup>®</sup>*, da *Bentley Instruments Incorporated*, Chaska, Estados Unidos da América, sendo os resultados expressos em contagem bacteriana individual (CBI) e posteriormente transformados em logaritmo de base 10 ( $\text{Log}_{10}$ ) para o tratamento estatístico. São achados relevantes, que o uso do conservante é imprescindível para a conservação das amostras, já que somente o acondicionamento sob baixas temperaturas não foi suficiente para impedir o aumento da contagem bacteriana ao longo do período de incubação e, conseqüentemente, a deterioração das amostras. Para o T-3 foi evidenciada a melhor condição de conservação, possibilitando a análise da contagem bacteriana até o 12º dia, em temperatura de incubação de  $3^{\circ}\text{C}$ , e até o 8º dia em temperatura de incubação de  $6^{\circ}\text{C}$ , sem alteração significativa dos resultados comparados pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Desta forma, aumentando a concentração de azida sódica e de cloranfenicol da pastilha de conservante, foi possível prolongar a viabilidade analítica das amostras. A partir da avaliação da correlação linear, para o G-1 nos tratamentos utilizando o conservante, não existe associação para as variáveis; em contraponto ao avaliado para o G-2 em que, para os mesmos tratamentos, existe associação, uma vez que aumentando o tempo de incubação, diminuiu o resultado da contagem bacteriana. Tanto para o G-1, como para o G-2, foi evidenciada associação entre as variáveis no T-4 independente da temperatura, ou seja; aumentando o tempo de incubação, aumenta também os resultados da contagem bacteriana.

Palavras-chave: Leite. Azidiol. Contagem Bacteriana Individual. Contagem Padrão em Placas. Citometria de Fluxo.

## ABSTRACT

This study aims to evaluate a more intense method for the preservation of raw milk samples, seeking to maintain their integrity and reliability in the evaluation of microbiological quality, providing a safe and reliable result to portray the real conditions of milk production. In order to do this, milk from cooling tanks of two rural properties with bacterial counts previously known has been collected, including two groups of *in natura* milk: G-1 being in accordance, and G-2 in disaccordance with the parameters of the current regulations for standard plate count (SPC) obtained electronically. The milk of both groups was split in 720 bottles, comprising the following treatments: usual concentration of sodium azide and chloramphenicol of the azidiol tablet (T-1), double sodium azide concentration and chloramphenicol (T-2) and triple sodium azide concentration and chloramphenicol (T-3). The samples were stored for 14 days in incubation temperature of  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and  $9^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Samples without the addition of preservative exposed to the same variables have been used as control (T-4). The samples were analyzed on a daily basis over the period of incubation, using for the carrying out of the trials the equipment *Bactocount Bentley IBC*<sup>®</sup>, *Bentley Instruments Incorporated*, Chaska, United States of America, and the results expressed in individual bacterial count (IBC) and later transformed into base 10 logarithm (Log 10) for the statistical treatment. It's a relevant discovery that the use of preservatives is indispensable for the conservation of the samples, since even under low temperatures, the conditioning is not enough to prevent the increasing of the bacterial count throughout the incubation period, and consequently the deterioration of the samples. The T-3 has shown the best conservation condition, enabling the analysis of bacterial count until the 12th day in incubation temperature of  $3^{\circ}\text{C}$ , and up to the 8th day in incubation temperature of  $6^{\circ}\text{C}$ , without significant change in the results by Tukey test ( $p > 0,05$ ). In such a way, increasing the concentration of sodium azide and chloramphenicol of the conservative tablet, made possible to extend the analytical viability of the samples. According to the evaluation of linear correlation, for G-1 in the treatments utilizing preservatives, there is no association for the variables; on the other hand, the evaluated in G-2 for these treatments shows an association, since with the increasing of incubation time, the result of bacterial count decreases. For G-1, as for G-2, association between variables of T-4 regardless of the temperature was found, that is; increasing the incubation time also increases the results of the bacterial counting.

Keywords: Milk. Azidiol. Individual Bacterial Count. Standard Plate Count. Flow Cytometry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Faixas de temperatura de desenvolvimento de microrganismos .....	27
Figura 2 - Efeito da temperatura e do tempo sobre o crescimento de bactérias .....	28
Figura 3 - Equipamento Bentley Bactocount IBC <sup>®</sup> , da Bentley Instruments Incorporated .....	40
Figura 4 - Percurso da amostra no fluxo laminar (flow cell) em equipamento de citometria de fluxo. ....	41
Figura 5 - Modelo de etiqueta para identificação das embalagens.....	50
Figura 6 - Análise da composição centesimal do leite dos grupos G-1 e G-2 utilizando o equipamento Delta Combiscope FTIR <sup>®</sup> .....	51
Figura 7 - Medição do pH e análise da acidez titulável do leite dos grupos G-1 e G-2 .....	51
Figura 8 - Frascos utilizados para cada tratamento .....	53
Figura 9 - Representação esquemática para a aplicação dos tratamentos e variáveis de cada grupo....	54
Figura 10 - Comando do software do equipamento que permite a leitura em triplicata .....	55
Figura 11 - Princípios de operação do citômetro de fluxo .....	56
Figura 12 - Viabilidade analítica das amostras do G-1, para os tratamentos T-1, T-2 e T-3 .....	73
Figura 13 - Viabilidade analítica das amostras do G-2, para os tratamentos T-1, T-2 e T-3 .....	76
Figura 14 - Efeito do tempo de armazenamento para o T-1, T-2, T-3 e T-4 em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C para ambos os grupos de leite .....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos microrganismos segundo grau de atividade aquosa .....	22
Tabela 2 - Divisão dos microrganismos segundo as faixas de temperatura de desenvolvimento .....	27
Tabela 3 - Classificação dos microrganismos conforme captação de oxigênio .....	29
Tabela 4 - Análise da composição centesimal dos grupos G-1 e G-2 .....	59
Tabela 5 - Média geral, desvio padrão e valores mínimo e máximo do teor de gordura (g/100g) para cada tratamento em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C .....	61
Tabela 6 - Média geral, desvio padrão e valores mínimo e máximo do teor de proteína (g/100g) para cada tratamento em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C .....	61
Tabela 7 - Média geral, desvio padrão e valores mínimo e máximo do teor de lactose (g/100g) para cada tratamento em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C.....	62
Tabela 8 - Média geral, desvio padrão e valores mínimo e máximo do teor de sólidos totais (g/100g) para cada tratamento em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C .....	62
Tabela 9 - Média geral, desvio padrão e valores mínimo e máximo do teor de extrato seco desengordurado (g/100g) para cada tratamento em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C .....	63
Tabela 10 - Média e desvio padrão dos resultados de contagem bacteriana individual ( $\log_{10}$ CBI/mL) do G-1 .....	69
Tabela 11 - Média e desvio padrão dos resultados de contagem bacteriana individual ( $\log_{10}$ CBI/mL) do G-2 .....	70
Tabela 12 - Correlação entre variáveis para o T-1, T-2 e T-3 do G-1 .....	77
Tabela 13 - Correlação entre variáveis para o T-1, T-2 e T-3 do G-2.....	78
Tabela 14 - Correlação entre variáveis para o T-4 do G-1 e G-2 .....	78

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Requisitos microbiológicos a serem avaliados pela RBQL de acordo com a Instrução Normativa N° 7 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento .....	37
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aa: Atividade de Água	°C: Graus Celsius
APHA: American Public Health Association	°D: Graus Dornic
BOD: Demanda Bioquímica de Oxigênio	>: Maior Que
BOD-3: Estufa BOD 3	±: Mais ou Menos
BOD-6: Estufa BOD 6	®: Marca Registrada
BOD-9: Estufa BOD 9	≤: Menor ou Igual Que
CBI: Contagem Bacteriana Individual	<: Menor Que
CBI/mL: Contagem Bacteriana Individual por Mililitro	µL: Microlitro
CPP: Contagem Padrão em Placas	µm: Micrometro
D-0: Dia Zero	R\$: Símbolo do Real (Moeda)
D-14: Dia Quatorze	T°: Temperatura
DNA: Ácido Desoxirribonucléico	US\$: Símbolo do Dólar (Moeda)
DP: Desvio Padrão	
Eh: Potencial de Oxirredução	
FDA: United States Food and Drug Administration	
FTIR: Fourier Transform Infrared	
g: Gramas	
g/100g: Gramas por 100 gramas	
G-1: Grupo 1	
G-2: Grupo 2	
GO: Goiás	
IDF: International Dairy Federation	
IN: Instrução Normativa	
Inmetro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia	
ISO: International Organization for Standardization	
LANAGRO: Laboratório Nacional Agropecuário	
Log: Logaritmo	
Log <sub>10</sub> : Logaritmo de Base 10	
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	
mg: Miligramas	
mg/mL: Miligramas por mililitros	
mL: Mililitros	
mV: Milivolts	
MG: Minas Gerais	
NR: Não Realizado	
p: Probabilidade de Significância	
PA: Pará	
PCA: Plate Count Agar	
PE: Pernambuco	
pH: Potencial Hidrogeniônico	
PNMQL: Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite	
PR: Paraná	
p-valor: Probabilidade do Teste	
r: Coeficiente de Correlação	
RBC: Rede Brasileira de Calibração	
RBQL: Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite	
RIISPOA: Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal	
RNA: Ácido Ribonucléico	
RO: Rondônia	
RS: Rio Grande do Sul	
SC: Santa Catarina	
S.I.F.: Serviço de Inspeção Federal	
SP: São Paulo	
Tpo: Tempo	
T-1: Tratamento 1	
T-2: Tratamento 2	
T-3: Tratamento 3	
T-4: Tratamento 4	
UFC: Unidade Formadora de Colônia	
UFC/mL: Unidade Formadora de Colônia por Mililitro	
UnC: Universidade do Contestado	
UPF: Universidade de Passo Fundo	

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
2.1	QUALIDADE DO LEITE CRU .....	18
2.2	MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DO LEITE .....	19
2.2.1	Microrganismos psicrotróficos.....	19
2.2.2	Microrganismos mesófilos .....	20
2.2.3	Microrganismos termófilos e termodúricos .....	20
2.3	FATORES INTRÍNSECOS E EXTRÍNSECOS PARA MULTIPLICAÇÃO DE MICROORGANISMOS.....	21
2.3.1	Fatores intrínsecos .....	21
2.3.1.1	<i>Atividade de água</i> .....	22
2.3.1.2	<i>Potencial hidrogeniônico</i> .....	23
2.3.1.3	<i>Potencial de oxirredução</i> .....	24
2.3.1.4	<i>Composição química do leite</i> .....	25
2.3.1.5	<i>Substâncias antimicrobianas naturais</i> .....	26
2.3.2	Fatores Extrínsecos .....	26
2.3.2.1	<i>Temperatura</i> .....	27
2.3.2.2	<i>Umidade relativa</i> .....	28
2.3.2.3	<i>Composição gasosa</i> .....	28
2.3.2.4	<i>Interações entre microrganismos</i> .....	29
2.3.3	Combinação de fatores intrínsecos ou extrínsecos .....	30
2.3.3.1	<i>Conceito de barreiras ou obstáculos de Leistner</i> .....	30
2.4	FONTES DE CONTAMINAÇÃO DO LEITE .....	31
2.4.1	Infecções intramamárias.....	31
2.4.2	Superfície do teto do animal .....	32
2.4.3	Equipamentos, acessórios e utensílios de ordenha .....	32
2.4.4	Contaminação pelo meio ambiente .....	32
2.4.5	Manipuladores e ordenhadores.....	32
2.4.6	Água.....	32

<b>2.5</b>	<b>DETERIORAÇÃO DO LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS PELA AÇÃO DE MICRORGANISMOS.....</b>	<b>33</b>
2.5.1	Sabores e odores estranhos.....	33
2.5.2	Alterações na cor.....	34
2.5.3	Rancidez.....	34
2.5.4	Alterações na viscosidade.....	34
2.5.5	Produção de gás.....	35
<b>2.6</b>	<b>LEGISLAÇÃO E MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7</b>	<b>MÉTODOS DE CONTAGEM BACTERIANA EM LEITE.....</b>	<b>38</b>
2.7.1	Método de referência para contagem bacteriana do leite.....	38
2.7.2	Análise da qualidade do leite por citometria de fluxo.....	39
<b>2.8</b>	<b>CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU.....</b>	<b>44</b>
2.8.1	Resfriamento.....	44
2.8.2	Conservante bacteriostático.....	45
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
3.1	LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS.....	48
3.2	AMOSTRAS DE LEITE.....	48
3.2.1	Leite <i>in natura</i> .....	48
<b>3.3</b>	<b>FRACIONAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS.....</b>	<b>49</b>
3.3.1	Amostragem e Fracionamento.....	49
3.3.2	Identificação.....	49
3.3.3	Controle de qualidade.....	50
<b>3.4</b>	<b>TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>3.5</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>52</b>
<b>3.6</b>	<b>ANÁLISE DE CPP DAS AMOSTRAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....</b>	<b>54</b>
3.6.1	Expressão dos resultados.....	56
<b>3.7</b>	<b>TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>QUALIDADE DO LEITE <i>IN NATURA</i> UTILIZADO NO EXPERIMENTO..</b>	<b>58</b>
4.1.1	Temperatura do leite no tanque de refrigeração.....	58
4.1.2	Acidez titulável e pH.....	58
4.1.3	Composição centesimal.....	59



4.2 ANÁLISE DA CONTAGEM BACTERIANA DO LEITE.....	68
5 CONCLUSÃO .....	81
REFERÊNCIAS .....	82
APÊNDICE A – Artigo científico .....	91

# 1 INTRODUÇÃO

A preocupação na busca pela qualidade do leite é crescente, visando o aumento do rendimento e da produtividade industrial, bem como o aumento da vida útil de prateleira. Em contrapartida, reduzindo desperdícios, evitando as perdas e devoluções e, desta forma, otimizando os custos de produção.

Um dos requisitos essenciais para uma matéria prima de qualidade é a baixa contagem bacteriana, que não somente representa boas condições de higiene durante a obtenção, armazenamento e coleta do leite, mas principalmente por ser uma premissa para a cadeia produtiva de lácteos, pois assegura a qualidade e a inocuidade do produto, além de sua inserção no mercado internacional.

O pagamento diferenciado do leite baseado nos critérios de qualidade do produto recebido pela agroindústria é um fator positivo para a cadeia produtiva, pois bonifica os produtores que oferecem leite de qualidade superior. Logo, a indústria é beneficiada com uma matéria prima que proporciona maior rendimento no processamento de derivados, e da mesma forma o consumidor terá acesso à um produto final saudável, nutritivo, com maior qualidade, durabilidade e sobretudo seguro para o consumo. Dentre os critérios de bonificação extra do leite, destaca-se à qualidade higiênica, relacionada diretamente com a qualidade microbiológica, considerando passível de pagamento o produto que apresentar contagem bacteriana abaixo do valor aplicado pela agroindústria, sendo este inferior ao limite determinado pela legislação oficial de sua respectiva região.

Conforme previsto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, por meio de Instruções Normativas, a produção de leite destinada ao processamento em estabelecimentos sob fiscalização federal deve ser mensalmente submetida para análise em um dos laboratórios da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite – RBQL.

Os testes empregados para avaliar a qualidade do leite *in natura* compreendem o escopo analítico destes laboratórios, e dentre os parâmetros analisados está a determinação eletrônica da contagem padrão em placas pelo método de citometria de fluxo.

A logística de coleta, envio aos laboratórios oficiais e a análise laboratorial das amostras de leite consiste de várias etapas, o que demanda tempo e requer a utilização de conservantes bacteriostáticos nas amostras, garantindo a integridade temporária das mesmas, pois reduz a atividade metabólica das bactérias, sem que haja alteração da população bacteriana, prolongando a vida útil analítica.

O conservante utilizado é o azidiol, em formato de pastilhas compostas principalmente de azida sódica e cloranfenicol.

É evidente a importância desta amostragem, sendo que por meio dela é possível traçar um perfil da qualidade microbiológica do leite, verificando se há o atendimento aos limites da legislação vigente pelo produtor, definindo o valor a ser pago pelo litro de leite produzido por este no programa de pagamento por qualidade e garantindo a segurança alimentar.

Entre os entraves para a emissão de um resultado confiável estão o tempo entre a coleta da amostra na propriedade rural e o seu recebimento no laboratório para análise, e ainda, a manutenção desta em temperatura de refrigeração ao longo dessa trajetória, uma vez que somente a utilização do conservante bacteriostático não é suficiente para cessar o crescimento bacteriano, ou impedir a deterioração da amostra, considerando que seu potencial de ação é limitado pela idade da mesma.

Desta forma, um desafio para a cadeia produtiva do leite é a preservação dessa amostra até a análise, mantendo-a representativa e possibilitando a obtenção de um resultado seguro, que retrate a qualidade do leite no momento da coleta na propriedade rural.

A idade da amostra é um dos principais percalços relacionados à qualidade da mesma, e em muitos casos, a ação bacteriostática do conservante não é suficiente para impedir a multiplicação bacteriana e conseqüentemente a deterioração desta amostra, e assim questiona-se se diferentes concentrações de azida sódica e cloranfenicol possuem maior eficácia para a conservação de amostras de leite destinadas à análise microbiológica nos laboratórios da RBQL.

O emprego do conservante com concentrações superiores dos referidos componentes, assegurando a amostragem, trará benefícios para a cadeia produtiva e não somente aos laboratórios da RBQL, que terão uma garantia maior de conservação das amostras recebidas além de um tempo superior para análise das mesmas. Mas de igual forma aos produtores, pela manutenção de uma amostragem representativa das condições de produção e também às agroindústrias, atribuindo maior credibilidade às amostras coletadas e conferindo segurança ao programa de pagamento por qualidade, pela preservação da vida útil analítica das amostras, bem como pela otimização da coleta, especialmente na redução de custos com desperdício de materiais resultante dos descartes de amostras ocasionado pela idade da mesma.

Considerando a relevância deste, e no atendimento às necessidades do setor, o presente estudo teve como objetivo a avaliação de um método mais eficaz para a conservação de amostras de leite cru, buscando manter sua integridade e confiabilidade na avaliação de sua qualidade microbiológica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 QUALIDADE DO LEITE CRU

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011), que tem suas características nutritivas e composição original garantidas e preservadas ao longo de todo o processo de produção e beneficiamento. É livre de resíduos (medicamentos, pesticidas e micotoxinas), adulterantes e microrganismos patogênicos de forma a não oferecer riscos ao consumidor (ABLV; EMBRAPA, 2016).

Um importante parâmetro para a verificação da qualidade do leite é o perfil microbiológico do mesmo, determinado pela forma de obtenção, armazenamento e transporte (GUIMARÃES, 2002). Conforme Guerreiro et al. (2005), estas condições estão diretamente relacionadas com a qualidade do produto, inclusive determinando seu prazo de vida útil.

O leite deve ser obtido com máxima higiene, e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até o seu beneficiamento, visando garantir as características físicas, químicas e nutricionais do produto final (GERMANO; GERMANO, 2015).

Os microrganismos presentes no leite cru são provenientes dos canais de leite do úbere, da pele, dos equipamentos e utensílios de ordenha e das tubulações de coleta utilizados durante a produção. Sob boas condições de manuseio e conservação, a biota predominante é Gram-positiva (JAY, 2005).

Essa microbiota inclui *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Flavobacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp. e coliformes (FORSYTHE, 2013).

Jay (2005) descreve que o leite cru mantido sob temperatura de refrigeração por muitos dias pode apresentar bactérias dos seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, além de pelo menos um dos gêneros de coliformes.

Alguns microrganismos podem representar risco à saúde do consumidor, causando doenças infecciosas que podem ser transmitidas ao homem pelo leite (FONSECA; SANTOS, 2000 e GERMANO; GERMANO, 2013).

Sabe-se que o controle da qualidade do leite utilizado como matéria prima é fundamental para garantir a qualidade dos produtos derivados, leites com contagens elevadas de

microrganismos podem comprometer seriamente a qualidade e durabilidade de certos produtos derivados (GERMANO; GERMANO, 2015).

## 2.2 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES DO LEITE

Os microrganismos que normalmente contaminam o leite multiplicam-se em uma faixa de temperatura bastante variada, abrangendo microrganismos psicrotróficos, mesófilos e termófilos (SANTOS; FONSECA, 2001).

### 2.2.1 Microrganismos psicrotróficos

Os microrganismos psicrotróficos têm capacidade de se desenvolver em temperatura de 7°C ou menos, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento. Geralmente essa temperatura ótima está na faixa de 20°C à 30°C. Encontrados no solo, na água, na vegetação e nos animais. A superfície do teto e do úbere podem apresentar altas contagens deste microrganismo, quando deficientemente limpos e sanificados (SALOMÃO, 2012).

A microbiota psicrotrófica contaminante do leite cru inclui espécies Gram-negativo dos gêneros: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium*; ainda bactérias Gram-positivo dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* (PINTO et al., 2006).

Este grupo de bactérias apresenta capacidade de produção de enzimas proteolíticas e também lipolíticas, capazes de degradar a proteína e a gordura do leite respectivamente, causando problemas para a indústria de leite e derivados (SANTOS; FONSECA, 2001).

Devido à baixa temperatura de proliferação, estes podem aumentar a população bacteriana no leite durante seu período de estocagem, sendo que a refrigeração prolongada na propriedade rural ou na indústria, pode comprometer sua qualidade (PINTO et al., 2006).

Conforme Salomão (2012), citando Pereira Júnior (2002), as medidas para prevenção da contaminação e proliferação de psicrotróficos no leite são higiene e manutenção da temperatura de armazenamento adequadas.

Reitera-se ainda a importância da utilização de água de boa qualidade, uma vez que segundo Jay (2005) a contaminação do leite e produtos lácteos por psicrotróficos também pode originar-se do suprimento de água de qualidade inferior.

### 2.2.2 Microrganismos mesófilos

Os microrganismos mesófilos têm temperatura ótima de multiplicação entre 25°C e 40°C, mínima entre 5°C e 25°C e máxima entre 40°C e 50°C. Multiplicam-se rapidamente no leite não refrigerado, causando sua deterioração (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Este grupo compreende a maioria das bactérias lácticas acidificantes, que a partir da fermentação da lactose são os responsáveis pela acidificação do leite, quando este não é armazenado corretamente em refrigeração (JAY, 2005).

As bactérias ácido-lácticas produzem vários fatores antimicrobianos, tais como ácido láctico, acético e propiônico (FORSYTHE, 2013).

Assim, a refrigeração do leite mantém estes microrganismos estáveis, mas não os reduz. Neste caso, se o leite recém ordenhado apresentar contagem elevada de microrganismos mesófilos, após 48 horas de armazenamento, apresentará uma elevada contagem microbiana (CERQUEIRA, 2006).

De acordo com Forsythe (2013), as bactérias ácido-lácticas são Gram-positivo, microaerófilas, não esporuladas e nutricionalmente exigentes: necessitam de aminoácidos, vitaminas e nucleotídeos. Pertencem ao gênero *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. São encontradas nas plantas, intestino, pele e mucosas do homem e de animais, podendo contaminar o leite durante a ordenha.

Compreendem este grupo também os coliformes, sendo que os representantes mais comuns são os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. A presença dessas bactérias no leite e em equipamentos de ordenha denota contaminação externa, indicativa de falta de higiene; resultando na diminuição da qualidade e redução do tempo de vida de prateleira do leite e derivados, devido à acidificação e atividade proteolítica e lipolítica; além de apresentar microrganismos patogênicos, como espécies do gênero *Escherichia*, de acordo com Marshall (1992).

### 2.2.3 Microrganismos termófilos e termodúricos

Os microrganismos termófilos e termodúricos possuem temperatura ótima de multiplicação entre 45°C e 65°C, mínima entre 35°C e 45°C e máxima entre 60°C e 90°C (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A pasteurização lenta favorece esse grupo de microrganismos, pois o leite é mantido na temperatura de 65°C por 30 minutos, ocorrendo rápida multiplicação dos termófilos. São

indicativos de falta de higiene na ordenha, nos equipamentos e utensílios de ordenha, no processamento do leite ou nos equipamentos industriais, podendo ser introduzidos na propriedade leiteira ou na indústria de beneficiamento, de acordo com Salomão (2012) referenciando Lange, Brito (2003).

Jay (2005), afirma que bactérias termodúricas são resistentes a pasteurização por suportar temperaturas elevadas e formarem esporos. As bactérias formadoras de esporos pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. As bactérias não formadoras de esporos possuem representantes nos gêneros *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, algumas espécies de *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium*.

Encontrados no solo, em silagem e no esterco (HORST et al., 2005).

São associadas principalmente por falhas nos processos de limpeza dos equipamentos de ordenha. Devido ao fato de sobreviverem à pasteurização, este grupo causa redução da vida de prateleira do leite e dos produtos lácteos (JAY, 2005).

## **2.3 FATORES INTRÍNSECOS E EXTRÍNSECOS PARA MULTIPLICAÇÃO DE MICRORGANISMOS**

A maioria dos alimentos contém nutrientes suficientes para sustentar a multiplicação microbiana. Muitos fatores podem propiciar, prevenir ou limitar a multiplicação de microrganismos em alimentos (FORSYTHE, 2013).

Conforme Franco, Landgraf (2008), a capacidade de sobrevivência ou de multiplicação dos microrganismos que estão presentes em um alimento depende de uma série de fatores. Dentre estes fatores, estão aqueles relacionados com as características próprias do alimento, que são os fatores intrínsecos e os relacionados com o ambiente em que o alimento se encontra, que são os fatores extrínsecos.

### **2.3.1 Fatores intrínsecos**

Particularidades dos tecidos animais ou vegetais que são parte inerente desses tecidos são denominados fatores intrínsecos (JAY, 2005), que podem afetar a qualidade do leite.

### 2.3.1.1 Atividade de água

Os microrganismos precisam ter água à disposição para sobreviver, para seu metabolismo e sua multiplicação. O parâmetro que avalia a disponibilidade de água em um alimento chama-se atividade de água (Aa), que é definida como a relação existente entre a pressão parcial de vapor da água contida na solução ou no alimento e a pressão parcial de vapor da água pura, a uma dada temperatura (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

De acordo em Germano, Germano (2015), o valor de atividade de água está em torno de 1,00 sendo que para o leite, o valor de Aa está ente 0,98 – 0,99; e também conforme Forsythe (2013), o leite possui atividade de água entre 0,95 – 1,00; sendo um alimento altamente perecível.

Os microrganismos apresentam valor mínimo, máximo e ótimo de Aa para sua multiplicação. Sabe-se que o limite máximo para o crescimento microbiano é um pouco menor que 1,00 (BRINQUES, 2015).

O comportamento dos microrganismos em relação à Aa mínima e ótima é bastante variável (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Em geral, as bactérias necessitam de maiores valores de Aa para crescimento, com as Gram-negativas necessitando de maiores valores que as Gram-positivas. A maior parte das bactérias deteriorantes de alimentos não cresce com Aa menor que 0,91 (JAY, 2005).

Em relação ao grau de atividade aquosa, os microrganismos podem ser divididos em hidrófitos, mesófitos e xerófitos (GERMANO; GERMANO, 2015).

Estão apresentados na Tabela 1 a classificação dos microrganismos segundo grau de atividade aquosa.

Tabela 1 - Classificação dos microrganismos segundo grau de atividade aquosa

Microrganismos	Umidade
Hidrófitos	Mínimo de 90%
Mesófitos	Mínimo de 80 a 90%
Xerófitos	Menos de 80%

Fonte: GERMANO; GERMANO (2015).

De acordo com Brinques (2015), as bactérias que causam toxinfecções alimentares toleram a Aa de até 0,86 para sua multiplicação. Sabe-se que o valor de 0,60 é o valor de Aa limitante para a multiplicação de qualquer microrganismo.



Atividade de água, temperatura e disponibilidade de nutrientes são interdependentes. Assim, a qualquer temperatura, a capacidade de microrganismos multiplicarem-se diminui quando a Aa baixa. Quanto mais próxima da temperatura ótima de multiplicação, mais larga é a faixa de Aa em que o crescimento bacteriano é possível. A presença de nutrientes também é importante, pois amplia a faixa de Aa em que os microrganismos podem multiplicar-se (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Do mesmo modo, deve-se considerar também as relações entre a Aa, temperatura e pH (GERMANO; GERMANO, 2015).

Descrito por Franco, Landgraf (2008), a Aa limitante para o crescimento de determinado microrganismo depende ainda de outros fatores intrínsecos, que podem agir simultaneamente, como o pH do meio, o potencial de oxirredução e a presença de substâncias antimicrobianas naturais ou intencionalmente adicionadas.

Quando a Aa for mínima, a multiplicação da população bacteriana será mínima; a multiplicação aumentará sempre que aumentar a Aa. Em valores de Aa mais baixos que o mínimo, as bactérias não necessariamente morrerão, estas podem permanecer inativas, mas infecciosas (FORSYTHE, 2013).

### *2.3.1.2 Potencial hidrogeniônico*

A acidez ou a alcalinidade de um meio tem grande influência na estabilidade de macromoléculas, tais como as enzimas, o que influi tanto no crescimento como no metabolismo dos microrganismos (GERMANO; GERMANO, 2015).

Conforme Jay (2005), a maioria dos microrganismos cresce melhor com valores de potencial hidrogeniônico (pH) em torno de 7,0 (6,6-7,5), apesar de alguns poucos crescerem em pH abaixo de 4,0.

Alguns microrganismos são favorecidos pelo meio ácido, como ocorre com as bactérias lácticas, certamente pela inibição da microbiota de competição. Entre as bactérias, verifica-se que as patogênicas são as mais exigentes quanto ao pH (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Em geral, as bactérias multiplicam-se com maior rapidez na escala de pH compreendida entre 6,0 e 8,0 (GERMANO; GERMANO, 2015).

Assim como a Aa, o valor de pH é afetado por outros fatores que agem simultaneamente (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Segundo Brinques (2015), conforme o pH, os alimentos são classificados em três grupos: os de baixa acidez (pH 4,5), os alimentos ácidos (pH entre 4,0 e 4,5) e os alimentos

muito ácidos (pH menor que 4,0). Alimentos de baixa acidez são preferidos pelos microrganismos patogênicos e deteriorantes. Nos alimentos ácidos, ocorre crescimento de levedura, bolores e algumas bactérias. Em alimentos muito ácidos, ocorre o crescimento apenas de bolores e leveduras.

De acordo com Germano, Germano (2015), o leite é classificado como alimento pouco ácido, uma vez que tem seu valor de pH  $> 4,5$  (entre 6,3 e 6,5).

Quando os microrganismos se encontram com pH diferente do neutro, sua capacidade de multiplicação é dependente de sua capacidade de modificar o pH adverso (BRINQUES, 2015).

### *2.3.1.3 Potencial de oxirredução*

O potencial de oxirredução pode ser definido como a facilidade em que o substrato pode ganhar (redução) ou perder (oxidação) elétrons. A alteração do valor entre os agentes oxidantes e redutores determina o Eh de uma cultura bacteriana. Quando um elemento ou composto perde elétrons, o substrato é dito como oxidado, enquanto que um substrato que ganha elétrons torna-se reduzido (GERMANO; GERMANO, 2015).

Quanto mais oxidado é um composto, mais positivo é seu potencial de oxirredução, e quanto mais reduzido é um composto, mais negativo é esse potencial (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Para potencial alto (oxidante), microrganismos aeróbios facultativos; e para potencial baixo (reductor), anaeróbios facultativos (GERMANO; GERMANO, 2015).

Conforme Jay (2005), quando os elétrons são transferidos de um composto para o outro, uma diferença de potencial é criada entre ambos. Tal diferença pode ser medida com o uso de um instrumento apropriado e expressa em milivolts (mV).

Microrganismos aeróbios requerem valores de Eh positivos para a multiplicação, há espécies de bactérias patogênicas que também são aeróbias. Esses microrganismos necessitam de Eh entre + 350 mV e + 500 mV. Microrganismos anaeróbios precisam de valores baixos de Eh (- 150 mV). Neste grupo estão incluídas espécies de bactérias patogênicas e bactérias deteriorantes (BRINQUES, 2015).

Algumas bactérias aeróbias multiplicam-se melhor em condições ligeiramente reduzidas e, por isso são denominadas bactérias microaerófilas. Por outro lado, algumas bactérias multiplicam-se igualmente bem tanto em condições de aerobiose quanto de

anaerobiose, razão pela qual são denominadas anaeróbias facultativas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Segundo Jay (2005), o potencial de oxirredução de um alimento é determinado pelos seguintes parâmetros:

- As características de oxirredução do alimento original;
- A capacidade de balanceamento, isto é, a resistência do alimento em modificar o seu Eh;
- A tensão de oxigênio da atmosfera em contato com o alimento;
- O acesso que a atmosfera tem ao alimento.

O Eh de um alimento é resultado dos pares de oxirredução presentes, da proporção do oxidante em relação ao redutor, pH, capacidade de equilíbrio, disponibilidade de oxigênio, e atividade microbiana. O crescimento microbiano em um alimento reduz o Eh, sendo este efeito atribuído à associação do esgotamento de oxigênio com a produção de compostos redutores pelos microrganismos, por exemplo hidrogênio (GERMANO; GERMANO, 2015).

#### *2.3.1.4 Composição química do leite*

Segundo Franco, Landgraf (2008), para que a multiplicação microbiana seja possível, os seguintes nutrientes devem estar disponíveis: água, fonte de energia, fonte de nitrogênio, vitaminas e sais minerais. Como fontes de energia, o microrganismo pode utilizar açúcares, álcoois e aminoácidos. Alguns microrganismos são capazes de utilizar açúcares complexos, como amido e celulose. Lipídios também podem servir como fontes de energia.

Os aminoácidos constituem na principal fonte de nitrogênio utilizada por organismos heterotróficos, porém uma grande variedade de outros compostos nitrogenados pode ser utilizada (JAY, 2005).

As vitaminas representam fatores de crescimento microbiano importantes, pois fazem parte de diversas coenzimas envolvidas em várias reações metabólicas. As vitaminas consideradas importantes são as do complexo B, a biotina e o ácido pantotênico (BRINQUES, 2015).

Praticamente todos os alimentos naturais tendem a possuir uma quantidade abundante dessa vitamina para os microrganismos incapazes de sintetizá-la (JAY, 2005).

Entre os microrganismos, verifica-se que as bactérias Gram-positivas são mais exigentes em suas necessidades de vitaminas que as bactérias Gram-negativas, que são capazes de sintetizar todos os seus fatores de crescimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os minerais são requeridos em quantidades pequenas e são indispensáveis para a multiplicação microbiana, pois estão envolvidos nas reações enzimáticas. Podemos citar o sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, cobre, manganês, molibdênio, zinco, cobalto, fosforo e o enxofre (BRINQUES, 2015).

#### *2.3.1.5 Substâncias antimicrobianas naturais*

A estabilidade de alguns alimentos frente ao possível ataque por microrganismos deve-se à presença de substâncias naturais que apresentam atividade antimicrobiana (GERMANO; GERMANO, 2015).

No leite de vaca também há várias substâncias antimicrobianas naturais que agem específica ou inespecificamente. Os compostos de ação específica são as imunoglobulinas, o fator complemento, os macrófagos e os linfócitos; já para os fatores inespecíficos, o mais importante é o sistema lactoperoxidase, que age por meio da quebra de peróxidos do leite, liberando oxigênio que promove a oxidação. A lactoperoxidase é bactericida para bactérias Gram-negativas e bacteriostática para as Gram-positivas (BRINQUES, 2015).

Jay (2005), assegura que todos os componentes do sistema lactoperoxidase são necessários para o efeito antimicrobiano, sendo bactérias psicrotólicas Gram-negativas especialmente sensíveis. Quando o sistema lactoperoxidase do leite cru é adicionado pela adição de tiocianato e peróxido, a vida de prateleira do leite aumenta para cinco dias, sendo que o sistema é mais eficiente a 30°C do que à 4°C. O efeito antibacteriano aumenta com a acidez, e o alvo celular parece ser a membrana citoplasmática. O sistema lactoperoxidase pode ser utilizado para a conservação de leite cru em países onde a refrigeração não é comum.

A caseína do leite e alguns ácidos graxos livres também tem desempenhado ação antimicrobiana sob determinadas condições (GERMANO; GERMANO, 2015).

A lactoferrina do leite é outro composto com atividade antimicrobiana. Trata-se de uma proteína que inibe a multiplicação pela retirada de íons de ferro do leite. Outras substâncias como a lisozima, e a nisina, produzidas por bactéria lácticas, são importantes para controlar o crescimento microbiano (BRINQUES, 2015).

#### **2.3.2 Fatores Extrínsecos**

São aquelas propriedades do meio de armazenamento que afetam os alimentos e os microrganismos (JAY, 2005).

### 2.3.2.1 Temperatura

Segundo Germano, Germano (2015), dentre os fatores extrínsecos que favorecem a multiplicação ou crescimento de microrganismos, a temperatura ocupa lugar de destaque.

Os microrganismos desenvolvem-se em uma faixa ampla de temperatura, havendo registros de multiplicação a um mínimo de  $-35^{\circ}\text{C}$  e um máximo de  $90^{\circ}\text{C}$  (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

De acordo com suas exigências de temperatura, os microrganismos são classificados como: psicrófilos, psicrotróficos, mesófilos e termófilos (GERMANO; GERMANO, 2015).

A Tabela 2 exibe a divisão dos microrganismos segundo as faixas de temperatura de desenvolvimento.

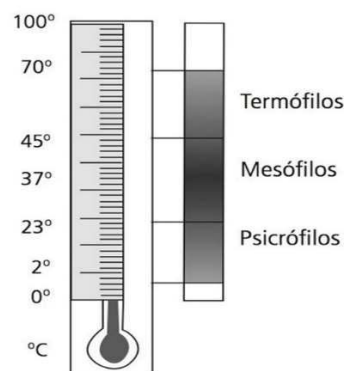
Tabela 2 - Divisão dos microrganismos segundo as faixas de temperatura de desenvolvimento

Grupo	Temperatura		
	Mínima	Ótima	Máxima
Psicrófilos	-5 a 5	12 a 15	15 a 20
Psicrotróficos	-5 a 5	25 a 30	30 a 35
Mesófilos	5 a 15	30 a 45	35 a 47
Termófilos	40 a 45	55 a 75	60 a 90

Fonte: GERMANO; GERMANO (2015).

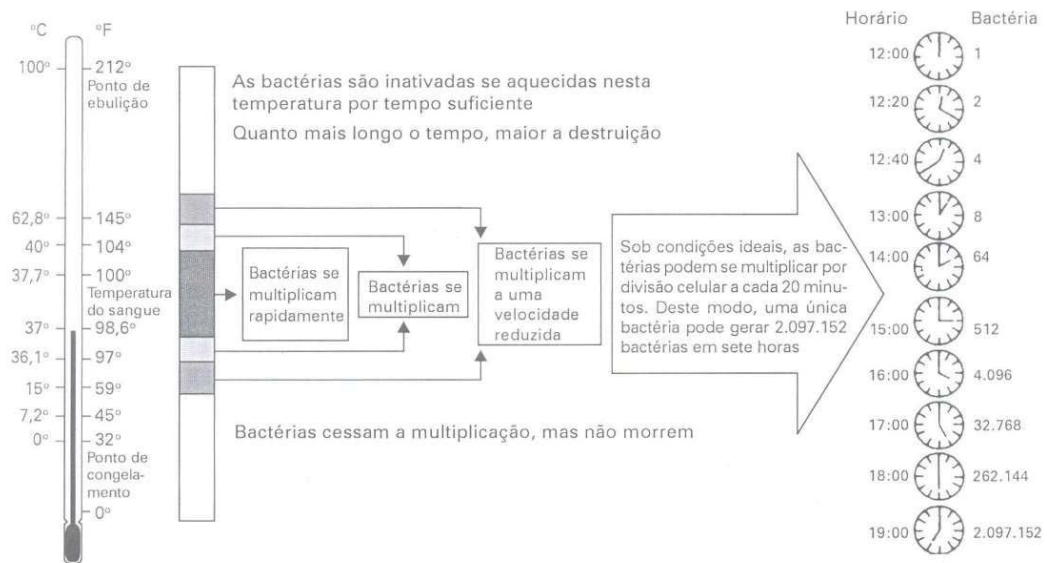
Nas figuras dispostas abaixo, podem ser observadas as faixas de temperatura de desenvolvimento de microrganismos (Figura 1) e ainda o efeito da temperatura e do tempo sobre o crescimento de bactérias (Figura 2).

Figura 1 - Faixas de temperatura de desenvolvimento de microrganismos



Fonte: GERMANO; GERMANO (2015).

Figura 2 - Efeito da temperatura e do tempo sobre o crescimento de bactérias



Fonte: JAY (2005).

### 2.3.2.2 Umidade relativa

A umidade relativa do meio de armazenamento é importante sob o ponto de vista da atividade de água no interior dos alimentos como do crescimento de microrganismos sobre sua superfície (JAY, 2005).

Existe correlação entre atividade de água (Aa) de um alimento e a umidade relativa de equilíbrio do ambiente (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Quando alimentos com baixa atividade de água são armazenados em locais com alta umidade, eles absorvem água até entrar em equilíbrio com o meio, e do mesmo modo, alimentos com alta atividade de água perdem umidade quando armazenados em ambiente com baixa umidade (JAY, 2005).

### 2.3.2.3 Composição gasosa

A composição gasosa determina os tipos de microrganismos que estarão no ambiente. A presença de oxigênio facilita a multiplicação de microrganismos aeróbios, em contraponto, na sua ausência haverá predominância dos anaeróbios (BRINQUES, 2015).

Modificações na composição gasosa são capazes de causar alterações na microbiota que sobrevive ou se multiplica em determinado alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Descrito por Germano, Germano (2015) a maior parte dos microrganismos eucarióticos são aeróbios, mas as bactérias apresentam variação em sua exigência de oxigênio.

A classificação dos microrganismos segundo sua aptidão em captar oxigênio para o desenvolvimento está registrada na Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação dos microrganismos conforme captação de oxigênio

Microrganismos	Necessidades
Aeróbios	Necessitam oxigênio livre
Anaeróbios	Não necessitam oxigênio livre
Facultativos	Necessitam ou não do oxigênio livre
Microaerófilos	Crescem melhor com teor de O <sub>2</sub> , porém em quantidade determinada

Fonte: GERMANO; GERMANO (2015).

São empregados como recursos tecnológicos as atmosferas modificadas, onde o oxigênio é substituído total ou parcialmente por outros gases, para aumentar a vida útil dos alimentos (BRINQUES, 2015).

#### 2.3.2.4 Interações entre microrganismos

Conforme relatos de Brinques (2015), os microrganismos ao se multiplicarem no alimento sintetizam metabólitos que afetam a capacidade de sobrevivência e de multiplicação de outros microrganismos presentes nesse alimento. Como exemplo podemos citar as bactérias lácticas, que modificam o pH, tornando-o ácido demais para o crescimento de outros microrganismos.

Este fenômeno se refere à inibição ou destruição de um microrganismo por outros do mesmo habitat ou meio (JAY, 2005).

Os produtos obtidos do metabolismo de certas bactérias são importantes para a proliferação de outras (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Como mecanismo geral da interação bacteriana acredita-se que: a biota natural deve ser maior em termos de células viáveis que o microrganismo a ser inibido; a biota interferente normalmente não é homogênea, porém; os papéis específicos de cada espécie não estão esclarecidos. Dentre as explicações para a mesma deve-se considerar: a competição por nutrientes, a competição por sítios de adesão, alteração desfavorável do ambiente, e ainda a combinação das anteriores (JAY, 2005).

Alguns microrganismos são capazes de produzir substâncias com atividade bactericida, que recebem o nome de bacteriocinas. Bactérias Gram-positivas patogênicos ou não, são também produtoras de bacteriocinas (BRINQUES, 2015).

A indústria de alimentos tem particular interesse nas bactérias lácticas, que são produtoras de diferentes bacteriocinas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A nisina é uma bacteriocina sintetizada por *Lactobacillus lactis* spp. *lactis*, sendo a única cujo uso em alimentos é autorizado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA), sendo efetiva para impedir o desenvolvimento de Gram-positivos, bem como a germinação de seus esporos, porém não é ativa contra Gram-negativos (BRINQUES, 2015).

Citado por Franco, Landgraf (2008), as bacteriocinas e as suas bactérias produtoras tem sido empregadas na produção de certos alimentos, com o objetivo de controlar o desenvolvimento de certos microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes, onde seu emprego é promissor.

### **2.3.3 Combinação de fatores intrínsecos ou extrínsecos**

O conhecimento dos fatores intrínsecos e extrínsecos que agem sobre um alimento, permite prever sua vida de prateleira, sua estabilidade microbiológica, e ainda conhecer a capacidade de crescimento e/ou a produção de toxinas por microrganismos patogênicos presentes. As interações ente os fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam a capacidade de sobrevivência e de multiplicação dos microrganismos é denominado de conceito das barreiras, ou conceito de *Leistner* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Conforme Jay (2005), alimentos que adotam este conceito, empregam diversos fatores para evitar a germinação e crescimento de esporos, uma vez que para crescer os microrganismos necessitam transpor uma série de barreiras.

#### *2.3.3.1 Conceito de barreiras ou obstáculos de Leistner*

As interações entre os vários fatores intrínsecos e extrínsecos que afetam a capacidade de sobrevivência e multiplicação dos microrganismos nos alimentos deu origem ao conceito de barreira, ou obstáculos de *Leistner* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Combina parâmetros físicos e químicos na conservação de alimentos, de acordo com Forsythe (2013).



Cada um dos fatores contribui com parcela igual ou diferente no retardamento do crescimento microbiano até o bloqueio do mesmo. O objetivo é a obtenção de produtos alimentícios estáveis, de prolongada vida de prateleira e seguros à saúde dos consumidores (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

## **2.4 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DO LEITE**

Conforme Brinques (2015) citando Fernandes (2009), os microrganismos responsáveis pela contaminação do leite são provenientes de diversas fontes: o interior e a superfície do úbere, a superfície do teto, os equipamentos de ordenha e de armazenamento do leite, além do profissional responsável pela atividade de ordenha.

A contaminação do leite pode ocorrer durante a ordenha, manipulação, armazenamento e refrigeração do leite, durante o transporte ou beneficiamento conforme Franco, Landgraf (2008).

As medidas de higiene tomadas durante e após a ordenha determinam o nível de contaminação do leite (BRINQUES, 2015).

Após a ordenha e durante o armazenamento e o transporte do leite, a microbiota deste sofre alterações favorecendo o aumento da população de psicotróficos (CASTRO, 2007).

### **2.4.1 Infecções intramamárias**

Castro (2007) de acordo com Bramley, McKinnon (1990), ressalta que com relação às mastites, estas também podem 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.

São consideradas comuns contagens de até 1.000 UFC/mL, em infecções subclínicas encontram-se contagens de até 10.000 UFC/mL e em estágios clínicos podem atingir 1.000.000 UFC/mL para agentes como *Staphylococcus aureus* e 100.000.000 UFC/mL em infecções por *Streptococcus uberis* ou *Escherichia coli* (HORST, 2006).

#### **2.4.2 Superfície do teto do animal**

Variam conforme as condições de alojamento das vacas, podendo apresentar grande quantidade de bactérias. Tetos visualmente limpos podem gerar contaminação bacteriana (HORST, 2006).

#### **2.4.3 Equipamentos, acessórios e utensílios de ordenha**

Constituem foco importante na contaminação do leite, e caso os instrumentos e acessórios não estiverem limpos e não tenham sido higienizados com produtos que possuam agentes bactericidas, os resíduos de leite constituem em meio favorável para a proliferação dos microrganismos. Em alguns casos, a alta contagem de microrganismos do leite denuncia a utilização de utensílios e acessórios deficientemente limpos (HORST, 2006).

Equipamentos de ordenha que não permitam a adequada limpeza, ou que apresentam fissuras nas unidades de borracha por desgaste, também são importantes fontes de contaminação devendo ser substituídos (BRINQUES, 2015).

#### **2.4.4 Contaminação pelo meio ambiente**

Devido ao acúmulo de sujeira, ambientes sem higiene adequada propiciam um aumento da população microbiana (HORST, 2006).

#### **2.4.5 Manipuladores e ordenhadores**

Pessoas designadas para a ordenha e manipulação do leite podem ser uma fonte de contaminação (HORST, 2006).

#### **2.4.6 Água**

A água utilizada, tanto para a limpeza dos tetos, como para a limpeza do sistema de ordenha, deve ser de boa qualidade e sem a presença de contaminantes. A presença de bactérias na água pode comprometer a qualidade do leite (HORST, 2006).

A água deve ser analisada frequentemente, e deve ser isenta de contaminantes como coliformes (BRINQUES, 2015).

## 2.5 DETERIORAÇÃO DO LEITE E DERIVADOS LÁCTEOS PELA AÇÃO DE MICRORGANISMOS

O leite é um meio ideal para multiplicação de bactérias, devido às suas características intrínsecas, como alta atividade de água, pH próximo do neutro e riqueza em nutrientes. (FRANCO; LANDGRAF, 2008 e FORSYTHE, 2013).

Dentre os microrganismos patogênicos e deteriorantes encontrados no leite predominam entre o grupo das bactérias psicrotólicas as *Pseudomonas* (SAMPAIO et al., 2015) que possuem relevância na deterioração do produto (VITHANAGE et al., 2016). A *Escherichia coli* é um indicador de contaminação de origem fecal, e por ser um patógeno ambiental, pode ser encontrada nos dejetos dos animais, no solo e água contaminados, bem como no úbere e tetos, enquanto que o *Staphylococcus* é o principal gênero causador das infecções intramamárias dos bovinos (ARAÚJO, 2015 e LOPES JÚNIOR et al., 2012). *Proteus* são microrganismos proteolíticos encontrados no leite mantido em temperatura de refrigeração por tempo prolongado (MENEZES et al., 2014).

Em função do número e tipo dos microrganismos, alterações indesejáveis são produzidas na aparência, sabor ou odor do leite e também dos seus derivados. Altas contagens microbianas antes da pasteurização são indesejáveis, já que a ação das enzimas produzidas pelas bactérias durante a estocagem resultam na deterioração, e conseqüentemente na redução da vida de prateleira do leite (FONSECA; SANTOS, 2000).

A degradação por microrganismos reduz o valor do leite para industrialização e altera as características dos produtos finais. A importância das bactérias varia conforme o gênero, a espécie, a ação sobre os componentes, a capacidade de permanecer viável, multiplicar e comprometer à qualidade do leite e a saúde do consumidor (HORST et al., 2005).

Gigante (2004), destaca que os principais problemas à indústria acerca da alta carga microbiana são os prejuízos com acidificação e coagulação, produção de gás, geleificação, sabor amargo, coagulação sem acidificação, aumento da viscosidade, alteração de cor, produção de sabores e odores variados, entre outros; não apenas resultando na diminuição do tempo de vida de prateleira, bem como na redução considerável do rendimento industrial.

### 2.5.1 Sabores e odores estranhos

O aparecimento de sabores e de odores estranhos no leite e derivados é decorrente da multiplicação de microrganismos que resistiram ao processo de pasteurização ou de

microrganismos que contaminaram o produto depois do processamento térmico (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As enzimas proteolíticas produzidas pelas *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia* e *Bacillus* spp. geram sabor amargo no leite e em seus derivados, enquanto que as enzimas lipolíticas produzidas pelas *Pseudomonas*, *Flavobactérias* e *Alcaligenes* spp. predisõem a ocorrência de sabor e aroma rançoso desagradável. (FORSYTHE, 2013 e GERMANO; GERMANO, 2015).

Sabor e odor ácidos são devido às reações de fermentação de açúcares, o aroma de caramelo ou queimado pode ser provocado por cepas de *Lactobacillus lactis* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### **2.5.2 Alterações na cor**

Alterações de cor podem ser devido a outras reações químicas ocorridas anteriormente ao processamento ou ao crescimento de microrganismos produtores de crescimento; dentre as cores que podem aparecer no leite, podem ser citadas: a cor azul – *Pseudomonas syncyanea*; amarela – além da *Pseudomonas syncyanea*, também *Flavobacterium* produz este pigmento; e vermelha – *Serratia marcescens* e *Micrococcus roseus* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### **2.5.3 Rancidez**

As bactérias, através de suas enzimas lipolíticas, atuam sobre as gorduras hidrolisando-as e/ou oxidando-as. Produtos dessas reações são cetonas, aldeídos e ácidos no caso da oxidação e ácidos graxos e glicerol no caso da hidrólise. Os principais gêneros causadores são: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Proteus*, *Clostridium* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### **2.5.4 Alterações na viscosidade**

Por Franco, Landgraf (2008), este tipo de alteração ocorre em leite, creme ou soro de leite. O aumento da viscosidade pode se dar pelo crescimento de *Alcaligenes viscolatis*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella oxytoca*, *Lactococcus lactis*, e *Lactobacillus* spp.

### 2.5.5 Produção de gás

Efeito normalmente acompanhado pela acidificação do leite e derivados. As principais bactérias produtoras de gás são os coliformes, no leite cru enquanto que no leite pasteurizado são *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

## 2.6 LEGISLAÇÃO E MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO LEITE

O foco em geral sobre a qualidade do leite não se dá unicamente pela abertura comercial de mercados, mas deve sempre estar direcionado à garantia da qualidade do produto fornecido ao consumidor.

A legislação brasileira é a menos rigorosa quanto aos padrões higiênicos sanitários de leite cru bovino em relação às legislações dos principais países produtores e exportadores de lácteos.

Os Estados Unidos da América adotam padrões recomendados pelo *United States Public Health Service*, de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL para CBT, enquanto que o limite legal no Canadá e na Nova Zelândia para o mesmo parâmetro é de  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL. Em países membros da União Europeia e Austrália, o limite é de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL. Os limites rígidos adotados por estes países são reflexos dos seus programas de pagamento por qualidade, que estão em processo gradativo de implantação desde 1970, posicionando estes países entre os principais exportadores de lácteos (BULLETIN, 2006).

A Dinamarca, enquadra os valores de CBT conforme as classes: menor que  $3,0 \times 10^4$  UFC/mL, menor que  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL, menor que  $2,0 \times 10^5$  UFC/mL e maior que  $2,0 \times 10^5$  UFC/mL. Na Alemanha, o padrão de CBT é constituído por duas classes, sendo menor ou igual que  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL e maior que  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL; enquanto que a França, a exemplo da Dinamarca também apresenta classes distintas para o parâmetro de CBT, sendo: menor que  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL, entre  $5,0 \times 10^4$  UFC/mL e  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL e maior que  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL. No Reino Unido, o limite de rejeição do leite para CBT é de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, enquanto que no Japão a meta para contagem bacteriana deve ser inferior à  $5,0 \times 10^4$  (BULLETIN, 2006; CARDOSO, 2012 e VARGAS, 2014).

No Brasil, em 1952 foi publicado o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, que estabeleceu parâmetros de qualidade para produtos de origem animal, normas e regulamento para a matéria prima leite e regulamentos técnicos para os produtos derivados lácteos (BRASIL, 1980).

Conforme Leite (2006) citando Oliveira et al. (2000), em 1996 foi criado o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite – PNMQL, este teve início a partir de resultados encontrados em diversos estudos que comprovaram as perdas econômicas significativas pelas quais passava a cadeia produtiva do leite em decorrência da elevada acidez, alto índice de mastite nos rebanhos, perdas no transporte e no beneficiamento do leite, além da rápida deterioração dos produtos acabados devido à baixa qualidade da matéria prima.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, por meio da Instrução Normativa IN Nº 37, de abril de 2002 instituiu a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite – RBQL, com objetivo de realizar análises laboratoriais para a fiscalização de amostras de leite cru, coletadas em propriedades rurais e em estabelecimentos de laticínios (BRASIL, 2002a).

Dentre as análises realizadas pela RBQL em matriz leite cru está a determinação eletrônica da contagem padrão em placas – CPP, que representa a contagem bacteriana.

Em setembro de 2002 foi publicada a IN Nº 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA; que passou a vigorar a partir de julho de 2005, determinando que as agroindústrias de laticínios sob Inspeção Federal devem encaminhar amostras mensais de cada uma das propriedades rurais que lhes fornece leite para um dos laboratórios da RBQL (BRASIL, 2002b).

A RBQL é composta por laboratórios distribuídos em território nacional ligados às seguintes entidades: Universidade Federal Rural de Pernambuco (PE), Universidade Federal de Minas Gerais (MG), Embrapa Gado de Leite (MG), Universidade Federal de Goiás (GO), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo (SP), Associação Paranaense de Bovinos da Raça Holandesa/Universidade Federal do Paraná (PR), Universidade do Contestado (SC), Universidade de Passo Fundo (RS), Fundação Vale do Taquari de Educação e Desenvolvimento Social (RS) e Embrapa Clima Temperado (RS) (CBQL, 2016). Dois laboratórios ingressaram recentemente na Rede, sendo um deles junto à Embrapa Rondônia (RO) e outro na Universidade Federal do Pará (PA), totalizando assim 12 laboratórios prestadores de serviço.

Completa a RBQL ainda um laboratório referência, localizado em Minas Gerais no Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/MAPA.

A IN Nº 51 preconiza limites legais de análise estipulando diferentes prazos para as diversas regiões do país. Os valores máximos fixados nas Regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste pela IN Nº 51 para contagem bacteriana iniciaram em  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL em julho de 2005, passando para  $7,5 \times 10^5$  UFC/mL a partir de julho de 2008 e por fim  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL para

leite individual e  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL para leite de conjunto a partir de julho de 2011 (CASSOLI, 2005).

A IN N° 62 publicada em dezembro de 2011 passou a vigorar estabelecendo mudanças nos prazos e nos valores máximos de contagem bacteriana e de contagem de células somáticas proposto pela IN N° 51. De acordo com a IN N° 62, os valores máximos para as mesmas regiões já citadas, para contagem bacteriana a partir de janeiro de 2012 foi de  $6,0 \times 10^5$  UFC/mL, a partir de julho de 2014 reduzidos para  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL, até julho de 2016 buscando atingir o valor de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL (BRASIL, 2011).

No entanto, devido ao não cumprimento dos valores propostos pela IN N° 62 no referido prazo, foi publicada em maio de 2016 a IN N° 7, que altera o Anexo II da IN N° 62; prorrogando o prazo para o atendimento dos limites máximos de contagem de células somáticas e contagem padrão em placas, que reporta a contagem bacteriana no leite (BRASIL, 2016).

No Quadro 1 estão dispostos os requisitos microbiológicos a serem avaliados pela RBQL de acordo com a IN N° 7 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Quadro 1 - Requisitos microbiológicos a serem avaliados pela RBQL de acordo com a Instrução Normativa N° 7 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Índice medido  (Por propriedade rural ou por tanque comunitário)	A partir de 01/07/2008 até 31/12/2011 Regiões: S/SE/CO	A partir de 01/01/2012 até 30/06/2014 Regiões: S/SE/CO	A partir de 01/07/2014 até 30/06/2018 Regiões: S/SE/CO	A partir de 01/07/2018 Regiões: S/SE/CO
	A partir de 01/07/2010 até 31/12/2012 Regiões: N/NE	A partir de 01/01/2013 até 30/06/2015 Regiões: N/NE	A partir de 01/07/2015 até 30/06/2019 Regiões: N/NE	A partir de 01/07/2019 Regiões: N/NE
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL  (Mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses)	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $3,0 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$

Fonte: Adaptado de BRASIL (2016).

Conforme a IN N° 7, o limite máximo para CPP a partir de julho de 2018 para as regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste será de  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL (BRASIL, 2016).

## 2.7 MÉTODOS DE CONTAGEM BACTERIANA EM LEITE

Castro (2007) afirma que a contagem bacteriana pode ser usada como ferramenta no monitoramento da qualidade microbiológica do leite cru, possibilitando o direcionamento do mesmo para diferentes processamentos.

A metodologia de referência para a enumeração de microrganismos é o método de contagem padrão em placas (CPP), porém outro método comumente utilizado para análise microbiológica em leite cru é o método de citometria de fluxo (SUHREN et al., 1992).

Fatores como a microbiota predominante no leite, bem como o tipo de agregação bacteriana afetam o resultado obtido por diferentes técnicas. Ambos métodos detectam as espécies bacterianas em graus diferentes, e baseiam-se em princípios distintos, como a contagem bacteriana individual (CBI), pela citometria de fluxo ou unidade formadora de colônia (UFC), pela contagem padrão em placas (SUHREN; WALTE, 2000).

### 2.7.1 Método de referência para contagem bacteriana do leite

A contagem padrão em placas de leite é o método referenciado pela *International Dairy Federation* (IDF) e pela *American Public Health Association* (APHA) para a contagem bacteriana total no leite cru, que estima o número de microrganismos aeróbios mesófilos presentes neste. Este método é baseado na capacidade de crescimento dos microrganismos presentes na amostra de formarem colônias visíveis macroscopicamente que poderão ser contadas em UFC (APHA, 1992).

De acordo com a *International Standard* 4833 (2003), a técnica consiste na enumeração de microrganismos mesófilos aeróbios facultativos viáveis, após incubação das placas à  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 horas  $\pm$  3 horas em meio ágar padrão para contagem (*plate count ágar* - PCA) com adição de leite em pó desnatado (*skimmed milk powder*). Para obtenção de contagem final nas placas de Petri entre 15 a 300 colônias, inicialmente são realizadas as diluições sucessivas da amostra de leite, utilizando água peptonada tamponada. Em seguida, 1 mL de cada diluição é transferido para as placas de Petri correspondentes, e posteriormente o meio de cultura é vertido na placa; movimentos circulares são necessários para misturar o meio de cultura ao conteúdo da amostra recentemente pipetado. Após solidificar, é adicionado a sobrecamada às placas, composta pela suspensão do mesmo meio de cultura. O tempo decorrido entre o fim da preparação da suspensão inicial e o momento em que o meio de cultura é vertido na última



placa não deve exceder 45 minutos. É realizada a incubação das placas invertidas e após o tempo supracitado, a enumeração das unidades formadoras de colônias.

A vantagem deste método é a fácil execução, uma vez que não exige equipamentos sofisticados, apenas requer mão de obra bem treinada (CASTRO, 2007).

Porém, existem restrições acerca da utilização deste método, como: somente são detectados microrganismos que podem se multiplicar às condições específicas do método; colônias podem ser originadas tanto a partir de um único microrganismo como a partir de agregados de microrganismos; possibilidade de ocorrência de injúrias subletais, a exemplo do tratamento térmico, que faz com que parte das bactérias não forme colônias, apesar de serem metabolicamente ativas. Outros fatores são o tempo prolongado para disponibilizar os resultados e a inviabilidade de análise de grandes quantidades de amostras diárias (BROUTIN, 2004; CASSOLI et al., 2008).

Outras limitações deste método foram citadas por Suhren, Walte (2000), Gunasekera et al. (2003) além de Broutin (2004), referente a menor precisão dos resultados obtidos em comparação ao método instrumental automatizado, e ainda a possibilidade de contagem de apenas um grupo bacteriano (mesófilos), enquanto que o método instrumental possibilita a quantificação de todos os grupos microbianos (mesófilos, psicrotróficos, termófilos e termodúricos).

Principalmente por estas limitações, o método de referência não expressa a real qualidade bacteriológica do leite, como referenciado por Suhren, Walte (2000).

### **2.7.2 Análise da qualidade do leite por citometria de fluxo**

A agroindústria láctea requer a análise constante e rigorosa da qualidade do leite. A citometria de fluxo permite rápida e específica identificação da população microbiana do leite (DÍAS et al., 2010). O emprego da citometria de fluxo permite agilizar e automatizar a contagem bacteriana total do leite. É comumente empregada em laboratórios de controle de qualidade e em indústrias de laticínios (GUNASEKERA et al., 2000). Consiste na medição de características celulares quando estas encontram-se suspensas em meio fluido (ÁLVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000).

A metodologia da citometria de fluxo é muito sensível. Opera identificando células individuais em uma população heterogênea, evita a necessidade de procedimentos de cultura ou enriquecimento prévios e pode ser qualitativa ou quantitativa (BROUTIN, 2004).

Descrito por Salomão (2012), com base nas referências de Brock et al. (1994) e Silva et al. (2010), o potencial de membrana é o parâmetro de viabilidade celular mais utilizado no citômetro de fluxo. Este potencial, é gerado pela presença da membrana plasmática que envolve a célula, responsável pela geração e manutenção de um gradiente eletroquímico entre o meio interno e o externo. A membrana plasmática intacta é seletivamente permeável, devido à presença de carreadores proteicos específicos que participam do transporte. Outro parâmetro relacionado à viabilidade celular é a integridade de membrana, em condições de estresse, como a submissão à tratamento térmico. A célula bacteriana tem sua membrana plasmática afetada, causando alterações nos sistemas de transporte ativo e possibilitando sua permeabilização. Devido à essas alterações, é possível corar as células por corantes fluorescentes catiônicos ou aniônicos.

Segundo Álvarez-Barrientos et al. (2000), no citômetro de fluxo microbiológico, partículas individuais passam com o auxílio de um fluido carreador sob uma zona de iluminação. Os fotomultiplicadores (detectores apropriados) registram a passagem das células eletronicamente, medindo a magnitude do pulso, pela extensão da luz dispersa. A magnitude destes pulsos é classificada eletronicamente permitindo o desenvolvimento de histogramas do número de células.

O equipamento *Bentley Bactocount IBC*<sup>®</sup>, da *Bentley Instruments Incorporated*, Chaska, Estados Unidos da América (Figura 3) é um instrumento totalmente automatizado que utiliza a citometria de fluxo para a rápida contagem bacteriana individual (CBI) em leite cru, com capacidade analítica de até 150 amostras/hora (BENTLEY INSTRUMENTS, 2002).

Figura 3 - Equipamento *Bentley Bactocount IBC*<sup>®</sup>, da *Bentley Instruments Incorporated*



Fonte: BENTLEY INSTRUMENTS (2002).

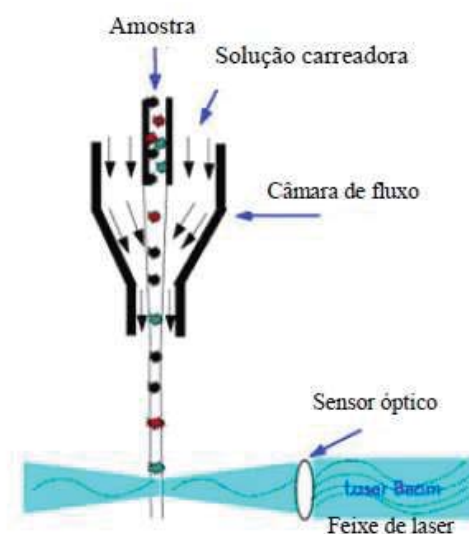
Neste equipamento, uma alíquota da amostra é aspirada e depositada em um carrossel, onde é aquecida a 50°C. Durante a rotação deste carrossel, a amostra entra em contato com uma solução de incubação composta de um tampão para clarificação, uma enzima proteolítica e um marcador fluorescente de DNA (brometo de etídeo); que é adicionada para romper as células somáticas, solubilizar os glóbulos de gordura e proteínas, permeabilizar as bactérias e corar o DNA/RNA (BROUTIN, 2004; LEITE, 2006).

Essa etapa é fundamental, pois consegue reduzir e dispersar os constituintes do leite suscetíveis à interferência na contagem bacteriana, como proteínas, células somáticas e glóbulos de gordura (BENTLEY INSTRUMENTS, 2002).

O marcador fluorescente, a base de brometo de etídeo, se liga rápida e seletivamente na cadeia dupla do ácido nucléico bacteriano. A mistura é sonicada duas vezes durante a incubação por sondas ultrassônicas, o que auxilia a degradação química das partículas interferentes, o rompimento de colônias bacterianas remanescentes e a redução da fluorescência de fundo. Após o período de incubação, parte da mistura é transferida para a citometria de fluxo, onde ocorre o alinhamento das bactérias em um tubo capilar e exposição a um feixe de laser. Em seguida, ocorre a emissão de um sinal de fluorescência do DNA corado com brometo de etídeo, sendo esta coletada por receptores ópticos, filtrada e captada por um fotomultiplicador (BROUTIN, 2004; LEITE, 2006).

A Figura 4, apresenta o esquema do percurso da amostra no fluxo laminar (*flow cell*) em equipamento de citometria de fluxo.

Figura 4 - Percurso da amostra no fluxo laminar (*flow cell*) em equipamento de citometria de fluxo



Fonte: Adaptado de CASTRO (2007).

Os pulsos são então transformados em contagem bacteriana individual (BROUTIN, 2004).

O resultado obtido é expresso em contagem bacteriana individual por mililitro (CBI/mL). Como a legislação nacional estabelece que os valores de contagem bacteriana do leite devem ser expressos em UFC/mL, os resultados obtidos pelo citômetro de fluxo são transformados estatisticamente, aplicando-se uma equação de correlação entre os métodos (CASSOLI, 2008).

A citometria de fluxo expressa os resultados de forma distinta do método de referência, não sendo correta a comparação. É necessário que as análises sejam feitas em ambos os métodos, com as mesmas amostras, para se desenvolver uma correlação entre as metodologias, levando-se em conta os aspectos que diferem os seus princípios de contagem (SUHREN et al., 1992).

No desenvolvimento de uma equação de correlação entre métodos, Suhren, Walte (2000), ressaltam que vários fatores podem interferir, a exemplo do nível da contaminação bacteriana. No caso de amostras com contagem bacteriana reduzida, existe predominância de bactérias Gram-positivas, para as contagens mais altas, a predominância é das bactérias Gram-negativas. Outros fatores, como a atividade metabólica das células bacterianas, características de agregação e microbiota predominante também podem afetar a correlação.

Países como o Canadá, Reino Unido e Noruega, estabeleceram em seus padrões a contagem individual de bactérias, realizada pelo método instrumental (automatizado), eliminando a necessidade do desenvolvimento de equações para expressão dos resultados (BROUTIN, 2004).

A RBQL, a exemplo de países onde existem vários laboratórios de controle da qualidade do leite (conhecidos como *Central Milk Testing*), desenvolveu junto ao MAPA um estudo de correlação, determinando as equações de regressão linear para conversão dos resultados, uma vez que é essencial que os equipamentos utilizados em cada laboratório gerem resultados similares, tanto quando expressos em CBI, quanto quando expressos em UFC.

A conversão da CBI em CPP ocorre por meio de um modelo matemático específico, desenvolvido a partir de vários pares de valores de contagens bacterianas individuais e respectivos valores de contagem padrão em placas (BRASIL, 2016).

Para o desenvolvimento deste estudo, foi utilizado um grande número de amostras distribuídas conforme as estações do ano, sendo estas representativas das regiões a serem monitoradas. A manutenção desta equação é permanente, uma vez que os ajustes são efetuados com frequência, acatando o proposto por Suhren, Walte (2000).

A partir de outubro de 2013, segundo ofício circular 10-2013/PARLPR padronizou-se a nomenclatura para expressão dos resultados, substituindo CBT ( $\text{UFC} \times 1000 \text{ mL}^{-1}$ ) por CPP ( $\text{UFC} \times 1000 \text{ mL}^{-1}$ ).

Seguindo orientações da Instrução de Serviço da RBQL, Brasil (2016), designa-se o valor de CPP aquele obtido da conversão dos resultados de CBI gerados pelo citômetro de fluxo, expressos em UFC/mL.

A partir de um valor de CBI produzido pelo equipamento, expresso em CBI/mL, deve-se obter o logaritmo de base dez do valor de medição de CBI, arredondando-se até a quinta casa decimal.

Após, este logaritmo de CBI obtido deve ser multiplicado pelo valor da inclinação da equação de conversão, soma do produto obtido ao valor do intercepto da equação de conversão e arredondamento do valor final obtido até a quinta casa decimal, obtendo-se assim, o logaritmo de base dez do valor de medição de CPP.

Procede-se com a elevação do número 10 a uma potência igual ao Log CPP para obter-se o valor de medição individual de CPP em UFC/mL.

Por fim, divide-se o valor de medição de CPP em UFC/mL por 1000, arredondando-se o número encontrado para obtenção de um valor numérico. Este valor obtido corresponde ao número de milhares de UFC por mililitro de leite e deve ser inteiro quando igual ou maior que 1. Quando este valor for menor que 1, deve apresentar apenas uma casa decimal, procedendo-se o arredondamento para obtê-la.

O resultado deve ser multiplicado por 1000 para ser expresso em UFC/mL.

Considerando que os valores de medição de CPP são obtidos por conversão de valores de CBI empregando-se uma equação, os valores máximo e mínimo da abrangência da equação linear são limites de representatividade dela na conversão de CBI em CPP.

Os citômetros de fluxo em uso pelos laboratórios da RBQL para proceder a medição de contagem bacteriana individual em amostras de leite cru operam na faixa linear de 1.000 a 10.000.000 de bactérias individuais/mL.

Desta forma, assumem importância os valores de medição linear de CPP máximo e mínimo.

A equação de regressão linear dos laboratórios da RBQL foi desenvolvida por estes em conjunto com o MAPA, contemplando os resultados obtidos de leite cru de todas as regiões do país, sendo que o tratamento estatístico desta equação, bem como a determinação dos valores de logaritmo de CBI e logaritmo de CPP que compõe a mesma são de responsabilidade do MAPA.

As principais vantagens da técnica de citometria de fluxo são o baixo custo de análise e o elevado rendimento analítico, sendo possível obter a contagem bacteriana em cerca de 12 minutos e analisar 150 amostras por hora. Como desvantagem desta metodologia, pode-se considerar o fato dos resultados serem expressos em CBI, enquanto que os padrões internacionais de qualidade microbiológica são definidos em sua grande maioria em UFC, exigindo assim um estudo de correlação (BROUTIN, 2004).

Outra desvantagem apresentada por Suhren, Walte (2000), é que equipamentos automatizados subestimam a contagem de bactérias Gram-negativo, devido ao fato destas apresentarem uma parede celular que atua como barreira para a entrada do marcador fluorescente, e superestima a contagem de bactérias Gram-positivo, quando comparado ao método de referência.

## **2.8 CONSERVAÇÃO DO LEITE CRU**

Conforme Brinques (2015), alimentos de origem animal apresentam a propriedade de se deteriorar com facilidade, sendo assim, técnicas de preservação de alimentos são utilizadas. A conservação dos alimentos deve impedir as alterações causadas por microrganismos. O crescimento destes ocorre especificamente em ambiente nutritivo, com umidade, oxigênio, temperatura e outras condições favoráveis conforme a espécie microbiana. Os processos de conservação baseiam-se na eliminação total ou parcial dos agentes que modificam os produtos, ou na diferenciação ou supressão de um ou mais fatores essenciais, de modo que o ambiente seja impróprio para qualquer manifestação vital. Isto também pode ser alcançado pela adição de substâncias em qualidade e quantidade que dificultam a multiplicação dos microrganismos. O processo para conservação de alimentos deve alterar o mínimo possível as características naturais dos mesmos.

### **2.8.1 Resfriamento**

A prática de resfriar o leite, em seguida da ordenha, é fundamental na garantia da qualidade da matéria prima, uma vez que o resfriamento do leite a 4°C (em tempo inferior a 3 horas após o término da ordenha) inibe a multiplicação de microrganismos presentes (GERMANO; GERMANO, 2013).

O leite armazenado a uma temperatura baixa pode prolongar significativamente o armazenamento. A redução da temperatura de 6°C para 2°C pode apresentar um ganho de até

dois dias no seu armazenamento, para o leite de boa qualidade microbiológica (BRINQUES, 2015).

A forma mais eficiente para o resfriamento do leite é em tanques de expansão, por apresentar ampla superfície de contato com o produto, além do agitador; fornecendo a rápida queda na temperatura (GERMANO; GERMANO, 2013).

Descrito por Brinques (2015), as reações químicas, a atividade enzimática, o crescimento e a atividade dos microrganismos nos alimentos são retardados pelas baixas temperaturas, assim; quanto menor for a temperatura, menor será a ação química, enzimática e o crescimento microbiano também será retardado. O resfriamento proporciona uma conservação por dias ou semanas, dependendo do produto. A utilização do frio associado a outras técnicas de conservação é amplamente utilizada para manutenção da qualidade do produto a ser conservado.

## **2.8.2 Conservante bacteriostático**

A evolução dos equipamentos automatizados para contagem bacteriana permitiu maior demanda de amostras para esta análise, que inicialmente pelo método de referência levava um tempo maior, além de ser laborioso, o que tornava inviável grandes quantidades de amostras diárias. Os equipamentos de citometria de fluxo reduziram este tempo para dez minutos, introduzindo a contagem bacteriana na rotina dos laboratórios. Esta mudança gerou a necessidade da utilização de um conservante bacteriostático nas amostras de leite a serem testadas, de forma a retratar a contagem bacteriana mais próxima da encontrada nos tanques no momento da coleta (CASSOLI, 2005; LEITE, 2006).

Cassoli et al. (2010), acredita que a vasta extensão territorial e o grande número de propriedades leiteiras no Brasil, torna necessário a utilização de conservantes nas amostras de leite destinadas às análises, ao contrário do que acontece em alguns países que utilizam a refrigeração como único mecanismo de preservação, não sendo utilizados conservantes. Neste caso, a distância entre os laboratórios e as fazendas são curtas, possibilitando a análise em no máximo 48 horas após a coleta.

No Brasil, a presença de dez laboratórios integrantes da RBQL, distribuídos em regiões centrais, também contribui para a necessidade de aumentar a vida útil destas amostras.

Diante do exposto, aplica-se a utilização de um conservante associado à refrigeração para conservação das amostras. O conservante utilizado é o azidiol, que possui como princípio

ativo o cloranfenicol (0,2 mg) e a azida sódica (4,79 mg), ambos bacteriostáticos, e ainda azul de bromofenol (indicador de pH), etanol e citrato de sódio (CASSOLI, 2005; LEITE, 2006).

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). Além disso, o cloranfenicol é um antibiótico bacteriostático, que atua durante a fase de crescimento bacteriana, inibindo a síntese protéica dos microrganismos, já que atua no bloqueio específico da subunidade 50S dos ribossomos bacterianos (ELIZONDO et al., 2005 e DAMASIO, 2012).

O conservante azidiol é utilizado no formato de pastilhas.

A adição da pastilha do conservante ocorre após a fabricação do frasco. Cada frasco estéril de 50 mL empregado para a análise de contagem bacteriana é adicionado de uma pastilha. Desta forma, no momento da coleta da amostra no tanque de refrigeração na propriedade rural, este conservante passa a agir sobre a quantidade amostrada no frasco, provendo a conservação (NEVES, 2008).

É evidente a vantagem da utilização de amostras conservadas que possuem maior vida útil, considerando que grande parte das indústrias realizam a coleta de leite nas fazendas em dias alternados, sendo necessário dois dias para a realização da coleta de amostras de todos os seus produtores (fornecedores de matéria prima) e ainda mais um dia para o transporte das amostras até o laboratório. A amostra deveria ser analisada pelo laboratório em no máximo um dia, para respeitar a recomendação de quatro dias, meta esta dificilmente alcançada em função do grande número de amostras (CASSOLI, 2005).

Ainda existem dúvidas acerca do tempo máximo de armazenamento das amostras sem a ocorrência de alteração dos resultados. Marshall (1992), determina que amostras de leite adicionadas de conservante e mantidas entre 0°C e 4,4°C podem ser analisadas em até sete dias após a coleta.

A vida útil das amostras de leite cru para análise da contagem bacteriana foi sugerida por Cassoli (2005), no período máximo de uma semana de armazenamento da amostra refrigerada e por Leite (2006), um prazo de até dez dias, para amostras conservadas em temperaturas de 4°C até 10°C. Posteriormente, Cassoli et al. (2010), reitera que as amostras para contagem bacteriana podem ser analisadas até sete dias após a coleta, desde que conservadas com azidiol e mantidas sob refrigeração a 7°C.

A possibilidade de prolongar a vida útil das amostras tem grande importância, pois em situações excepcionais, em que não é possível analisar estas dentro do prazo, são geradas dificuldades na logística tanto para as indústrias de laticínios, que devem proceder com nova



coleta, gerando custos e dificuldades operacionais, como para os laboratórios, no caso de falhas dos equipamentos eletrônicos, podendo analisar as amostras por um período um pouco maior, sem comprometer a confiabilidade dos resultados (LEITE, 2006).

Desta forma, o pretendido no referido estudo foi testar diferentes concentrações de azida sódica e cloranfenicol das pastilhas, determinando assim o potencial de conservação destas sobre as amostras de leite cru destinadas para análise de CPP nos laboratórios da RBQL.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS

O experimento foi realizado na Universidade do Contestado – UnC, em Concórdia (SC), utilizando a estrutura do Laboratório Estadual da Qualidade do Leite e do Complexo de Desenvolvimento Científico.

#### 3.2 AMOSTRAS DE LEITE

As amostras para o experimento foram preparadas a partir de leite *in natura* de propriedades rurais do município de Concórdia (SC), com contagem bacteriana previamente conhecida, uma vez que estas são monitoradas semanalmente pelo Laboratório Estadual da Qualidade do Leite.

A utilização do leite *in natura* possibilita a representação da matriz analítica do laboratório, considerando a real contaminação proveniente de bactérias presentes no ambiente, no úbere, na água, das falhas no manejo de ordenha (quando ocorrem) e, ainda, a proliferação bacteriana pelo armazenamento a baixas temperaturas.

##### 3.2.1 Leite *in natura*

O leite *in natura* foi coletado de tanque de refrigeração por expansão, obtido de rebanho leiteiro bovino de duas propriedades rurais, apresentando faixas distintas de contagem bacteriana, sendo:

- Propriedade 1: Leite *in natura* com contagem bacteriana em acordo com a normativa, apresentando valor de leitura inferior a 145.000 CBI/mL, aproximadamente 50.000 UFC/mL, identificado como o grupo 1 (G-1);
- Propriedade 2: Leite *in natura* com contagem bacteriana em desacordo com a normativa, apresentando valor de leitura superior a 2.650.000 CBI/mL, aproximadamente 1.000.000 UFC/mL, identificado como o grupo 2 (G-2).

Os procedimentos para obtenção foram padronizados para ambas propriedades.

No momento da coleta a temperatura do leite no tanque de refrigeração não excedeu 4,0°C. A medição se deu utilizando um termômetro de contato tipo haste calibrado em laboratório de calibração reconhecido e acreditado pelo Inmetro, com certificado rastreado pela

RBC. O agitador do tanque foi acionado por dez minutos, e permaneceu ligado também durante a coleta, para homogeneização do leite.

O leite de cada propriedade foi transferido para um recipiente identificado, previamente esterilizado por processo de autoclavagem a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Imediatamente após a coleta, foram acondicionados em caixas isotérmicas com gelo reutilizável e encaminhados para o Complexo de Desenvolvimento Científico da Universidade do Contestado – UnC.

### **3.3 FRACIONAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS**

#### **3.3.1 Amostragem e Fracionamento**

O leite de contagem bacteriana dentro dos padrões da normativa (G-1) e o leite de contagem bacteriana acima dos padrões da normativa (G-2) originaram amostras que foram distribuídas em frascos de polipropileno estéreis de 50 mL, acondicionados individualmente em invólucro plástico, sem a adição do conservante, considerados o controle do experimento, e em frascos adicionados de conservante azidiol com diferentes concentrações de azida sódica e cloranfenicol. Para o fracionamento foram utilizadas provetas graduadas de vidro previamente esterilizadas por processo de autoclavagem a  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.

Em capela de fluxo laminar, 40 mL de leite dos grupos 1 (G-1) e 2 (G-2) foram distribuídos para cada um dos frascos correspondentes aos tratamentos a serem testados. Os frascos foram homogeneizados com movimentos suaves e ininterruptos de inversão, possibilitando a uniformização do conteúdo e garantindo a completa dissolução da pastilha de conservante, nos frascos em que esta foi utilizada.

Posteriormente, os frascos foram separados e incubados em estufas BOD conforme as faixas de temperatura e tempo determinados, até o momento da análise no citômetro de fluxo, exceto as amostras correspondentes ao dia zero, que foram analisadas logo em seguida do fracionamento.

#### **3.3.2 Identificação**

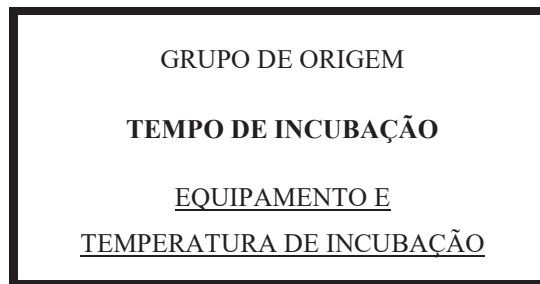
Para facilitar a incubação, agilizar a manipulação das amostras no momento da realização do ensaio, bem como minimizar os efeitos de variação da temperatura interna das

incubadoras BOD, em decorrência da porta aberta por tempo prolongado, os frascos foram acondicionados em embalagens plásticas.

Cada embalagem plástica recebeu uma etiqueta para identificação das amostras, conforme o grupo do qual estas foram originadas, o tempo de incubação do referido lote, a identificação da incubadora e a respectiva temperatura da mesma.

O modelo da etiqueta de identificação das embalagens pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Modelo de etiqueta para identificação das embalagens



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

### 3.3.3 Controle de qualidade

Na data do fracionamento das amostras, foi separada uma alíquota de cada grupo (G-1 e G-2) para avaliação dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado.

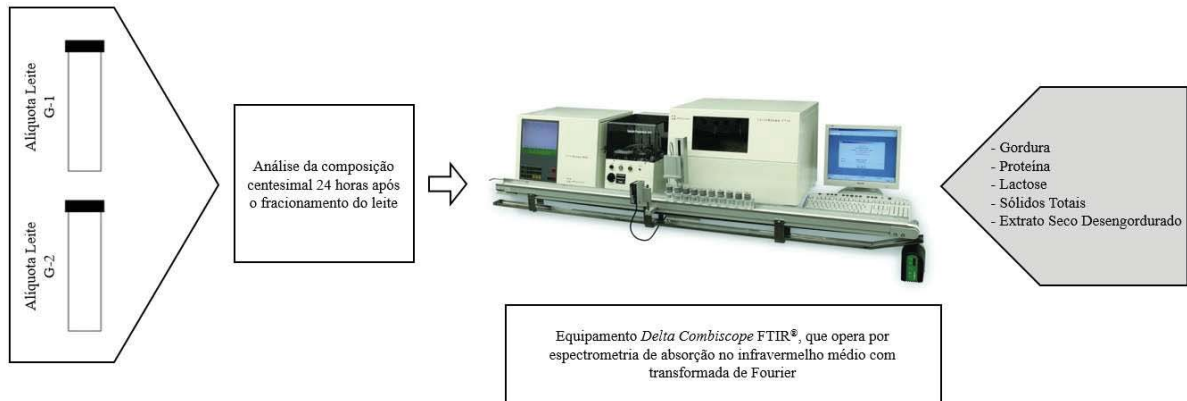
Esta amostra foi acondicionada em frascos de polipropileno sem a adição de conservante e mantidas até o momento do ensaio em temperatura de refrigeração à  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Para determinação dos parâmetros supracitados, foi utilizado o equipamento *Delta Combiscope FTIR*<sup>®</sup> (*Delta Instruments*, Drachten, Holanda), que opera sob espectrometria de absorção no infravermelho médio com transformada de Fourier.

Para ambos os grupos, os resultados esperados para a composição centesimal eram o mais próximo possível aos estabelecidos para leite cru refrigerado, com gordura mínima de 3,0 g/100g, proteína mínima de 2,9 g/100g e extrato seco desengordurado mínimo de 8,4 g/100g (BRASIL, 2011).

A análise da composição centesimal das alíquotas dos dois grupos foi realizada 24 horas após o fracionamento, possibilitando a estabilização dos componentes do leite, conforme pode-se visualizar na Figura 6.

Figura 6 - Análise da composição centesimal do leite dos grupos G-1 e G-2 utilizando o equipamento *Delta Combscope FTIR®*



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Conforme ilustrado na Figura 7, ainda na data do fracionamento, uma alíquota de leite de cada grupo teve o seu pH medido por equipamento pHmetro e também foram avaliadas quanto à acidez titulável, expressa em graus Dornic ( $^{\circ}$ D) em consonância com a Instrução Normativa N $^{\circ}$  68 de 2006, método B.

Figura 7 - Medição do pH e análise da acidez titulável do leite dos grupos G-1 e G-2



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Almejava-se para a medição do pH resultado dentro do intervalo de 6,0 e 7,0. Já para o resultado da acidez titulável, o ideal era que este estivesse compreendido entre 14°D e 18°D.

Ao longo do tempo total de incubação das amostras, como controle da integridade das mesmas, após a determinação do resultado de CPP, diariamente estas foram submetidas também à análise pelo espectrômetro *Delta Combiscope FTIR*<sup>®</sup> (*Delta Instruments*, Drachten, Holanda) para avaliação dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado.

### 3.4 TEMPO E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

As amostras permaneceram incubadas por 14 dias, com análises diárias para cada temperatura testada, partindo do dia 0 (D-0) até o dia 14 (D-14).

O dia zero (D-0) compreendeu a data da coleta e fracionamento do leite *in natura*.

Para a incubação das amostras foram utilizadas três estufas BOD, com temperaturas de  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (BOD-3),  $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (BOD-6) e  $9^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (BOD-9).

Para a aferição da temperatura, cada estufa foi equipada com um termômetro e monitorada diariamente, por meio de duas verificações, sendo a primeira verificação no período matutino, e a segunda verificação no período vespertino.

Foram utilizados termômetros tipo termohigrômetros calibrados em laboratório de calibração reconhecido e acreditado pelo Inmetro, com certificado rastreado pela RBC.

### 3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nesta pesquisa foram testadas quatro variáveis, sendo três condições com pastilhas de conservante com concentrações distintas de azida sódica e cloranfenicol, e uma condição sem a adição do conservante.

O tratamento 1 (T-1) foi aplicado para a concentração usual, correspondente a dose comercial do comprimido; com 4,79 mg (0,12 mg/mL de leite) de azida sódica e com 0,2 mg (0,005 mg/mL de leite) de cloranfenicol.

O tratamento 2 (T-2) para pastilhas de conservante com concentração de azida sódica de 9,58 mg (0,24 mg/mL de leite) e concentração de cloranfenicol de 0,4 mg (0,010 mg/mL de leite).

O tratamento 3 (T-3) para pastilhas de conservante com concentração de azida sódica de 14,37 mg (0,36 mg/mL de leite) e concentração de cloranfenicol de 0,6 mg (0,015 mg/mL de leite).

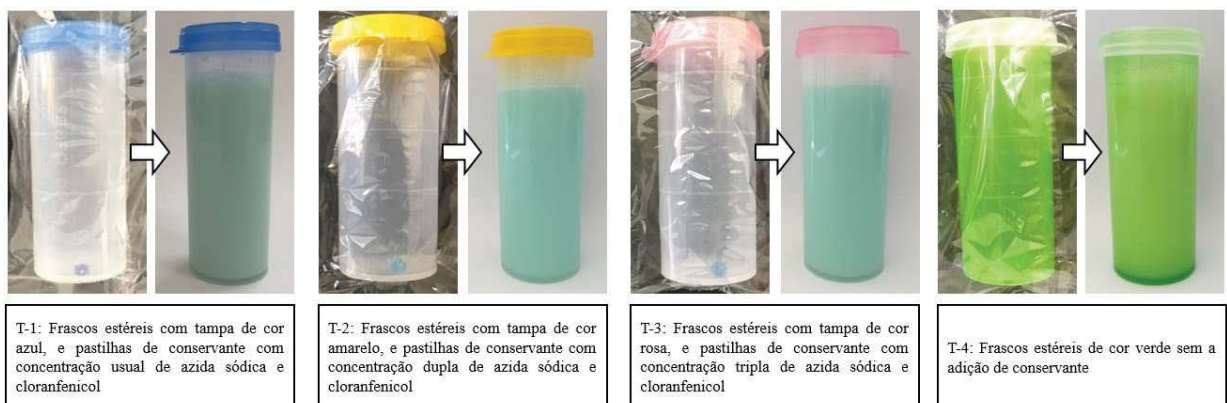
Para o T-2 e T-3 os comprimidos do conservante foram manipulados com concentrações dupla e tripla dos componentes especialmente para a utilização neste experimento.

E o tratamento 4 (T-4) foi aplicado sem a adição do conservante, servindo como o controle amostral.

Para diferenciar os tratamentos, e facilitar a identificação conforme a concentração dos componentes das pastilhas, foram utilizados frascos com cores distintas, sendo: frasco com tampa de cor azul (T-1), frasco com tampa de cor amarelo (T-2), frasco com tampa de cor rosa (T-3) e frasco de cor verde (T-4).

Na Figura 8 podem ser visualizados os frascos aplicados para cada tratamento.

Figura 8 - Frascos utilizados para cada tratamento



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Foram adicionados 40 mL de leite dos grupos G-1 e G-2 nos frascos estéreis com a adição do conservante e sem a adição do conservante para cada um dos tratamentos preconizados.

O leite adicionado aos frascos do T-1, T-2 e T-3 adotou coloração azulada, em função do azul de bromofenol, marcador de cor presente nas pastilhas.

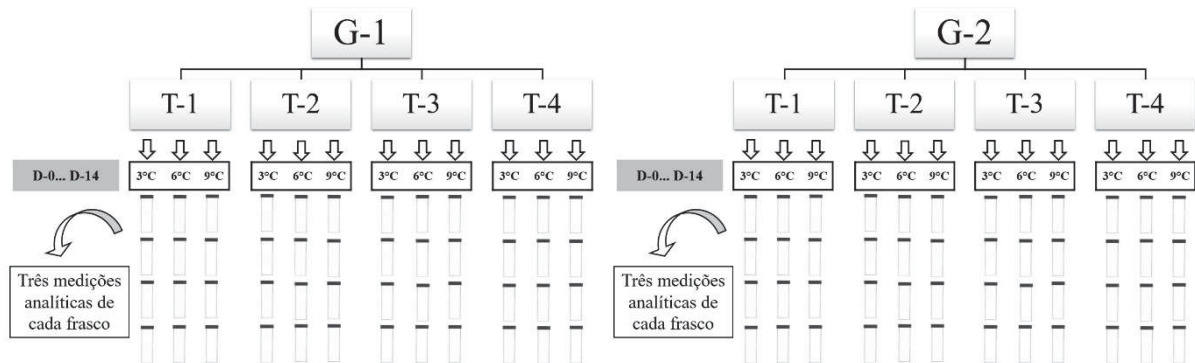
Cada tratamento foi testado para as variáveis de tempo e temperatura de incubação supracitados.

Todas as condições foram testadas em quadruplicata, ou seja, quatro amostras para cada temperatura e tempo testados para cada um dos tratamentos de cada grupo de leite.

Cada amostra foi analisada individualmente no citômetro de fluxo, gerando três medições analíticas.

A reprodução do fracionamento das amostras a partir dos grupos G1 e G2, bem como as variáveis submetidas, foram apresentadas por meio da Figura 9.

Figura 9 - Representação esquemática para a aplicação dos tratamentos e variáveis de cada grupo



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

### 3.6 ANÁLISE DE CPP DAS AMOSTRAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

No laboratório, a análise de contagem bacteriana das amostras foi realizada pelo equipamento *Bentley Bactocount IBC® 150* (*Bentley Instruments Incorporated*, Chaska, Estados Unidos da América).

O referido equipamento opera pelo método de citometria de fluxo, conforme diretrizes da ISO 21187/IDF 196 – *Milk: Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results*.

A *Bentley Instruments* (2002), fabricante do equipamento ressalta que este é automatizado para a rápida enumeração de bactérias individuais no leite cru.

A aplicação prática segue um princípio geral simples: as células são marcadas com um corante fluorescente que se insere no DNA intracelular seguido por detecção de fluorescência induzida por laser a cada fluxo citométrico.

Cada amostra deste experimento foi analisada em triplicata.

Para análise foi utilizado comando do software do próprio equipamento, onde mediante a identificação do conjunto e da quantidade de amostras, este permite que três alíquotas imediatamente subsequentes de cada amostra sejam analisadas em um mesmo lote, de acordo com a Figura 10.



Figura 10 - Comando do software do equipamento que permite a leitura em triplicata



Fonte: Adaptado de *Bentley Instruments* (2002).

Os princípios de operação do equipamento compreenderam na agitação automática do leite e amostragem de aproximadamente 7 mL a partir do frasco, sendo utilizados 4 mL para limpeza das linhas (tubulações), enquanto que 1 mL de cada medição foi depositado em uma cavidade do carrossel.

No carrossel, 2 mL de reagente de incubação foram adicionados à amostra de leite para a coloração das bactérias. Esta mistura permaneceu incubada à 50°C por aproximadamente 10 minutos.

Sondas ultrassônicas foram utilizadas em momentos distintos para a quebra de partículas interferentes e otimização do contato entre o reagente e a amostra de leite, intensificando assim a coloração do DNA bacteriano. Cada amostra sofreu duas sonicações ao longo do processo de incubação no carrossel.

Em seguida, uma parte inicial da solução de incubação foi injetada no citômetro de fluxo, e a contagem dos microrganismos se iniciou.

As bactérias foram coradas, expostas a um feixe de laser e emitiram fluorescência.

O sinal fluorescente foi detectado por um fotomultiplicador.

Posteriormente, os pulsos fluorescentes foram traduzidos em contagens individuais de bactérias, mensurados pela unidade CBI/mL.

Os princípios de operação do citômetro de fluxo podem ser vistos na Figura 11.

Figura 11 - Princípios de operação do citômetro de fluxo



Fonte: Elaborado pelo Autor (2017).

Antes de se proceder com as análises, houve a determinação citométrica de microesfera – *cell* (10 vezes), solução líquida concentrada alcalina de base surfactante (20 vezes), água ultrapura (20 vezes), *control sample* (2 vezes), microesfera – carrossel (5 vezes), *check sample* (4 vezes) e novamente solução líquida concentrada alcalina de base surfactante (5 vezes).

Após a verificação das checagens do equipamento, o mesmo apresentava-se apto para as análises do experimento, uma vez que todos os parâmetros avaliados foram satisfatórios.

### 3.6.1 Expressão dos resultados

O contador bacteriano por citometria de fluxo, expressa os resultados das leituras das amostras em contagem bacteriana individual (CBI/mL).

Os resultados em CBI/mL foram transformados em logaritmo de base 10, já que os mesmos são variáveis, desta forma, proferindo maior homogeneidade aos dados.

No Brasil, os resultados de CPP obtidos eletronicamente são reportados em UFC/mL, pois os limites legais analíticos são representados por esta mesma unidade de medida.

A conversão dos valores de medição de CBI em Contagem Padrão em Placas (CPP), reportadas em unidade formadora de colônia (UFC/mL), é realizada por meio de uma equação de regressão linear, por comando no software do equipamento. A equação utilizada é determinada aos laboratórios da RBQL pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA por meio de documento de suporte, e a mesma apresenta consonância com a estação do ano e a região de abrangência geográfica do laboratório.

No entanto, neste experimento não foi considerada a conversão dos resultados, sendo os dados utilizados como determinado pelo citômetro de fluxo, no formato de CBI, em consonância com as legislações internacionais.

### **3.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO**

A partir da transformação dos resultados de CBI em logaritmo de base 10, os dados foram submetidos ao tratamento estatístico.

Primeiramente realizou-se o teste da análise de variância (ANOVA), considerando os efeitos dos tempos, das temperaturas e dos tratamentos, além das interações dos mesmos. Em seguida, foi aplicado o teste de Tukey para as temperaturas e tratamentos.

A ação do tempo sobre as amostras foi analisada utilizando somente os tempos zero (D-0) e um (D-1) para comparação com os demais tempos subsequentes, visto que desejávamos avaliar as possíveis alterações em relação às características do leite do tanque quando chega para análise.

Também foi utilizada a correlação linear (Pearson) para avaliar os diferentes tempos de incubação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 QUALIDADE DO LEITE *IN NATURA* UTILIZADO NO EXPERIMENTO

#### 4.1.1 Temperatura do leite no tanque de refrigeração

No momento da coleta do leite *in natura* do grupo 1 e do grupo 2 nos tanques de refrigeração, a temperatura foi de 2,8°C para o leite do G-1 e 3,1°C para o leite do G-2; portanto, dentro do esperado, uma vez que o armazenamento do leite cru sob refrigeração possibilita a redução de perdas referentes à qualidade da matéria prima pela atividade acidificante de bactérias mesófilas (VIDAL-MARTINS et al., 2005), que constituem a maioria dos microrganismos do leite *in natura*, e desta forma o resfriamento em temperatura inferior à 4°C deve ocorrer o mais breve possível após a ordenha (MENEZES et al., 2014).

De acordo com Bueno et al. (2008), o leite conservado em temperatura acima de 7°C apresenta contagem bacteriana significativamente maior do que o leite conservado em temperatura abaixo de 7°C, já que a baixa temperatura inibe ou reduz a multiplicação da maioria das bactérias que afetam diretamente a contagem bacteriana do leite, além de proporcionar a diminuição da atividade de enzimas degradativas (ARCURI et al., 2006), contudo, Tronco (2010) ressalta que o inadequado resfriamento do leite está entre os principais problemas de contaminação do mesmo, e períodos prolongados de refrigeração resultam na queda da qualidade devido ao crescimento e à atividade de bactérias psicrotróficas.

#### 4.1.2 Acidez titulável e pH

O resultado obtido no teste da acidez titulável para o leite do G-1 foi de 15,5°D e para o leite do G-2 foi de 14,0°D.

Considerando que a acidez é determinada pela porcentagem de ácido lático no leite, os resultados obtidos foram satisfatórios, haja visto que a faixa compreendida entre 14°D e 16°D é característica da acidez natural do leite (VENTURINI et al., 2007).

Valores superiores a 18°D são indicativos da multiplicação excessiva de bactérias, transformando assim a lactose em ácido lático, acidificando o leite; este processo fermentativo é resultante principalmente pela ação dos microrganismos mesófilos (SOUZA et al., 2016).

Concomitantemente, o valor do pH obtido para o leite *in natura* dos dois grupos de leite resultou em 6,63 para o G-1 e em 6,64 para o G-2.

Sendo o pH um parâmetro indicador da qualidade sanitária e da estabilidade térmica do leite, admite-se variação para este entre 6,4 e 6,8 quando o produto é obtido em condições de higiene, oriundo de rebanhos saudáveis e mantido em temperatura de refrigeração (VENTURINI et al., 2007).

#### 4.1.3 Composição centesimal

A partir de uma alíquota de leite retida na data do fracionamento das amostras do grupo 1 e do grupo 2, foram determinados os parâmetros da composição centesimal, conforme apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Análise da composição centesimal dos grupos G-1 e G-2

Parâmetro	Limites Mínimos		
	IN Nº 62 (BRASIL, 2011)	Leite G-1	Leite G-2
Gordura	3,0 g/100g	3,38 g/100g	3,51 g/100g
Proteína	2,9 g/100g	3,14 g/100g	2,95 g/100g
Lactose	-	4,53 g/100g	4,46 g/100g
Sólidos Totais	-	12,05 g/100g	11,85 g/100g
Extrato Seco Desengordurado	8,4 g/100g	8,67 g/100g	8,33 g/100g

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Nota-se que os resultados da composição centesimal obtidos para ambos os grupos ficaram bastante próximos aos limites estabelecidos para leite cru refrigerado de acordo com a instrução normativa vigente, e somente o resultado do extrato seco desengordurado do G-2 não atendeu ao valor mínimo. No entanto, como este é calculado por diferença entre os sólidos totais e a gordura, admite-se uma variação de  $\pm 0,09$  (para mais ou para menos) sendo, portanto, o resultado obtido satisfatório para o referido parâmetro, uma vez que encontra-se dentro desta variação.

As amostras foram avaliadas diariamente, do dia 1 até o dia 14 quanto aos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado, com o intuito de acompanhar a alteração dos valores e/ou possível degradação dos componentes no decorrer do período de incubação em diferentes temperaturas, bem como a relação da contagem bacteriana sobre os componentes do leite.

Para a análise da composição centesimal foram utilizadas as amostras após a determinação da contagem bacteriana no citômetro de fluxo, estando desta forma, adicionadas de conservante bacteriostático (azidiol), mesmo considerando que este não é o conservante apropriado para a determinação da composição centesimal, reportando aos estudos de Gonzalo (2003) e Cassoli (2005), que confirmaram que amostras refrigeradas e conservadas com azidiol apresentaram redução nos teores de gordura e lactose a partir do quinto dia de incubação, em relação às amostras com o conservante apropriado para o ensaio de ação bactericida (bronopol). O mesmo não foi observado para os teores de proteína e sólidos totais, onde os valores foram semelhantes entre as amostras conservadas com azidiol e com bronopol mantidas sob refrigeração, inviabilizando assim a utilização de uma única amostra conservada com azidiol para a determinação de todas as análises exigidas pela normativa, segundo os mesmos autores.

Estes relatos condizem com os de Leite (2006) e Sanchez et al. (2005), por também defenderem a utilização do bronopol para a conservação das amostras destinadas à contagem de células somáticas e composição centesimal.

Nas tabelas a seguir podem ser observadas as médias gerais de cada tratamento de acordo com a temperatura de incubação, seguido do desvio padrão e dos valores mínimo e máximo; conforme segue: teor de gordura (Tabela 5), teor de proteína (Tabela 6), teor de lactose (Tabela 7), teor de sólidos totais (Tabela 8) e teor de extrato seco desengordurado (Tabela 9).

Tabela 5 - Média geral, desvio padrão e valores mínimo e máximo do teor de gordura (g/100g) para cada tratamento em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C

Média $\pm$ DP/ Temperatura	T-1			T-2			T-3			T-4		
	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo
3°C	3,71 $\pm$ 0,43	3,11	4,30	3,74 $\pm$ 0,52	3,09	4,88	3,66 $\pm$ 0,41	3,07	4,23	3,91 $\pm$ 0,58	3,38	4,91
6°C	3,47 $\pm$ 0,57	2,23	4,29	3,59 $\pm$ 0,47	2,67	4,27	3,58 $\pm$ 0,47	2,67	4,26	3,86 $\pm$ 0,43	3,39	4,33
9°C	3,67 $\pm$ 0,50	2,69	4,30	3,59 $\pm$ 0,48	2,68	4,26	3,59 $\pm$ 0,47	2,67	4,26	3,87 $\pm$ 0,47	3,38	4,40

Média $\pm$ DP/ Temperatura	T-1			T-2			T-3			T-4		
	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo
3°C	3,50 $\pm$ 0,01	3,48	3,53	3,49 $\pm$ 0,01	3,47	3,52	3,49 $\pm$ 0,01	3,46	3,53	3,52 $\pm$ 0,00	3,51	3,53
6°C	3,52 $\pm$ 0,04	3,48	3,65	3,50 $\pm$ 0,03	3,47	3,62	3,51 $\pm$ 0,03	3,48	3,61	3,46 $\pm$ 0,10	3,27	3,53
9°C	3,55 $\pm$ 0,08	3,49	3,83	3,52 $\pm$ 0,07	3,46	3,76	3,52 $\pm$ 0,07	3,48	3,79	3,55 $\pm$ 0,05	3,51	3,65

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Tabela 6 - Média geral, desvio padrão e valores mínimo e máximo do teor de proteína (g/100g) para cada tratamento em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C

Média $\pm$ DP/ Temperatura	T-1			T-2			T-3			T-4		
	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo
3°C	3,13 $\pm$ 0,01	3,13	3,17	3,14 $\pm$ 0,01	3,11	3,17	3,14 $\pm$ 0,01	3,13	3,16	3,13 $\pm$ 0,01	3,11	3,14
6°C	3,14 $\pm$ 0,01	3,13	3,17	3,14 $\pm$ 0,01	3,13	3,17	3,14 $\pm$ 0,01	3,13	3,17	2,95 $\pm$ 0,27	2,41	3,14
9°C	3,14 $\pm$ 0,01	3,12	3,17	3,14 $\pm$ 0,01	3,13	3,17	3,14 $\pm$ 0,01	3,13	3,17	2,73 $\pm$ 0,41	2,30	3,13

Média $\pm$ DP/ Temperatura	T-1			T-2			T-3			T-4		
	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo	Média (%) $\pm$ DP	Mínimo	Máximo
3°C	2,95 $\pm$ 0,00	2,94	2,97	2,95 $\pm$ 0,00	2,94	2,97	2,95 $\pm$ 0,00	2,94	2,97	2,93 $\pm$ 0,03	2,90	2,96
6°C	2,95 $\pm$ 0,00	2,94	2,96	2,95 $\pm$ 0,01	2,94	2,97	2,95 $\pm$ 0,00	2,94	2,97	2,91 $\pm$ 0,02	2,90	2,95
9°C	2,95 $\pm$ 0,00	2,94	2,97	2,95 $\pm$ 0,01	2,94	2,97	2,95 $\pm$ 0,00	2,94	2,98	2,90 $\pm$ 0,08	2,80	2,99

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).





Tabela 9 - Média geral, desvio padrão e valores mínimo e máximo do teor de extrato seco desengordurado (g/100g) para cada tratamento em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C

Leite Grupo 1 (G-1)												
Média ± DP/ Temperatura	T-1			T-2			T-3			T-4		
	Média (%) ± DP	Mínimo	Máximo	Média (%) ± DP	Mínimo	Máximo	Média (%) ± DP	Mínimo	Máximo	Média (%) ± DP	Mínimo	Máximo
3°C	8,76±0,03	8,73	8,82	8,73±0,03	8,66	8,81	8,72±0,03	8,68	8,78	8,64±0,03	8,56	8,68
6°C	8,77±0,03	8,73	8,84	8,74±0,03	8,71	8,80	8,73±0,03	8,70	8,80	8,56±0,21	8,09	8,78
9°C	8,77±0,03	8,73	8,84	8,75±0,03	8,70	8,81	8,74±0,03	8,71	8,81	8,24±0,50	7,64	8,67
Leite Grupo 2 (G-2)												
Média ± DP/ Temperatura	T-1			T-2			T-3			T-4		
	Média (%) ± DP	Mínimo	Máximo	Média (%) ± DP	Mínimo	Máximo	Média (%) ± DP	Mínimo	Máximo	Média (%) ± DP	Mínimo	Máximo
3°C	8,42±0,01	8,40	8,45	8,39±0,01	8,38	8,42	8,39±0,01	8,37	8,42	8,32±0,01	8,31	8,35
6°C	8,42±0,01	8,40	8,44	8,40±0,01	8,38	8,42	8,39±0,01	8,37	8,41	8,31±0,03	8,25	8,35
9°C	8,42±0,01	8,40	8,45	8,40±0,01	8,38	8,42	8,39±0,01	8,34	8,42	8,23±0,21	7,86	8,35

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

A partir dos cálculos da média geral e dos respectivos desvios, constatou-se que o teor de gordura e consequentemente o teor dos sólidos totais apresentaram maior variação, enquanto que os teores de proteína, lactose e extrato seco desengordurado foram mais estáveis.

Com base na Tabela 5, tanto para o G-1 como para o G-2, a média do teor de gordura manteve-se dentro do esperado para leite *in natura*.

A média das amostras do grupo 1 apresentou variação entre  $3,47 \text{ g}/100\text{g} \pm 0,57$  (menor média) para as amostras do T-1 incubadas à  $6^{\circ}\text{C}$  e  $3,91 \pm 0,58$  (maior média) para as amostras do T-4 incubadas à  $3^{\circ}\text{C}$ ; enquanto que a variação apresentada para as médias do grupo 2 foi de  $3,46 \text{ g}/100\text{g} \pm 0,10$  (menor média) para as amostras do T-4 incubadas à  $6^{\circ}\text{C}$  e de  $3,55 \text{ g}/100\text{g} \pm 0,08$  (maior média) para as amostras do T-1 incubadas à  $9^{\circ}\text{C}$ .

O G-1 apresentou maior variação dos valores de gordura entre os tratamentos, quando no G-2 estes foram bastante semelhantes.

Outro ponto a ser considerado para o grupo 1 – leite com baixa contagem bacteriana, dentro do padrão da normativa, foi o aumento dos valores de gordura entre os dias 4 e 5, seguido de redução progressiva já a partir do dia 6 para as amostras do T-4 incubadas à  $9^{\circ}\text{C}$ , do dia 8 para as amostras do T-1, T-2 e T-3 incubadas à  $6^{\circ}\text{C}$  e à  $9^{\circ}\text{C}$  e do dia 10 para as amostras do T-1, T-2 e T-3 incubadas à  $3^{\circ}\text{C}$ .

Vargas et al. (2014) e Bueno et al. (2008) constataram este mesmo comportamento, em que ocorreu aumento das concentrações de gordura e consequentemente de sólidos totais em decorrência da contaminação bacteriana do leite.

Contudo, os autores desta pesquisa atribuem o aumento dos valores do parâmetro de gordura ao erro analítico instrumental, previsto uma vez que ao longo da realização do presente trabalho foi respeitada a rotina para a prestação de serviço do laboratório, que compreende calibrações semanais do equipamento por meio de amostras de padrões de referência.

Coitinho et al. (2017) alegam que o infravermelho com transformada de Fourier é utilizado pela maioria das agroindústrias para a determinação da composição do leite, por ser uma metodologia rápida e que não requer reagentes ou preparação de amostras, e do mesmo modo apresenta excelente sensibilidade e especificidade também para a identificação de adulterantes.

O aumento do teor de gordura não foi observado no grupo 2 – leite com alta contagem bacteriana, acima do padrão da normativa, já que os resultados mantiveram-se constantes, mas com redução evidenciada a partir do dia 5 para as amostras do T-2 incubadas à  $9^{\circ}\text{C}$ , do dia 6 para as amostras do T-1 incubadas à  $9^{\circ}\text{C}$  e T-2 incubadas à  $3^{\circ}\text{C}$  e  $6^{\circ}\text{C}$ , do dia 7 para as amostras

do T-1 incubadas à 3°C e do dia 10 para as amostras do T-3 em todas as faixas de temperatura testadas (3°C, 6°C e 9°C).

Segundo Baur et al. (2015), devido à presença de microrganismos e células somáticas no leite de tanque de refrigeração, a atividade enzimática é um fator significativo, e que pode afetar a qualidade de uma amostra de leite, bem como levar a desvios nos resultados laboratoriais.

No entanto, os conservantes têm pouco ou nenhum efeito sobre a degradação enzimática de gorduras e proteínas durante o armazenamento (ZAJÁC et al., 2016).

A redução da concentração do teor de gordura possivelmente está relacionada devido ao tempo prolongado de incubação em temperatura de refrigeração, considerando que tais condições favorecem o crescimento de microrganismos psicotróficos já após as primeiras 72 horas de armazenamento (PEIXOTO et al., 2016). Em leite com elevada contagem bacteriana, a diminuição do percentual de gordura possivelmente ocorre pela ação das fosfolipases de origem bacteriana, principalmente a fosfolipase C e a lecitinase, das bactérias psicotróficas, que são os principais agentes de deterioração do leite cru (ANDRADE et al., 2009, SALOMÃO, 2012 e FONSECA et al., 2013).

Não foi possível mensurar a redução dos teores de gordura do grupo 2, para o tratamento 4 (sem conservante), uma vez que não foi realizada a medição das amostras do referido tratamento a partir do sexto dia de incubação, em decorrência da formação de gás e presença de coágulos nos frascos, o que poderia danificar o equipamento.

Dos resultados obtidos para proteína, nos tratamentos em que o conservante foi utilizado (T-1, T-2 e T-3) considerando as três temperaturas de incubação, o valor médio das medições foi aceitável para o parâmetro determinado pela legislação para leite *in natura*. O mesmo pode ser verificado também para o tratamento sem conservante (T-4) do grupo 2. Entretanto, neste mesmo tratamento sob incubação à 9°C no grupo 1, o valor médio da proteína foi de  $2,73 \pm 0,41$  g/100g, sendo inferior ao parâmetro da legislação, de acordo com a Tabela 6.

Pode-se afirmar que tanto para o G-1, como para o G-2, os tratamentos T-1, T-2 e T-3 não apresentaram variação dos teores de proteína até o final do experimento.

As maiores variações deste componente foram observadas para as amostras do T-4, nos dois grupos de leite, sendo mais acentuada no G-1 diante da impossibilidade de determinação analítica das amostras do G-2, devido a presença de coágulos.

A medida em que aumentou o valor de CBI das amostras, notou-se a redução dos valores de proteína. No G-1 esta redução ocorreu principalmente para as amostras do T-4 incubadas à 6°C e à 9°C a partir do dia 5 e do dia 4, respectivamente. Para o G-2, no tratamento sem a

adição do conservante, a redução da proteína também foi verificada no dia 5 a 9°C, porém as amostras foram comprometidas pela presença de coágulos, e inviabilizadas já a partir do dia 6.

A diminuição do teor de proteína, principalmente para as amostras do tratamento sem a adição do conservante são contrárias aos resultados de Vargas et al. (2014) e Bueno et al. (2008), mas estão em consonância aos achados de Hanus et al. (2008), onde o aumento da contagem bacteriana do leite estaria associado à redução da fração de caseína, por produção de proteases extracelulares pelos microrganismos psicrotróficos, contribuindo de maneira significativa para a degradação das proteínas.

Também é relevante afirmar que a variação da proteína do leite está relacionada à dieta fornecida ao rebanho e que quando comparada à variação com o teor de gordura, a primeira é inferior pelo mesmo motivo (PEIXOTO et al., 2016).

Para Silva et al. (2012), há maior correlação da proteína com a contagem de células somáticas do que com a contagem bacteriana do leite, porém, assim como a contagem bacteriana o número de células somáticas também predispõe menores teores de lactose, sendo que este componente não é alterado por fatores nutricionais, seus níveis estão diretamente ligados com a função osmótica, a glândula mamária e a produção de leite (FREITAS et al., 2017).

Diante dos valores médios de lactose organizados na Tabela 7, o mesmo desempenho examinado nos tratamentos T-1, T-2 e T-3 do componente anterior também podem ser observados para a lactose, que não demonstrou alterações nos valores até o término das análises, tanto para o G-1 como para o G-2.

Da mesma forma, a diminuição dos valores de lactose ocorreu no T-4, em decorrência do aumento do valor de CBI ocasionado pelo aumento da temperatura de incubação, e, por conseguinte, reduzindo o teor do componente.

Esta condição foi notória no G-1 e no G-2, sendo que a lactose foi reduzida no G-1 a partir do dia 5 para as amostras incubadas à 3°C e 6°C e a partir do dia 4 para as amostras incubadas à 9°C. A maior oscilação entre os resultados de lactose para o grupo 1 foi observada no T-4 sob temperatura de incubação de 9°C, tendo como valor mínimo de 4,42 g/100g e valor máximo de 4,54 g/100g.

No G-2, considerando a elevada contagem bacteriana do leite deste grupo, a diminuição dos valores se deu no dia 3 para as amostras incubadas à 3°C e 6°C e no dia 2 para as amostras incubadas à 9°C. Para o grupo 2, ocorreu também no lote de amostras incubadas à 9°C a oscilação mais relevante deste parâmetro, apresentando 4,10 g/100g como valor mínimo e 4,46 g/100g como valor máximo; comprovando que conforme ocorre o aumento da temperatura de

incubação, seguido do aumento da contagem bacteriana, em contrapartida há o declínio do teor de lactose, corroborando com o descrito por Vargas et al. (2014) e Bueno et al. (2008), haja visto que a redução do teor de lactose se dá especialmente pela ação direta de patógenos que utilizam este carboidrato como principal substrato, através da fermentação da lactose, produzindo ácido láctico e conseqüentemente acidificando o leite.

A variação dos resultados médios do teor de sólidos totais do G-1 e G-2 pode ser visualizada na Tabela 8, e são conferidas principalmente pelas variações do teor de gordura, uma vez que os sólidos totais compreendem todos os componentes do leite (gorduras, proteínas, lactose e sais), exceto a água.

Desta forma, observamos para os sólidos totais do G-1 o mesmo comportamento já discutido acima para o componente gordura, conforme o grupo do leite *in natura* do qual foi originado, com aumento dos valores entre os dias 4 e 5, seguidos de redução progressiva entre os dias 6 e 9 para todos os tratamentos considerando todas as temperaturas de incubação. Como no G-2 as amostras foram analisadas somente até o dia 5, pode-se avaliar redução do teor a partir desta data para as amostras do T-4 incubadas à 6°C e 9°C.

Assim como os resultados de proteína e de lactose, os valores do extrato seco desengordurado de ambos os grupos de leite também não mostraram relevantes alterações no decorrer do experimento para os tratamentos adicionados de conservantes: T-1, T-2 e T-3.

Cabe ressaltar que o valor mínimo determinado como referência para o parâmetro é de 8,4 g/100g e, de tal modo, na Tabela 9 notamos maior incidência de resultados abaixo deste valor para o leite do G-2, com elevada carga bacteriana.

Para o G-1, observamos apenas a média das amostras do T-4 incubadas à 9°C com valor inferior ao parâmetro de referência. No entanto, para o G-2, resultados inferiores ao da legislação foram obtidos tanto nos tratamentos utilizando conservantes quanto no tratamento sem a adição do mesmo.

A diminuição dos valores deste componente foi semelhante ao observado para o teor de lactose, reduzindo o parâmetro devido a elevada contagem bacteriana, especialmente em virtude do aumento da temperatura de incubação, visto com mais clareza nas amostras do T-4 dos dois grupos de leite. Comportamento este confirmado por Vargas et al. (2014), em que a diminuição do extrato seco desengordurado à medida que se eleva a contagem bacteriana, provavelmente deve-se a este estar associado ao comportamento encontrado para a lactose.

Ante o exposto, considerando o que foi apresentado para os parâmetros de proteína, lactose e extrato seco desengordurado, pode-se afirmar que a utilização do conservante bacteriostático em todas as concentrações testadas neste experimento foi eficiente na

conservação das amostras, impedindo a degradação das mesmas pela ação de microrganismos, bem como pela temperatura e tempo prolongados de incubação. Porém, em virtude das alterações dos valores principalmente para os teores de gordura e de sólidos totais, reiteramos a importância da utilização do conservante apropriado para a determinação do ensaio nos laboratórios da RBQL, uma vez que os parâmetros da composição centesimal do leite são obtidos a partir da mesma amostra.

## 4.2 ANÁLISE DA CONTAGEM BACTERIANA DO LEITE

A contagem bacteriana reflete a condição higiênica de obtenção do leite na fazenda. O leite pode ser contaminado por microrganismos provenientes da microbiota presente no ambiente, de falhas no manejo de ordenha, da água e do úbere. Os principais grupos de bactérias que podem influenciar a qualidade do leite são as psicotróficas – que podem crescer em baixas temperaturas, geralmente provenientes das sujidades presentes nos animais e nos equipamentos; as termófilas – responsáveis pela degradação proteolítica do leite e as termodúricas – que são resistentes à pasteurização, e estão ligadas à sanitização imprópria dos equipamentos, e que provocam deterioração do leite pasteurizado (SAMPAIO et al., 2015).

Atualmente, de acordo com norma técnica interna da RBQL, são consideradas aptas para as análises eletrônicas as amostras de leite cru refrigerado que chegam ao laboratório com conservante adequado e com temperatura máxima de 10°C. As amostras são mantidas em refrigeração no laboratório até o momento da análise (ALMEIDA, et al., 2016).

Segundo Damasio (2012), dentre as substâncias para a conservação de amostras de leite, a Federação Internacional de Laticínios (*International Dairy Federation*) reconhece apenas as seguintes: ácido bórico, dicromato de potássio, bronopol e a azida sódica. Esta última, em mecanismo com ação conjunta do cloranfenicol, inibe a síntese protéica, e tem ação bacteriostática efetiva, o que possibilita a conservação do leite por tempo prolongado.

Diante a escassez de informações na literatura, acerca de testes com diferentes concentrações das substâncias que compõe o conservante das amostras para a determinação eletrônica da contagem bacteriana, este experimento se propôs a avaliar diferentes doses.

Nas tabelas abaixo podem ser observadas as médias com seu respectivo desvio padrão seguidas das letras representativas da comparação dos resultados para cada grupo de leite, sendo: leite do grupo 1 (Tabela 10) e leite do grupo 2 (Tabela 11).

Tabela 10 - Média e desvio padrão dos resultados de contagem bacteriana individual ( $\log_{10}$ CBI/mL) do G-1

Tpo	9°C															
	3°C							6°C								
	T-1	T-2	T-3	T-4	T-1	T-2	T-3	T-4	T-1	T-2	T-3	T-4	T-1	T-2	T-3	T-4
0	4,68±0,06aA	4,79±0,04aB	4,71±0,05aAB	4,78±0,05aB	4,69±0,05aA	4,72±0,05aA	4,75±0,08aA	4,88±0,09aB	4,72±0,07aA	4,71±0,06aA	4,75±0,08aA	4,74±0,04aA	4,72±0,07aA	4,71±0,06aA	4,75±0,08aA	4,74±0,04aA
1	4,84±0,04bA	4,90±0,06bA	4,91±0,07bA	4,84±0,19abA	4,83±0,05bA	4,87±0,05bA	4,87±0,05bA	4,88±0,05aA	4,80±0,05abA	4,83±0,07bA	4,83±0,05bA	4,85±0,04bA	4,80±0,05abA	4,83±0,07bA	4,85±0,04bA	4,85±0,04bA
2	4,80±0,06bA	4,92±0,05bB	4,92±0,04bB	4,87±0,07abAB	4,79±0,05bA	4,87±0,05bB	4,89±0,06bB	4,91±0,07aB	4,81±0,05abA	4,84±0,04bA	4,89±0,06bB	4,85±0,06bA	4,81±0,05abA	4,84±0,04bA	4,85±0,06bA	4,85±0,06bA
3	4,84±0,09bA	4,91±0,06bAB	4,97±0,15bB	4,97±0,17bB	4,81±0,05bA	4,91±0,05bA	4,85±0,06bA	6,46±0,06bB	4,81±0,06abA	4,86±0,05bA	4,85±0,06bA	4,83±0,07bA	4,81±0,06abA	4,86±0,05bA	4,83±0,07bA	6,94±0,04cB
4	4,79±0,05bA	4,88±0,06bA	4,87±0,05bA	5,25±0,09cB	4,80±0,07bA	4,82±0,03bA	4,85±0,12bA	7,00±0,07bB	4,91±0,09bA	4,82±0,06bAB	4,85±0,12bA	4,80±0,05abB	4,91±0,09bA	4,82±0,06bAB	4,80±0,05abB	7,24±0,04cC
5	4,90±0,07bA	4,99±0,03cB	4,98±0,04bB	6,06±0,04cC	4,94±0,03cA	4,95±0,04cA	4,91±0,06bA	7,21±0,02bB	4,96±0,03cA	4,98±0,05cA	4,91±0,06bA	4,95±0,04cA	4,96±0,03cA	4,98±0,05cA	4,95±0,04cA	7,35±0,01cB
6	4,88±0,05bA	4,96±0,05bB	4,99±0,06bB	6,74±0,09cC	4,93±0,04cA	4,96±0,04cA	4,92±0,04bA	7,28±0,04bB	4,98±0,06cA	4,97±0,06cA	4,92±0,04bA	7,46±0,03cB	4,98±0,06cA	4,97±0,06cA	5,00±0,08cA	7,46±0,03cB
7	4,93±0,05cA	5,05±0,07cA	4,97±0,04bA	7,02±0,04cB	4,94±0,05cA	4,96±0,08cA	4,91±0,05bA	7,39±0,01bB	4,92±0,28bA	5,05±0,06cA	4,91±0,05bA	7,47±0,01cB	4,92±0,28bA	5,05±0,06cA	4,96±0,09cA	7,47±0,01cB
8	4,89±0,05bA	5,06±0,08cB	4,96±0,05bA	7,18±0,04cC	4,97±0,06cA	5,00±0,07cA	4,96±0,04bA	7,45±0,01bB	5,00±0,04cA	5,04±0,07cA	4,96±0,04bA	7,50±0,01cB	5,00±0,04cA	5,04±0,07cA	4,99±0,08cA	7,50±0,01cB
9	4,95±0,09cA	5,00±0,05cA	4,99±0,05bA	NR	4,96±0,03cA	4,97±0,06cA	4,98±0,03cA	NR	4,97±0,02cA	4,99±0,03cA	4,98±0,03cA	NR	4,97±0,02cA	4,99±0,03cA	4,97±0,05cA	NR
10	4,93±0,04cA	4,99±0,03cAB	4,99±0,04bB	NR	4,88±0,04bA	4,92±0,06bA	4,88±0,07bA	NR	4,89±0,03bA	4,88±0,05bA	4,88±0,07bA	NR	4,89±0,03bA	4,88±0,05bA	4,86±0,05bA	NR
11	4,84±0,08bA	4,92±0,04bB	4,89±0,05bAB	NR	4,85±0,04bA	4,84±0,05bA	4,79±0,06abA	NR	4,88±0,05bA	4,89±0,03bA	4,79±0,06abA	NR	4,88±0,05bA	4,89±0,03bA	4,91±0,05bA	NR
12	4,81±0,06bA	4,90±0,05bB	4,88±0,04bB	NR	4,76±0,05cA	4,81±0,05bA	4,79±0,04aA	NR	4,84±0,06abA	4,83±0,04bA	4,79±0,04aA	NR	4,84±0,06abA	4,83±0,04bA	4,79±0,04abA	NR
13	4,72±0,07aA	4,78±0,07aAB	4,82±0,04cB	NR	4,82±0,04bA	4,85±0,05bA	4,81±0,05abA	NR	4,82±0,04abA	4,80±0,03bA	4,81±0,05abA	NR	4,82±0,04abA	4,80±0,03bA	4,81±0,04abA	NR
14	4,77±0,03bA	8,87±0,05bB	4,85±0,04bB	NR	4,76±0,05cA	4,78±0,05aA	4,82±0,07abA	NR	4,77±0,04abA	4,81±0,04bA	4,82±0,07abA	NR	4,77±0,04abA	4,81±0,04bA	4,79±0,07abA	NR

## Legendas:

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ );

Resultados de CBI transformados em Log<sub>10</sub>;

T°: Temperatura de incubação; Tpo: Tempo de armazenamento; NR: Ensaio não realizado.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Tabela 11 - Média e desvio padrão dos resultados de contagem bacteriana individual ( $\log_{10}$ CBI/mL) do G-2

Tpo	6°C											
	T-1	T-2	T-3	T-4	T-1	T-2	T-3	T-4	T-1	T-2	T-3	T-4
0	6,65±0,03aA	6,63±0,02aAB	6,61±0,01aB	6,71±0,01aC	6,64±0,01aA	6,63±0,01aA	6,62±0,02aA	6,74±0,01aB	6,64±0,01aA	6,66±0,04aAB	6,63±0,01aA	6,79±0,01aC
1	6,49±0,02bA	6,49±0,04bA	6,47±0,02bA	7,06±0,02bB	6,52±0,02bA	6,49±0,01bAB	6,47±0,01bB	7,27±0,02bC	6,52±0,01bA	6,48±0,02bB	6,46±0,03bB	7,32±0,03bC
2	6,51±0,01bA	6,49±0,03bA	6,48±0,03bA	7,33±0,04cB	6,53±0,01bA	6,48±0,01bB	6,45±0,01bB	7,40±0,02cC	6,51±0,01bA	6,46±0,02bB	6,45±0,04bB	7,44±0,01cC
3	6,52±0,02bA	6,48±0,02bB	6,46±0,01bB	7,41±0,01cC	6,50±0,01bA	6,46±0,01bB	6,45±0,02bB	7,44±0,02cC	6,48±0,02cA	6,44±0,03cB	6,40±0,02cC	7,48±0,01cD
4	6,51±0,03bA	6,46±0,01bB	6,43±0,01bC	7,46±0,01cD	6,47±0,01cA	6,43±0,04cB	6,39±0,01cC	7,49±0,01cD	6,45±0,01cA	6,43±0,02cB	6,39±0,02cC	7,49±0,01cD
5	6,48±0,01bA	6,40±0,01cB	6,39±0,03cB	7,49±0,01cC	6,44±0,02cA	6,38±0,02cB	6,35±0,01cC	7,50±0,00cD	6,42±0,01cA	6,38±0,03cB	6,32±0,03cC	7,52±0,00cD
6	6,45±0,02cA	6,39±0,01cB	6,36±0,03cC	7,50±0,02cD	6,42±0,02cA	6,36±0,02cB	6,30±0,02cC	7,51±0,00cD	6,41±0,02cA	6,37±0,02cB	6,24±0,02cC	7,52±0,00cD
7	6,45±0,01cA	6,36±0,03cB	6,34±0,04cB	7,48±0,01cC	6,43±0,03cA	6,33±0,02cB	6,29±0,01cC	7,50±0,00cD	6,42±0,02cA	6,33±0,04cB	6,28±0,03cC	7,51±0,00cD
8	6,40±0,04cA	6,35±0,03cB	6,33±0,02cB	7,50±0,00cC	6,40±0,02cA	6,32±0,05cB	6,29±0,06cB	7,50±0,00cC	6,39±0,02cA	6,25±0,02cB	6,25±0,04cB	7,51±0,00cD
9	6,35±0,03cA	6,33±0,03cA	6,30±0,03cA	7,49±0,00cB	6,36±0,02cA	6,28±0,06cB	6,25±0,02cB	7,50±0,00cC	6,37±0,04cA	6,25±0,05cB	6,31±0,06cC	7,51±0,01cD
10	6,35±0,04cA	6,25±0,03cB	6,27±0,02cB	7,49±0,01cC	6,40±0,01cA	6,28±0,02cB	6,27±0,12cB	7,50±0,00cC	6,36±0,03cA	6,33±0,07cA	6,21±0,06cB	7,51±0,00cC
11	6,43±0,04cA	6,33±0,05cB	6,28±0,02cB	NR	6,42±0,02cA	6,33±0,06cB	6,24±0,03cC	NR	6,39±0,05cA	6,29±0,02cB	6,25±0,05cB	NR
12	6,48±0,01bA	6,40±0,02cB	6,42±0,03cB	NR	6,46±0,01cA	6,41±0,01cB	6,38±0,03cC	NR	6,42±0,02cA	6,40±0,02cA	6,37±0,01cB	NR
13	6,47±0,01bA	6,42±0,03cB	6,39±0,03cC	NR	6,45±0,01cA	6,41±0,02cB	6,40±0,02cB	NR	6,45±0,01cA	6,42±0,04cB	6,40±0,01cB	NR
14	6,45±0,03bA	6,29±0,05cB	6,30±0,06cB	NR	6,48±0,02cA	6,40±0,05cB	6,37±0,05cB	NR	6,47±0,02cA	6,39±0,02cB	6,37±0,03cB	NR

## Legendas:

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ );

Resultados de CBI transformados em Log<sub>10</sub>;

T°: Temperatura de incubação; Tpo: Tempo de armazenamento; NR: Ensaio não realizado.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).



Confrontando o tempo zero com os demais resultados dentro do mesmo tratamento e temperatura, é possível observar na Tabela 10 – leite em acordo com os padrões da normativa, que a diferença significativa dos resultados prevalece entre as comparações.

Observamos que para as amostras do G-1 nos tratamentos adicionados de conservante houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre as médias do dia zero para os demais tempos de incubação já no dia 1.

Para o leite em desacordo com os padrões da normativa, analisamos na Tabela 11 que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tempo zero e os demais resultados em todos os tratamentos sob todas as temperaturas de incubação, reiterando que contagens bacterianas elevadas apresentam uma maior variabilidade entre os resultados, principalmente pelo fato de que alguns microrganismos podem dobrar sua população a cada 20 ou 30 minutos (GUERREIRO et al., 2005) e, desta forma, a taxa de multiplicação dos microrganismos está relacionada à contaminação inicial do leite (RECHE et al., 2015).

Em leite cru de boa qualidade, com baixas contagens bacterianas, a microbiota predominante é composta por bactérias Gram-positivo (SUHREN; REICHMUTH, 2000).

A sensibilidade dos grupos microbianos ao azidiol é muito diferente. Os coliformes e *Staphylococcus aureus* são mais sensíveis ao efeito da azida sódica do que as bactérias mesófilas, *Enterococcus* e *Lactobacillus*. Enquanto que *Enterococcus* é mais resistente ao cloranfenicol do que *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus* (ELIZONDO et al., 2005).

Comparando o tempo um aos demais tempos sob o mesmo tratamento e temperatura, para o G-1 temos um desempenho próximo para o T-1 (concentração usual) e T-2 (concentração dupla), considerando as três temperaturas de incubação, onde ambos tratamentos demonstraram resultados bastante próximos ao longo do experimento, confirmando os testes realizados por Elizondo et al. (2005), que ao avaliar diferentes doses do azidiol líquido para a conservação de amostras não encontrou diferença entre a proporção usual do conservante e a meia dose deste.

Sob 3°C, os resultados do T-1 comparados ao tempo um, não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) até o dia 6, enquanto que os resultados do T-2 para a mesma comparação não divergiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) até o dia 4. Para as amostras de ambos os tratamentos incubadas à 6°C e 9°C, até o dia 4 não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Desta forma, constatamos que as amostras de leite cru do T-1 podem ser analisadas até o sexto dia, quando mantidas em refrigeração, com temperatura de incubação em torno de 3°C, sem alterações nos resultados. Tempo de conservação próximo do que foi determinado por Cassoli et al. (2010) e Cassoli (2005) – sob temperatura de até 7°C, Souza et al. (2006) – entre

3,8°C e 10°C e Zeni (2014) – à 10°C para acondicionamento de leite de cabra, considerando que até o sétimo dia os resultados das contagens bacterianas não são afetados, mantendo-se analiticamente viáveis.

O tempo de conservação encontrado neste estudo foi superior ao relatado por Seskena; Jankevica (2007), Gonzalo et al. (2003) e Ninane et al. (2000), que sugerem que as amostras sejam analisadas até o quarto dia após a coleta, se mantidas sob refrigeração à 4°C. Todavia, concordamos com a afirmação destes, já que em temperatura de 6°C e 9°C a viabilidade das amostras foi reduzida para 4 dias, tanto para o conservante com dose usual, como para o conservante onde a dose dos componentes foi duplicada. Ao mesmo tempo, o período de conservação determinado neste, foi inferior ao de Martins (2005) – em temperatura de 4°C, Leite (2006) – em temperatura de 4°C à 10°C e de Almeida et al. (2016) – em temperatura de 17°C, quando defendem a conservação das amostras por até dez dias; este último, ainda propõe que até 11°C, as amostras podem ser analisadas por até 16 dias de armazenamento.

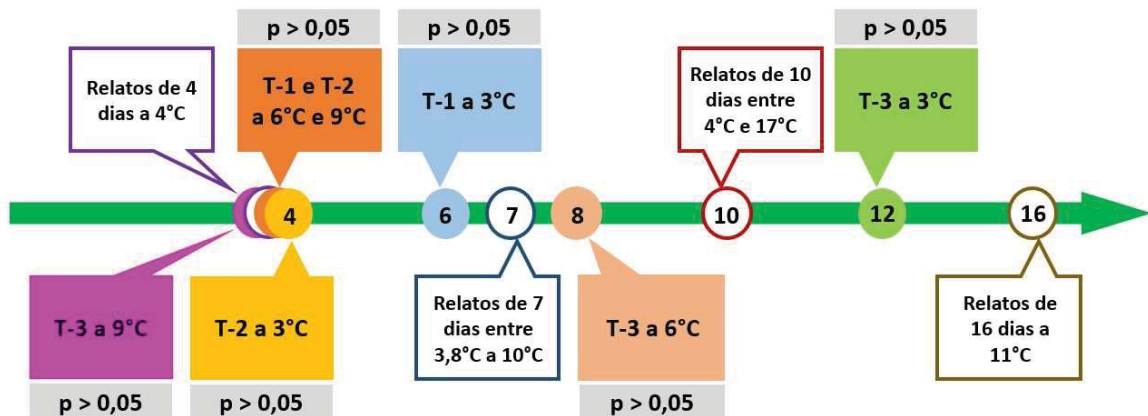
Para o T-3, foi evidenciada a melhor condição de conservação das amostras deste grupo de leite, possibilitando a análise até o décimo segundo dia quando as amostras estiverem em temperatura de incubação de 3°C, sem alteração estatística significativa ( $p > 0,05$ ) dos resultados; e até o oitavo dia quando incubadas em 6°C.

Em temperatura de incubação de 9°C, as amostras do T-3 foram mantidas sem alteração significativa ( $p > 0,05$ ) dos resultados até o quarto dia, e de tal modo, reiteramos a importância do acondicionamento das amostras sob baixas temperaturas mesmo utilizando o conservante, possibilitando longevidade analítica bem como impedindo a deterioração das mesmas pela ação de microrganismos.

Desta forma, pode-se afirmar que a concentração tripla de azida sódica e cloranfenicol demonstrou eficácia superior na manutenção das amostras quando comparado aos demais tratamentos testados, com concentração usual do produto e com concentração dupla, haja visto que os comprovados efeitos bacteriostáticos do azidiol ocorrem principalmente por estas duas substâncias que compõe a pastilha, a azida sódica como agente bacteriostático e o cloranfenicol como antibiótico.

A Figura 12 contempla a viabilidade analítica das amostras de leite *in natura* do grupo 1, para os tratamentos T-1, T-2 e T-3, para todas as temperaturas de incubação, bem como os situa junto aos demais relatos bibliográficos.

Figura 12 - Viabilidade analítica das amostras do G-1, para os tratamentos T-1, T-2 e T-3



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

As médias obtidas para o T-3 a 3°C comprovam os relatos de Cassoli (2005), onde afirma que a utilização do conservante bacteriostático reduz a atividade metabólica das bactérias garantindo maior vida útil às amostras.

Entendemos que, de certa forma, o desempenho do conservante com dose tripla foi favorecido pelo leite *in natura* com baixa contagem bacteriana que originou as amostras do G-1, resultados que corroboram aos de Zeni (2014), quando afirma que a baixa carga bacteriana inicial e a baixa temperatura de armazenamento são a melhor combinação para a manutenção da qualidade microbiológica do leite.

No entanto, acreditamos também que, especialmente pelas quantidades do agente bacteriostático e do antimicrobiano presentes na pastilha, a determinação de um efeito bactericida do conservante na dose tripla requer novos experimentos, podendo utilizar a citometria de fluxo, mas esta deve ser combinada com diferentes corantes possibilitando a diferenciação e quantificação de microrganismos viáveis e inviáveis presentes na amostra.

Almeida et al. (2016) e Leite (2006) acreditam que o tempo prolongado para análise tem grande importância em situações excepcionais, em que eventualmente ocorrem problemas que prejudicam a temperatura e o tempo estabelecidos para se efetuar as análises, onde não é possível analisar as amostras em até sete dias, gerando dificuldade na logística tanto para as indústrias de laticínios como para os laboratórios. No caso das indústrias, são obrigadas a fazer uma nova coleta, originando custos e dificuldades operacionais. Para os laboratórios, no caso de falha nos equipamentos, possibilitaria analisar as amostras por um período um pouco maior, sem comprometer a confiabilidade dos resultados das mesmas.

Esta condição do conservante seria uma alternativa favorável para a cadeia produtiva como um todo, mesmo com valor maior do que a pastilha com concentração usual, que custa em média R\$ 0,11 centavos de real, aproximadamente US\$ 0,034 centavos de dólar; por apresentar dois componentes com dosagem triplicada, seu custo seria de aproximadamente R\$ 0,33 centavos de real, ou seja, US\$ 0,102 centavos de dólar, de acordo com a cotação diária de R\$ 3,2563 reais para variação comercial da moeda segundo portal Dólar Hoje (2018). No entanto, sua viabilidade econômica deve ser analisada, levando-se em consideração não somente a possibilidade de prolongar o tempo de vida útil analítica das amostras, mas também proporcionando segurança ao ensaio, pela conservação das amostras a serem analisadas nos laboratórios da RBQL.

Avaliando os dados do T-4, em que a pastilha de conservante não foi adicionada, asseguramos que a conservação das amostras para a determinação da contagem bacteriana só é possível com a utilização do conservante bacteriostático. O acondicionamento, mesmo que sob baixas temperaturas, não é suficiente para impedir o aumento da contagem por longos períodos de incubação, resultando na deterioração das amostras. Tal fato pode ser confirmado a partir do aumento das temperaturas, enquanto que em 3°C a amostra manteve-se viável por três dias, em 6°C a viabilidade foi reduzida para 2 dias, e com 9°C o resultado apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) já a partir das primeiras 24 horas de incubação.

Cabe ainda ressaltar, que o limite da normativa vigente no Brasil para CPP de  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL (300.000 UFC/mL), corresponde a aproximadamente 824.000 CBI/mL, valor expresso como 5,91  $\log_{10}$ . Assim, caso a análise da contagem bacteriana fosse realizada após os tempos mencionados, este leite seria considerado insatisfatório no que tange o parâmetro para CPP, uma vez que após este período a contagem bacteriana excede os limites da norma, o que acarretaria em prejuízos econômicos ao produtor, que deixaria de receber a bonificação pelo produto nos programas de pagamento pela qualidade do leite implementados pelas agroindústrias.

Em alguns países, apenas a refrigeração é responsável pela preservação das amostras, não sendo utilizados conservantes. Nestes casos, a distância entre as fazendas e os laboratórios são curtas, possibilitando a análise em no máximo 48 horas após a coleta. No caso do Brasil, considerando sua extensão territorial e o número de produtores, a análise dentro deste prazo é praticamente impossível (CASSOLI, 2005).

Zeni (2014) referenciando Fonseca et al. (2006), descreve que a partir de estudos deste, foram identificadas a variação da contagem de mesófilos e psicrotróficos, de acordo com a temperatura e o tempo de armazenamento. Foi observado que a temperatura de armazenagem

do leite cru à 4°C manteve a população de microrganismos mesófilos dentro dos limites da legislação até o terceiro dia de armazenamento, enquanto que à 10°C pelo mesmo período de armazenamento este limite já havia sido ultrapassado. Os microrganismos psicrótróficos, diferente com o que ocorreu com a população dos mesófilos, tiveram taxa de crescimento semelhante em ambas as temperaturas, e atingiram contagens próximas nas duas temperaturas de estocagem após 6 dias. Desta forma, provando a importância da temperatura e alertando para o tempo de armazenamento do leite na contagem bacteriana.

Para o G-2, em que as amostras foram originadas a partir de leite com contagem bacteriana elevada, a vida útil analítica das amostras foi reduzida consideravelmente. Relatos de Castro (2007) e Suhren; Reichmuth (2000), em leite com altas contagens, o número de bactérias Gram-negativo aumenta, o que vem de encontro também aos achados de Arcuri et al. (2008) e Pinto et al. (2006) acerca do predomínio (entre 80 à 90%) da população bacteriana do leite ser composta de Gram-negativos (SAMARZIJA et al., 2012), sendo que o gênero *Pseudomonas* spp. representam de 50 à 70% deste grupo (MURPHY et al., 2016), multiplicando-se em uma ampla faixa de temperatura, de 4°C a 30°C (VITHANAGE et al., 2016).

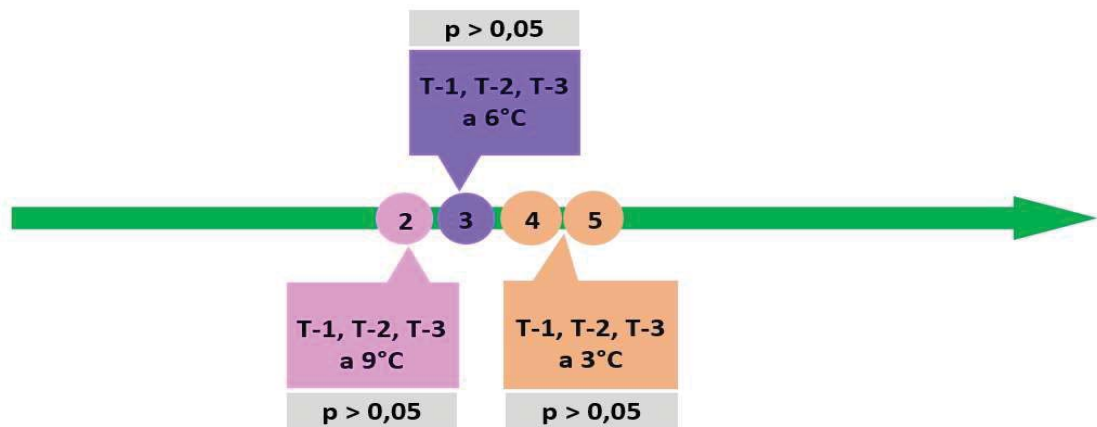
A temperatura foi o fator determinante para a manutenção, haja visto que as amostras do G-2, dos tratamentos T-1, T-2 e T-3 incubadas à 3°C apresentaram-se viáveis entre 4 e 5 dias, com 6°C e com 9°C a viabilidade das amostras foi encurtada para 3 e 2 dias respectivamente, em consonância aos resultados de Martins (2005) e Martins et al. (2009), onde o efeito bacteriostático do azidiol foi influenciado pela temperatura de estocagem da amostra de leite cru. Assim, a eficiência deste como conservante ficou condicionada à temperatura de armazenamento. Entretanto, contrários aos achados de Almeida et al. (2016) e Souza et al. (2006), não verificando diferença entre temperaturas de armazenamento de 3°C à 11°C e de 3,8°C à 10°C, respectivamente.

Para incubação à 3°C, o T-1 consistiu no tratamento que permitiu o maior tempo de incubação sem alteração ( $p > 0,05$ ) do resultado deste grupo de leite.

Desta maneira, reiteramos que para o leite com carga bacteriana inicial elevada, evidenciamos a redução da viabilidade analítica, mesmo associando a utilização do conservante à refrigeração sob baixas temperaturas, quando o comparamos com o mesmo produto perante as mesmas condições, porém com carga microbiana reduzida.

A viabilidade analítica das amostras do leite *in natura* do grupo 2, para o T-1, T-2 e T-3 podem ser observadas na Figura 13.

Figura 13 - Viabilidade analítica das amostras do G-2, para os tratamentos T-1, T-2 e T-3



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Assim como no grupo anterior, para o G-2 foi possível verificar a conservação das amostras por tempo ainda menor para o T-4, em virtude da alta contagem bacteriana inicial do leite deste grupo, já que em todas as temperaturas testadas, as amostras desse tratamento apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) dos resultados logo nas primeiras 24 horas de incubação, destacando sobretudo a importância da utilização do conservante.

Na Tabela 10 também pode-se constatar o comparativo dos tratamentos dentro do mesmo tempo e temperatura, a partir da comparação horizontal para o leite do grupo 1.

As médias das amostras incubadas à 3°C exibiram maior variação ( $p < 0,05$ ) dos resultados entre os tratamentos testados, enquanto que para o lote incubado à 6°C, a comparação entre os tratamentos T-1, T-2 e T-3 foi diferente significativamente ( $p < 0,05$ ) apenas no dia 2.

No lote incubado à 9°C, nos resultados do dia 4, o T-1 não difere ( $p > 0,05$ ) do T-2, mas difere ( $p < 0,05$ ) do T-3, já o T-2 e T-3 não apresentam diferença ( $p > 0,05$ ) entre si.

Na Tabela 11, para o grupo 2, as amostras à 3°C e 6°C dos tratamentos T-1, T-2 e T-3 também foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos tempos de incubação.

Para o dia zero das amostras incubadas à 9°C, os resultados não foram discrepantes ( $p > 0,05$ ) quando confrontados com o T-1, estando igual ao T-2 e T-3, mas os dois últimos tratamentos apresentando diferença ( $p < 0,05$ ) entre si.

Tanto para o G-1 como para o G-2, o tratamento 4 foi em sua grande maioria, diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) na comparação horizontal dos demais tratamentos para as três temperaturas testadas em cada grupo de leite.

Para os dois grupos de leite, à medida em que as contagens das amostras do T-4 aumentaram, os resultados foram obtidos por estimativa, uma vez que extrapolaram os limites máximos confiáveis de medição instrumental determinados pelo fabricante do equipamento, que é de  $9,9 \times 10^6$  UFC/mL.

Para as amostras deste mesmo tratamento, notamos a formação de coágulos e gás nos frascos, com odor fétido, que segundo Salomão (2012), em função do número e do tipo de microrganismos, alterações indesejáveis são produzidas na aparência e/ou no odor do leite. A presença de gás, pode ser um indicativo de coliformes, bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, que fermentam a lactose com a produção de ácido e gás, os coliformes diminuem a qualidade e a vida de prateleira do leite e dos derivados, devido à acidificação e à atividade proteolítica e lipolítica. Os coliformes são considerados como um dos principais grupos de microrganismos indicadores da qualidade do leite (ROSA, 2012).

Segundo Leite (2006), a ocorrência de coágulo nas amostras pode estar associada com a qualidade microbiológica inicial das mesmas, o que não foi confirmado por este experimento, já que tanto para o leite com baixa contagem bacteriana, como para o leite com contagem elevada verificamos a presença de coágulos, e por este motivo as amostras foram descartadas antes do término do período de incubação.

Não existe associação entre as variáveis para os tratamentos T-1, T-2 e T-3 do G-1 nas três temperaturas de incubação, uma vez que a análise de probabilidade do teste (p-valor) exhibe resultado de  $p > 0,05$  de acordo com a Tabela 12.

Tabela 12 - Correlação entre variáveis para o T-1, T-2 e T-3 do G-1

	T-1			T-2			T-3		
	3°C	6°C	9°C	3°C	6°C	9°C	3°C	6°C	9°C
p-valor	0,2800	0,0930	0,1270	0,5590	0,7290	0,1180	0,6030	0,2880	0,4650
R	+0,0810	+0,1260	+0,1140	+0,0440	+0,0260	+0,1170	+0,0390	-0,0800	+0,0550

Legendas:

Nível de significância do p-valor: 5%;

Varição do r: -1 à +1.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

As variáveis apresentaram o mesmo comportamento, exceto para as amostras do T-3 incubadas à 6°C, em que as variáveis apresentaram comportamentos opostos, entretanto o valor do coeficiente de correlação (r) apresentou valor próximo de zero, e por este motivo foi desconsiderado.

Para os mesmos tratamentos do G-2 nas três temperaturas de incubação, existe associação entre as variáveis, com valor de  $p \leq 0,05$  conforme a Tabela 13.

Tabela 13 - Correlação entre variáveis para o T-1, T-2 e T-3 do G-2

	T-1			T-2			T-3		
	3°C	6°C	9°C	3°C	6°C	9°C	3°C	6°C	9°C
p-valor	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
R	-0,5820	-0,5880	-0,6020	-0,7360	-0,5950	-0,5730	-0,7220	-0,5720	-0,5230

Legendas:

Nível de significância do p-valor: 5%;

Variação do r: -1 à +1.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Observamos para as variáveis do G-2 comportamentos opostos, ou seja, a medida em que o tempo aumentou, o valor da contagem bacteriana das amostras foi reduzido, de igual forma aos achados de Wentz (2016), que evidenciou para as amostras conservadas com azidiol, independente da temperatura de armazenagem, a redução da contagem bacteriana ao longo do tempo.

Para o G-1 e G-2, existe associação entre as variáveis no tratamento 4, que apresentaram a mesma conduta nas três temperaturas. Aumentando o tempo de incubação, proporcionalmente aumentou também os resultados da contagem bacteriana.

Na Tabela 14 pode-se verificar a correlação do T-4 para ambos os grupos de leite.

Tabela 14 - Correlação entre variáveis para o T-4 do G-1 e G-2

	Grupo 1 – T-4			Grupo 2 – T-4		
	3°C	6°C	9°C	3°C	6°C	9°C
p-valor	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
R	+0,9450	+0,9180	+0,9040	+0,7580	+0,6780	+0,6500

Legendas:

Nível de significância do p-valor: 5%;

Variação do r: -1 à +1.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

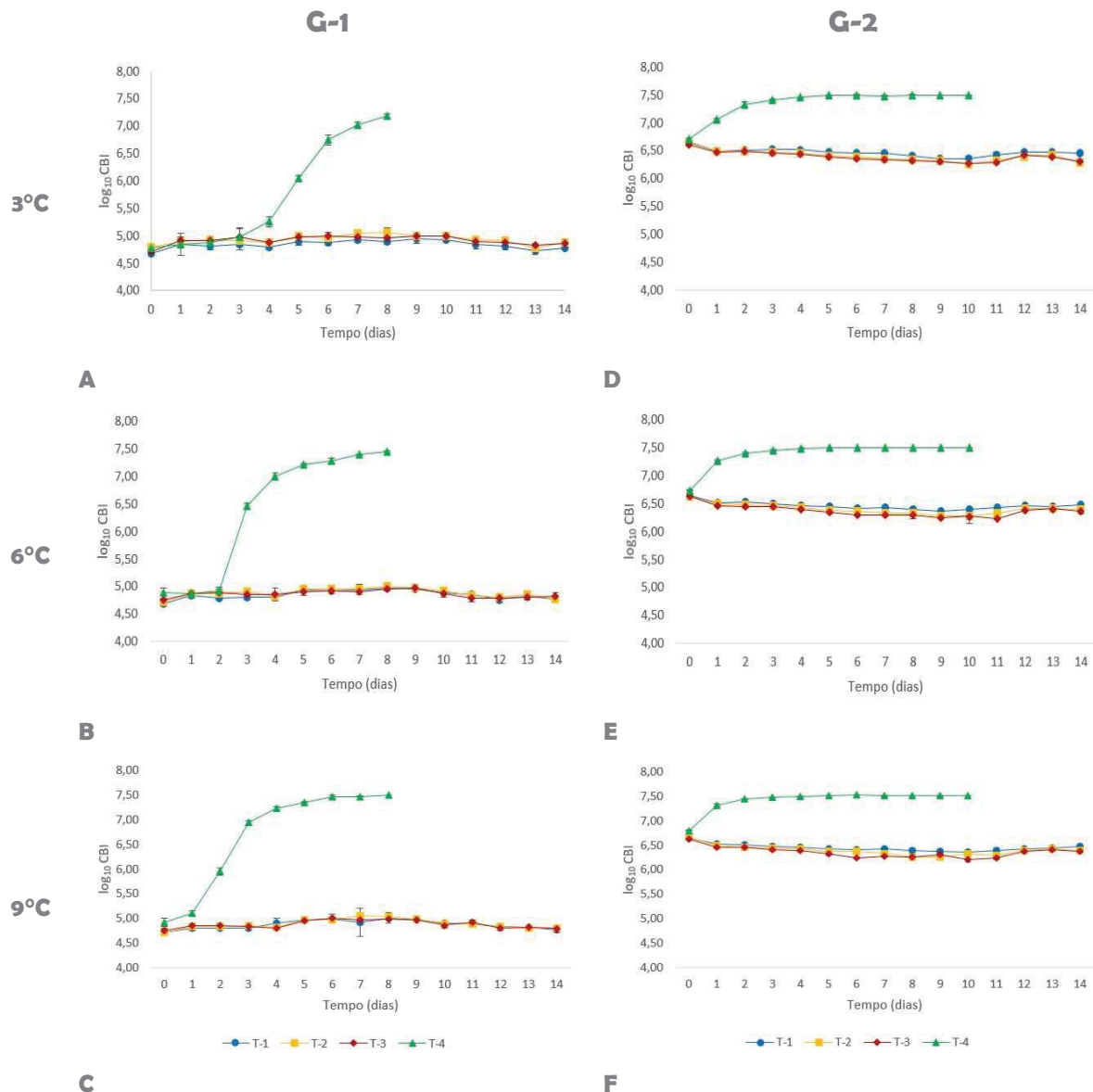
Estes resultados são reforçados pelos achados de Zeni (2014), de que o tempo decorrido entre a coleta e a análise justifica a necessidade da utilização do conservante associado à refrigeração, já que os resultados aumentaram progressivamente no decorrer do período de



incubação, considerando como agravante para este o binômio tempo x temperatura, sendo que a resposta da contagem bacteriana depende da interação destes fatores.

Na Figura 14, conferimos o efeito do tempo de armazenamento e da temperatura de incubação para os tratamentos testados nos grupos de leite G-1 e G-2.

Figura 14 - Efeito do tempo de armazenamento para o T-1, T-2, T-3 e T-4 em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C para ambos os grupos de leite



Legendas:

T-1: Conservante com dose usual; T-2: Conservante com dose dupla; T-3: Conservante com dose tripla e T-4: Sem utilização do conservante.

Em virtude da deterioração das amostras, não foi possível analisar o T-4 por todo o período de incubação.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Na figura acima, os gráficos A, B e C são representativos do G-1, enquanto que os gráficos D, E e F do G-2. Foram avaliados os quatro tratamentos por 14 dias de incubação em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C. Diante do comportamento do tratamento 4, fica ainda mais evidente a necessidade da utilização do conservante nas amostras, independente da temperatura em que as mesmas serão mantidas até o momento do ensaio.

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

O teor de gordura e de sólidos totais apresentou maior variação no leite do G-1, enquanto os teores de proteína, lactose e extrato seco desengordurado foram mais estáveis;

Ocorreu diferença na composição centesimal de acordo com a carga bacteriana do leite, à medida em que aumentou o valor de CBI;

As amostras do T-1, adicionadas de conservante com dose usual de azida sódica e cloranfenicol, apresentaram viabilidade analítica até o quinto ou sexto dia de incubação. O desempenho deste tratamento foi semelhante ao do T-2, com dose dupla dos componentes;

O T-3, com concentração tripla de azida sódica e de cloranfenicol, evidenciou a melhor condição de conservação, possibilitando a análise de contagem bacteriana até o décimo segundo dia, em temperatura de incubação de 3°C, e até o oitavo dia, quando incubadas a 6°C, sem alteração significativa dos resultados. Deste modo, demonstra-se a eficácia superior da concentração tripla dos componentes do conservante na conservação das amostras;

A manutenção das amostras somente foi possível com a utilização do conservante. O acondicionamento sob baixas temperaturas não foi suficiente para impedir o aumento da contagem bacteriana ao longo do período de incubação e, conseqüentemente, a deterioração das amostras;

As variáveis no T-4, sem conservantes, apresentaram associação, independente da temperatura, com a contagem bacteriana aumentando proporcionalmente ao tempo de incubação.

## REFERÊNCIAS

ABLV; EMBRAPA. Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **O Leite na Plataforma**. ABLV/EMBRAPA, 2016.

ALMEIDA, T. V.; NEVES, R. B. S.; ARNHOLD, E.; et al. Effect of temperature and time of storage of raw milk samples on electronic analysis results. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, 2016.

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

ANDRADE, U. V. C.; HARTMAN, W.; MASSON, M. L. Microbiological isolation, somatic cell count and total bacterial count in samples milk. **Ars Veterinária**, v. 25, n. 3, 2009.

APCBRH. Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa. **Utilização de Nova Curva de Conversão para Contagem Bacteriana**. Circular 10-2013/PARLPR, 2013.

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16<sup>th</sup> ed. Washington: APHA, 1992.

ARAÚJO, B. F. O. Qualidade microbiológica e contagem de células somáticas de leite cru de vacas mestiças produzido na Zona da Mata e Agreste do Estado de Alagoas. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo/AL, 2015.

ARCURI, E. F.; et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotólicas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, 2008.

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

BAUR, C.; KREWINKEL, M.; KRANZ, B.; et al. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 49, 2015.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. **BactoCount 150 Operator's Manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução de Serviço. Laboratório Nacional Agropecuário / Divisão Técnica Laboratorial / Laboratório de Referência à RBQL e Controle da Qualidade do Leite. Pedro Leopoldo/MG, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 7 de 04/05/2016. Aprova os Regulamento Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 04 de maio de 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62 de 29/12/2011. Aprova os Regulamento Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 30 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68 de 12/12/2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 14 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51 de 18/09/2002. Aprova os Regulamento 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/DF, 20 de setembro de 2002b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 37 de 18/04/2002. Instituir a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 18 de abril de 2002a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Indústria e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691/1952. SIPA, DILEI, 1980. Brasília/DF, 29 de março de 1952.

BRINQUES, G. B. **Microbiologia dos Alimentos**. Organizadora Graziela Bruschi Brinques. São Paulo/SP: Editora Pearson Education do Brasil, 2015.

BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O Compromisso da Qualidade do Leite no Brasil**. Passo Fundo/RS: UPF Editora, 2004.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, A. N.; et al. Total bacterial count: relationship to milk composition and period of the year in Goiás state, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 1, 2008.

BULLETIN of the International Dairy Federation. Payment Systems for Ex-Farm Milk. **Bulletin of the IDF**, Brussels: International Dairy Federation, n. 403, 2006.

CARDOSO, M. Percepção das empresas de lácteos sobre programas de pagamento por qualidade do leite e evolução dos indicadores de qualidade higiênico-sanitário. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados), Universidade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora/MG, 2012.

CASSOLI, L. D. Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2005.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, 2010.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; RODRIGUES, A. C. O.; et al. Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count. **International Dairy of Technology**, v. 60, n. 1, 2008.

CASTRO, J. F. Azidiol comprimido esterilizado como conservante do leite cru destinado a contagem microbiana por citometria de fluxo. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2007.

CBQL. Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite. Disponível em: <<http://www.cbql.com.br/index.php?id=05>>. Acesso em: 22 set. 2016.

CERQUEIRA, M. M. O. P. Contagem bacteriana de leite: como está e como melhorá-la? **Revista Técnica de Bovinocultura de Leite**, v. 1, n. 2, 2006.

COITINHO, T. B.; CASSOLI, L. D.; CERQUEIRA, P. H. R.; et al. Adulteration identification in raw milk using Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 8, 2017.

DAMASIO, D. S. N. Desenvolvimento de comprimidos de azidiol para uso na conservação do leite. Dissertação (Inovação Biofarmacêutica), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2012.

DÍAS, M.; et al. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, 2010.

DÓLAR HOJE. Disponível em: <<https://www.dolarhoje.net.br/dolar-comercial/>>. Acesso em: 05 fev. 2018.

ELIZONDO, J.; ALDUNATE, A.; EZCURRA, P.; et al. Efficiency of the proportion of azidiol on preservation in ewes's milk samples for analysis. **Food Control**, v. 18, 2005.

FONSECA, C. R.; BORDIN, K.; FERNANDES, A. M.; et al. Storage of refrigerated raw goat milk affecting the quality of whole milk powder. **Journal of Dairy Science**, v. 96, 2013.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle da Mastite**. São Paulo/SP: Editora Lemos, 2000.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. Tradução Andréia Bianchini et al. Revisão Técnica Eduardo César Tondo. 2. ed. Porto Alegre/RS: Editora Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo/SP: Editora Atheneu, 2008.

FREITAS, J. A.; SILVA, J.; GARCEZ NETO, A. F.; et al. Somatic cell count and milk yield ou physicochemical components ok milk from free-stall housed cows. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 2, 2017.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. Organizadores Pedro Manuel Leal Germano e Maria Izabel Simões Germano. 5. ed. Barueri/SP: Editora Manole, 2015.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Sistema de Gestão Qualidade e Segurança dos Alimentos**. Organizadores Pedro Manuel Leal Germano e Maria Izabel Simões Germano. 1. ed. Barueri/SP: Editora Manole, 2013.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O Compromisso da Qualidade do Leite no Brasil**. Passo Fundo/RS: UPF Editora, 2004.

GONZALO, C.; MARTINEZ, J. R.; CARRIEDO, J. A. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factor. **Journal of Dairy Science**, v. 86, 2003.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, 2005.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, v. 16, 2002.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D. A. A flow cytometric method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, 2000.

GUNASEKERA, T. S.; VEAL, D. A.; ATTFIELD, P. V. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analysis of milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, 2003.

HANUS, O.; VEGRICHT, J.; FRELICH, J.; et al. Analysis of raw milk according to free fat acid contents in the Czech Republic. **Czech Journal Animal Science**, v. 53, n. 1, 2008.

HORST, J. A. Impacto da Refrigeração na Contagem Bacteriana do Leite. In: MESQUITA, J. M.; DURR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil**. Goiânia/GO: Editora Talento, 2006.

HORST, J. A.; SILVA, M. S. G. Contagem Bacteriana: Indicador de qualidade do leite. **Revista Balde Branco**, v. 77, 2005.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk: Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results. **IDF Standard**, n. 196. Brussels: International Dairy Federation, 2004.



INTERNATIONAL STANDARD. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30°C. **ISO Standard**, n. 4833. Switzerland: International Standard, 2003.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Consultoria, Supervisão e Revisão Técnica Eduardo César Tondo. 6. ed. Porto Alegre/RS: Editora Artmed, 2005.

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

LOPES JÚNIOR, J. E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; et al. Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, 2012.

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

MARTINS, M. E. P. Influência de diferentes conservantes e condições de armazenamento de amostras de leite cru na determinação de contagem bacteriana total. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO, 2005.

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; et al. Bronopol and azidiol chemicals: time and temperature influence in the total bacterial count of raw milk. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, 2009.

MENEZES, M. F. C.; et al. Microbiota e conservação do leite. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas / Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, 2014.

MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M.; et al. Influence of raw milk quality on processed dairy products: how do raw milk quality test results relate to product quality and yield? **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, 2016.

NEVES, R. B. S. Influência do grupo de microrganismos – Mesófilos, psicrotróficos – Na linearização dos resultados do equipamento Bactoscan FC<sup>®</sup>. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO, 2008.

NINANE, V.; et al. Évaluation du Bactoscan FC pour la numération des bactéries du lait cru. **Le Lait**, v. 80, 2000.

PEIXOTO, A. L.; SILVA, M. A. P.; MORAIS, L. A.; et al. Influence of the type of milking and storage of milk on the chemical composition, somatic cell count and bacterial count total. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes Juíz de Fora**, v. 71, n. 1, 2016.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotólicas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, 2006.

RECHE, N. L. M.; NETO, A. T.; OVÍDEO, L. D.; et al. Microbial multiplication in raw milk stored in direct expansion bulk tanks. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, 2015.

ROSA, D. C.; et al. Qualidade do leite em amostras individuais e de tanque de vacas leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, 2012.

SALOMÃO, V. S. C. Influência de diferentes tipos de microrganismos na contagem bacteriana total e de células somáticas por citometria de fluxo e na composição centesimal do leite cru. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2012.

SAMARZIJA, D.; et al. Psychrotropic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, 2012.

SAMPAIO; et al. Influência de diferentes tipos de microrganismos na contagem bacteriana total por citometria de fluxo do leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, 2015.

SANCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; et al. Influence of storage and preservation on somatic cell count and composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, 2005.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito das bactérias psicrófilas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, 2001.

SESKENA, R.; JANKEVICA, L. Influence of chemical preservatives on the quality and composition indices of raw milk. **Acta Universitatis Lativiensis**, v. 723, 2007.

SILVA, N. M. A.; BASTOS, D. L. S.; OLIVEIRA, M. C. P. P.; et al. Influence of somatic cell count and total bacterial counts of raw milk in cheese yield using small-scale methodology. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 5, 2012.

SOUZA, G. N.; FARIA, C. G.; RIOS, R. J.; et al. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem total de bactérias em amostras de leite cru conservadas com azidiol. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes Juíz de Fora**, v. 61, 2006.

SOUZA, H. P. M.; ROMERO, N. B.; ROSA, C. C. B. Occurrence of unstable milk not acid in the north state of Mato Grosso, Brazil. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes Juíz de Fora**, v. 71, n. 1, 2016.

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

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, 1992.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. **Bulletin of the IDF**, Brussels: International Dairy Federation, n. 358, 2000.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção de Qualidade do Leite**. Santa Maria/RS: Ed. UFSM, 2010.

VARGAS, D. P.; et al. Correlations between total bacterial count and quality parameters of milk. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 4, 2014.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Características do leite. **Boletim Técnico Universidade Federal do Espírito Santo - UFES**, n. 01007, 2007.

VIDAL-MARTINS, A. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, 2005.

VITHANAGE, N. R.; et al. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. **International Dairy Journal**, v. 57, 2016.

WENTZ, A. G. Diferentes métodos e tempos de conservação de amostras de leite cru para determinação da composição físico-química e qualidade microbiológica. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon/PR, 2016.

ZAJÁC, P.; ZUBRICKÁ, S.; CAPLA, J.; et al. Effect of preservatives on milk composition determination. **International Dairy Journal**, v. 61, 2016.

ZENI, E. Efeito do binômio tempo e temperatura de conservação sobre o aspecto de qualidade higiênico-sanitário de leite de cabra. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados), Universidade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora/MG, 2014.

## APÊNDICE A – Artigo científico

### DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AZIDA SÓDICA E CLORANFENICOL: EFICÁCIA NA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE

F. R. Vancin<sup>1,2</sup>, L. B. Rodrigues<sup>1</sup>, L. Daroit<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Passo Fundo – UPF

<sup>2</sup> Universidade do Contestado – UnC, Laboratório Estadual da Qualidade do Leite

#### Resumo

Avaliamos um método para a conservação de amostras de leite cru, mantendo sua integridade e confiabilidade na avaliação microbiológica, proporcionando a emissão de um resultado seguro e confiável. Foi coletado leite do tanque de refrigeração de duas propriedades rurais, abrangendo dois grupos de leite *in natura*: G-1 – em acordo, e G-2 – em desacordo, por estar acima dos parâmetros da normativa vigente para contagem bacteriana obtida eletronicamente. O leite de cada grupo foi fracionado em 720 frascos, compreendendo os tratamentos: concentração usual de azida sódica e cloranfenicol da pastilha de azidiol (T-1), concentração dupla (T-2) e concentração tripla (T-3). As amostras foram armazenadas por 14 dias em temperatura de  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $9^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Foi utilizado como controle, amostras sem a adição do conservante (T-4). Foram analisadas no equipamento *Bentley Bactocount IBC*<sup>®</sup>, da *Bentley Instruments Incorporated*, Chaska, Estados Unidos da América, expressos em contagem bacteriana individual (CBI) e posteriormente transformados em logaritmo de base 10. O uso do conservante é imprescindível para a manutenção das amostras, pois somente o acondicionamento sob baixas temperaturas não foi suficiente para impedir o aumento da contagem ao longo da incubação e a deterioração das amostras. O T-3 foi a melhor condição de conservação, possibilitando a análise até o 12º dia, em incubação de  $3^{\circ}\text{C}$ , e até o 8º dia em incubação a  $6^{\circ}\text{C}$ ; sem alteração significativa dos resultados comparados pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Aumentando a concentração de azida sódica e de cloranfenicol do conservante, foi possível prolongar a viabilidade analítica das amostras. Para o G-1 nos tratamentos utilizando o conservante, não existe associação para as variáveis, enquanto que esta é observada no G-2. Nos dois grupos ocorreu associação das variáveis no T-4, independente da temperatura, aumentando o tempo de incubação, aumenta os resultados da contagem bacteriana.

#### 1. Introdução

Um dos requisitos essenciais para uma matéria prima de qualidade é a baixa contagem bacteriana, que não somente representa boas condições de higiene

durante a obtenção, armazenamento e coleta do leite, mas principalmente por ser uma premissa para a cadeia produtiva de lácteos, pois assegura a qualidade e a inocuidade do produto, além de sua inserção no mercado internacional.

A contagem bacteriana reflete a condição higiênica de obtenção do leite na fazenda. O leite pode ser contaminado por microrganismos provenientes da microbiota presente no ambiente, de falhas no manejo de ordenha, da água e do úbere. Os principais grupos de bactérias que podem influenciar a qualidade do leite são as psicrotróficas – que podem crescer em baixas temperaturas, geralmente provenientes das sujidades presentes nos animais e nos equipamentos; as termófilas – responsáveis pela degradação proteolítica do leite e as termodúricas – que são resistentes à pasteurização, e estão ligadas à sanitização imprópria dos equipamentos, provocando a deterioração do leite pasteurizado (SAMPAIO et al., 2015).

Conforme previsto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, por meio de Instruções Normativas, a produção de leite destinada ao processamento em estabelecimentos sob fiscalização federal deve ser mensalmente submetida para análise em laboratórios credenciados (BRASIL, 2002), estes laboratórios integram a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite – RBQL, e dentre os parâmetros analisados está a determinação eletrônica da contagem bacteriana, pelo método de citometria de fluxo.

Em alguns países, apenas a refrigeração é responsável pela preservação das amostras, não sendo utilizados conservantes. Nestes casos, a distância entre as fazendas e os laboratórios são curtas, possibilitando a análise em no máximo 48 horas após a coleta. No caso do Brasil, considerando sua extensão territorial e o número de produtores, a análise dentro deste prazo é praticamente inviável (CASSOLI, et al., 2010).

Sendo assim, um desafio para a cadeia produtiva do leite é a preservação dessa amostra, mantendo-a representativa até a análise.

Para tanto, existe a necessidade da adição de um conservante bacteriostático.

Segundo Damasio (2012), dentre as substâncias para a conservação de amostras de leite, a Federação Internacional de Laticínios (*International Dairy Federation*) reconhece apenas as seguintes: ácido bórico, dicromato de potássio, bronopol e a azida sódica. Esta última, em mecanismo com a ação conjunta do cloranfenicol, inibe a síntese protéica, de ação bacteriostática efetiva, o que possibilita a conservação do leite por tempo prolongado.

O azidiol, composto de azida sódica e cloranfenicol é o conservante utilizado para a preservação das amostras.

De acordo com norma técnica interna da RBQL, são consideradas aptas para as análises eletrônicas as amostras de leite cru refrigerado que chegam ao laboratório com conservante adequado e com temperatura máxima de 10°C. As amostras são mantidas em refrigeração no laboratório até o momento da análise (ALMEIDA, et al., 2016).

A idade da amostra é um dos principais percalços relacionados à qualidade da mesma, e em muitos casos, a ação bacteriostática do conservante não é suficiente para impedir a multiplicação bacteriana e conseqüentemente a sua deterioração.

O emprego do conservante com concentrações superiores de azida sódica e cloranfenicol é uma alternativa favorável para a cadeia produtiva, possibilitando a conservação das amostras por tempo prolongado.

Almeida et al. (2016) e Leite (2006) acreditam que o tempo prolongado para

análise tem grande importância em situações excepcionais, em que eventualmente ocorrem problemas que prejudicam a temperatura e o tempo estabelecidos para se efetuar as análises, onde não é possível analisar as amostras em até sete dias, gerando dificuldade na logística tanto para as indústrias de laticínios como para os laboratórios. No caso das indústrias, são obrigadas a fazer uma nova coleta, originando custos e dificuldades operacionais. Para os laboratórios, no caso de falha nos equipamentos, poderiam analisar as amostras por um período um pouco maior, sem comprometer a confiabilidade dos resultados das mesmas.

Diante a escassez de informações na literatura, acerca de testes com diferentes concentrações das substâncias que compõem o conservante das amostras para a determinação eletrônica da contagem bacteriana, este experimento se propôs a avaliar diferentes doses.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Coleta e Preparo das Amostras

As amostras foram preparadas a partir de leite *in natura* de propriedades rurais do município de Concórdia (SC), com contagem bacteriana previamente conhecida, uma vez que estas são monitoradas semanalmente pelo Laboratório Estadual da Qualidade do Leite da Universidade do Contestado.

O leite *in natura* foi coletado de tanque de refrigeração por expansão, obtido de rebanho leiteiro bovino de duas propriedades rurais, apresentando faixas distintas de contagem bacteriana, sendo: leite do grupo 1 (G-1) - contagem bacteriana em acordo com a normativa vigente,

apresentando valor de leitura inferior a 145.000 CBI/mL; e leite do grupo 2 (G-2) - contagem bacteriana em desacordo, com contagem acima dos parâmetros da normativa vigente, apresentando valor de leitura superior a 2.650.000 CBI/mL.

No momento da coleta a temperatura do leite no tanque de refrigeração não excedeu 4,0°C.

O agitador do tanque foi acionado por dez minutos, e permaneceu ligado durante a coleta, para homogeneização do leite.

O leite de cada propriedade foi transferido para um recipiente identificado, previamente esterilizado e imediatamente após a coleta acondicionado em caixas isotérmicas com gelo reutilizável e encaminhado para o Laboratório Estadual da Qualidade do Leite da Universidade do Contestado – UnC.

Em capela de fluxo laminar, 40 mL do leite de cada grupo, G-1 e G-2 foram distribuídos em 720 frascos estéreis de polipropileno envoltos individualmente em invólucro plástico com capacidade para 50 mL de leite, correspondentes aos tratamentos a serem testados, sendo três condições com pastilhas de conservante com concentrações distintas de azida sódica e cloranfenicol, e uma condição sem a adição do conservante, conforme segue: tratamento 1 (T-1) foi aplicado para a concentração usual, com 4,79 mg (0,12 mg/mL de leite) de azida sódica e com 0,2 mg (0,005 mg/mL de leite) de cloranfenicol, o tratamento 2 (T-2) para pastilhas de conservante com concentração de azida sódica de 9,58 mg (0,24 mg/mL de leite) e concentração de cloranfenicol de 0,4 mg (0,010 mg/mL de leite), o tratamento 3 (T-3) para pastilhas de conservante com concentração de azida sódica de 14,37 mg (0,36 mg/mL de leite) e concentração de cloranfenicol de 0,6 mg (0,015 mg/mL de

leite), e o tratamento 4 (T-4) foi aplicado sem a adição do conservante, servindo como o controle amostral.

Após a adição do leite aos frascos, estes foram homogeneizados com movimentos suaves e ininterruptos de inversão, possibilitando a uniformização do conteúdo e garantindo a completa dissolução da pastilha de conservante, quando esta foi utilizada.

O leite adicionado aos frascos do T-1, T-2 e T-3 adotaram coloração azulada, em função do azul de bromofenol, marcador de cor presente nas pastilhas.

As amostras permaneceram incubadas por 14 dias, com análises diárias para cada temperatura avaliada, partindo do dia 0 (D-0) - data da coleta e fracionamento das amostras, até o dia 14 (D-14).

As amostras foram incubadas em estufas BOD, com temperaturas de  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (BOD-3),  $6^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (BOD-6) e  $9^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (BOD-9).

A temperatura de cada estufa foi monitorada diariamente, por meio de duas verificações, sendo a primeira verificação no período matutino, e a segunda verificação no período vespertino.

## 2.2 Ensaio de Contagem Bacteriana

A análise de contagem bacteriana das amostras foi realizada pelo equipamento *Bentley Bactocount IBC<sup>®</sup> 150* (*Bentley Instruments Incorporated*, Chaska, Estados Unidos da América).

O referido equipamento opera pelo método de citometria de fluxo, conforme diretrizes da ISO 21187/IDF 196 – *Milk: Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results.*

A *Bentley Instruments* (2002), fabricante do equipamento ressalta que este é automatizado para a rápida enumeração de bactérias individuais no leite cru.

Todas condições foram testadas em quadruplicata, ou seja, quatro amostras para cada temperatura e tempo de cada um dos tratamentos dos dois grupos de leite.

Cada amostra foi analisada individualmente no citômetro de fluxo, gerando três medições analíticas de cada frasco.

O contador bacteriano reproduz os resultados das leituras das amostras em contagem bacteriana individual (CBI/mL).

## 2.3 Tratamento Estatístico

A partir da transformação dos resultados de CBI em logaritmo de base 10, os dados foram submetidos ao tratamento estatístico. Primeiramente realizou-se o teste da análise de variância (ANOVA), considerando os efeitos dos tempos, das temperaturas e dos tratamentos, além das interações dos mesmos. Em seguida, foi aplicado o teste de Tukey para as temperaturas e tratamentos. A ação do tempo sobre as amostras foi analisada utilizando somente os tempos zero e tempo um para comparação com os demais tempos subsequentes, visto que desejávamos avaliar as possíveis alterações em relação às características do leite do tanque quando chega para análise. Também foi utilizada a correlação linear (Pearson) para os diferentes tempos de incubação.

## 3. Resultados e Discussões

Confrontando o tempo zero com os demais resultados dentro do mesmo tratamento e temperatura, foi possível observar para o leite em acordo com os padrões da normativa, que a diferença



significativa ( $p < 0,05$ ) dos resultados prevalece entre as comparações.

Observamos que para as amostras do G-1 nos tratamentos adicionados de conservante, houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre as médias do dia zero para os demais tempos de incubação já no dia 1.

Para o leite em desacordo com os padrões da normativa, também evidenciamos que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tempo zero e os demais resultados durante 14 dias em todos os tratamentos sob todas as temperaturas de incubação, reiterando que contagens bacterianas elevadas apresentam uma maior variabilidade entre os resultados, principalmente pelo fato de que alguns microrganismos podem dobrar sua população a cada 20 ou 30 minutos (GUERREIRO et al., 2005), e desta forma, a taxa de multiplicação dos microrganismos está relacionada à contaminação inicial do leite (RECHE et al., 2015).

Em leite cru de boa qualidade a microbiota predominante é composta por bactérias Gram-positivo (SUHREN; REICHMUTH, 2000).

A sensibilidade dos grupos microbianos ao azidiol é muito diferente. Os coliformes e *Staphylococcus aureus* são mais sensíveis ao efeito da azida sódica do que as bactérias mesófilas, *Enterococcus* e *Lactobacillus*. Enquanto que *Enterococcus* é mais resistente ao cloranfenicol do que *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus* (ELIZONDO et al., 2005).

Comparando o tempo um aos demais tempos sob o mesmo tratamento e temperatura, para o G-1 temos um desempenho próximo para o T-1 (concentração usual) e T-2 (concentração dupla), considerando as três temperaturas de incubação, onde ambos tratamentos

demonstraram resultados bastante próximos ao longo do experimento, confirmando os testes realizados por Elizondo et al. (2005), que ao avaliar diferentes doses do azidiol líquido para a conservação de amostras não encontrou diferença entre a proporção usual do conservante e a meia dose deste.

Sob 3°C, os resultados do T-1 comparados com o tempo um não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ) até o dia 6, enquanto que os resultados do T-2 em tempo um não divergiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) até o dia 4. Para as amostras de ambos os tratamentos incubadas à 6°C e 9°C, até o dia 4 não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Desta forma, constatamos que as amostras de leite cru do T-1 podem ser analisadas até o sexto dia, quando mantidas em refrigeração, com temperatura de incubação em torno de 3°C, sem alterações nos resultados. Tempo de conservação próximo do que foi determinado por Cassoli et al. (2010) e Cassoli (2005) – sob temperatura de até 7°C, Souza et al. (2006) – entre 3,8°C e 10°C e Zeni (2014) – à 10°C para acondicionamento de leite de cabra, considerando que até o sétimo dia os resultados das contagens bacterianas não são afetados, mantendo-se analiticamente viáveis.

O tempo de conservação encontrado neste estudo foi superior ao relatado por Seskena; Jankevica (2007), Gonzalo et al. (2003) e Ninane et al. (2000), que sugerem que as amostras sejam analisadas até o quarto dia após a coleta, se mantidas sob refrigeração à 4°C. Todavia, concordamos com a afirmação destes, já que em temperatura de 6°C e 9°C a viabilidade das amostras foi reduzida para 4 dias, tanto para o conservante com dose usual, como para o conservante onde a dose dos componentes foi duplicada. Ao mesmo tempo, o período

de conservação determinado foi inferior ao de Martins (2005) – em temperatura de 4°C, Leite (2006) – em temperatura de 4°C à 10°C e de Almeida et al. (2016) – em temperatura de 17°C, que defendem a conservação das amostras por até dez dias; este último, ainda propõe que até 11°C, as amostras podem ser analisadas por até 16 dias de armazenamento.

Para o T-3, foi evidenciada a melhor condição de conservação das amostras deste grupo de leite, possibilitando a análise até o décimo segundo dia quando as amostras estiverem em temperatura de incubação de 3°C, sem alteração estatística significativa ( $p > 0,05$ ) dos resultados; e até o oitavo dia quando incubadas em 6°C – tempo bastante próximo aos relatos de literatura descritos acima, porém, para amostras adicionadas de conservante com a concentração usual dos componentes.

Em temperatura de incubação de 9°C, as amostras do T-3 foram mantidas sem alteração significativa ( $p > 0,05$ ) dos resultados até o quarto dia.

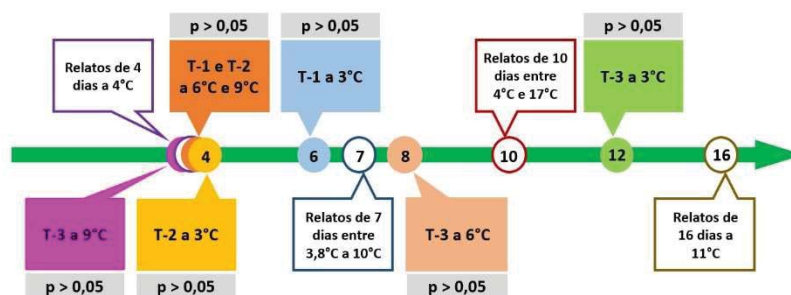
As médias apresentadas para o referido tratamento à 3°C, no dia 1 foi de  $4,91 \pm 0,07$  e no dia 12 foi de  $4,88 \pm 0,04$ ; e à 6°C no dia 1 foi de  $4,87 \pm 0,05$  e no dia 8 foi de

$4,96 \pm 0,04$ . Para 9°C, foi considerada uma variação de  $4,85 \pm 0,04$  no dia 1 para  $4,80 \pm 0,05$  no dia 4. De tal modo, reiteramos a importância do acondicionamento das amostras sob baixas temperaturas mesmo utilizando o conservante, possibilitando longevidade analítica bem como impedindo a deterioração das mesmas pela ação de microrganismos.

Desta forma, pode-se afirmar que a concentração tripla de azida sódica e cloranfenicol demonstrou eficácia superior na manutenção das amostras quando comparado aos demais tratamentos testados, com concentração usual do produto e com concentração dupla, haja visto que os comprovados efeitos bacteriostáticos do azidiol ocorrem principalmente por estas duas substâncias que compõem a pastilha, a azida sódica como agente bacteriostático e o cloranfenicol como antibiótico.

A Figura 1 (Fig. 1) contempla a viabilidade analítica das amostras de leite *in natura* do grupo 1, para os tratamentos T-1, T-2 e T-3, para todas as temperaturas de incubação, bem como os situa junto aos demais relatos bibliográficos.

Fig. 1 - Viabilidade analítica das amostras do G-1, para os tratamentos T-1, T-2 e T-3



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

As médias obtidas para o T-3 a 3°C, comprovam os relatos de Cassoli (2005), em que afirma que a utilização do

conservante bacteriostático reduz a atividade metabólica das bactérias garantindo maior vida útil às amostras.

Entendemos que, de certa forma, o desempenho do conservante com dose tripla foi favorecido pelo leite *in natura* com baixa contagem bacteriana que originou as amostras do G-1, resultados que corroboram aos de Zeni (2014), quando afirma que a baixa carga bacteriana inicial e a baixa temperatura de armazenamento são a melhor combinação para a manutenção da qualidade microbiológica do leite.

No entanto, acreditamos também que, especialmente pela quantidade do agente bacteriostático e do antimicrobiano presentes na pastilha, a determinação de um efeito bactericida do conservante na dose tripla requer novos experimentos, podendo utilizar a citometria de fluxo, mas esta deve ser combinada com diferentes corantes possibilitando a diferenciação e quantificação de microrganismos viáveis e inviáveis presentes na amostra.

Esta condição do conservante seria uma alternativa favorável para a cadeia produtiva como um todo, mesmo com valor maior do que a pastilha com concentração usual, que custa em média US\$ 0,034 centavos de dólar, por apresentar dois componentes com dosagem triplicada, seu custo seria de aproximadamente US\$ 0,102 centavos de dólar. No entanto, sua viabilidade econômica deve ser analisada, levando-se em consideração não somente a possibilidade de prolongar o tempo de vida útil analítica das amostras, mas também proporcionando segurança ao ensaio, pela conservação das amostras a serem analisadas nos laboratórios da RBQL.

Avaliando os dados do T-4, em que a pastilha de conservante não foi adicionada, asseguramos que a conservação das amostras só é possível com a utilização do conservante bacteriostático. O acondicionamento, mesmo que sob baixas temperaturas não é suficiente para impedir

o aumento da contagem bacteriana por longos períodos de incubação, resultando na deterioração das amostras. Tal fato pode ser confirmado a partir do aumento das temperaturas, enquanto que em 3°C a amostra manteve-se viável por três dias, em 6°C a viabilidade foi reduzida para 2 dias, e com 9°C o resultado apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) já a partir das primeiras 24 horas de incubação.

Cabe ainda ressaltar, que de acordo com Brasil (2011), o limite da normativa vigente, para CPP é de  $3,0 \times 10^5$  UFC/mL (300.000 UFC/mL), e corresponde a aproximadamente 824.000 CBI/mL, valor expresso como 5,91  $\log_{10}$ . Assim, caso a análise da contagem bacteriana fosse realizada após os tempos mencionados, este leite seria considerado insatisfatório no que tange o parâmetro para CPP, uma vez que após este período a contagem bacteriana excede os limites da norma, o que acarretaria em prejuízos econômicos ao produtor, que deixaria de receber a bonificação pelo produto nos programas de pagamento pela qualidade do leite implementados pelas agroindústrias.

Zeni (2014) referenciando Fonseca et al. (2006), descreve que a partir de estudos deste, foram identificadas a variação da contagem de mesófilos e psicrotróficos, de acordo com a temperatura e o tempo de armazenamento. Foi observado que a temperatura de armazenagem do leite cru à 4°C manteve a população de microrganismos mesófilos dentro dos limites da legislação até o terceiro dia de armazenamento, enquanto que à 10°C pelo mesmo período de armazenamento este limite já havia sido ultrapassado. Os microrganismos psicrotróficos, diferente com o que ocorreu com a população dos mesófilos, tiveram taxa de crescimento semelhante em ambas as temperaturas, e

atingiram contagens próximas nas duas temperaturas de estocagem após 6 dias. Desta forma, provando a importância da temperatura e alertando para o tempo de armazenamento do leite na contagem bacteriana.

Para o G-2, em que as amostras foram originadas a partir de leite com contagem bacteriana elevada, a vida útil analítica das amostras foi reduzida consideravelmente. Relatos de Castro (2007) e Suhren; Reichmuth (2000), em leite com altas contagens, o número de bactérias Gram-negativo aumenta, o que vem de encontro também aos achados de Arcuri et al. (2008) e Pinto et al. (2006) acerca do predomínio (cerca de 80 à 90%) da população bacteriana do leite ser composta de Gram-negativos (SAMARZIJA et al., 2012), sendo que o gênero *Pseudomonas* spp. representam de 50 à 70% deste grupo (MURPHY et al., 2016), multiplicando-se em uma ampla faixa de temperatura, de 4°C a 30°C (VITHANAGE et al., 2016).

A temperatura foi o fator determinante para a manutenção, haja visto que as amostras do G-2, dos tratamentos T-1, T-2 e T-3 incubadas à 3°C apresentaram-se viáveis entre 4 e 5 dias, com 6°C e com 9°C a viabilidade das amostras foi encurtada para 3 e 2 dias respectivamente, em

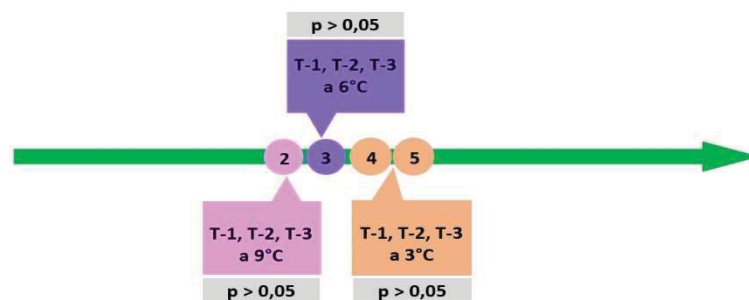
consonância aos resultados de Martins (2005) e Martins et al. (2009), onde o efeito bacteriostático do azidiol foi influenciado pela temperatura de estocagem da amostra de leite cru; assim, a eficiência deste como conservante ficou condicionada à temperatura de armazenamento. Entretanto, contrários aos achados de Almeida et al. (2016) e Souza et al. (2006), não verificando diferença entre temperaturas de armazenamento de 3°C à 11°C e de 3,8°C à 10°C, respectivamente.

Para incubação à 3°C, o T-1 consistiu no tratamento que permitiu o maior tempo de incubação sem alteração ( $p > 0,05$ ) do resultado deste grupo de leite.

Desta maneira, reiteramos que para o leite com carga bacteriana inicial elevada, evidenciamos a redução da viabilidade analítica, mesmo associando a utilização do conservante à refrigeração sob baixas temperaturas, quando o comparamos com o mesmo produto perante as mesmas condições, porém com carga microbiana reduzida.

A viabilidade analítica das amostras do leite *in natura* do grupo 2, para o T-1, T-2 e T-3 podem ser observadas na Figura 2 (Fig. 2).

Fig. 2 - Viabilidade analítica das amostras do G-2, para os tratamentos T-1, T-2 e T-3



Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Assim como no grupo anterior, para o G-2 foi possível verificar a conservação das amostras por tempo ainda menor para o T-4, em virtude da alta contagem bacteriana inicial do leite deste grupo, já que em todas as temperaturas testadas, as amostras desse tratamento apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) dos resultados logo nas primeiras 24 horas de incubação, destacando sobretudo a importância da utilização do conservante.

Quando comparamos os tratamentos, dentro do mesmo tempo e temperatura, as médias das amostras incubadas à 3°C exibiram maior variação ( $p < 0,05$ ) dos resultados entre os tratamentos testados, enquanto que para o lote incubado a 6°C, a comparação para os tratamentos T-1, T-2 e T-3, foi diferente significativamente ( $p < 0,05$ ) apenas no dia 2.

No lote incubado a 9°C, nos resultados do dia 4, o T-1 não difere ( $p > 0,05$ ) do T-2, mas difere ( $p < 0,05$ ) do T-3, já o T-2 e T-3 não apresentam diferença ( $p > 0,05$ ) entre si.

Para o grupo 2, as amostras à 3°C e 6°C dos tratamentos T-1, T-2 e T-3 também foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos tempos de incubação.

Para o dia zero das amostras incubadas à 9°C, os resultados não foram discrepantes ( $p > 0,05$ ) quando confrontados com o T-1, estando igual ao T-2 e T-3; mas os dois últimos apresentando diferença ( $p < 0,05$ ) entre si.

Tanto para o G-1 como para o G-2, o tratamento 4 foi em sua grande maioria, diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) na comparação horizontal dos demais tratamentos para as três temperaturas testadas em cada grupo de leite.

Para os dois grupos, a medida que as contagens das amostras do T-4

aumentaram, os resultados foram obtidos por estimativa, uma vez que extrapolaram os limites máximos confiáveis de medição instrumental determinados pelo fabricante do equipamento, que é de  $9,9 \times 10^6$  UFC/mL.

Para as amostras deste mesmo tratamento, notamos a formação de coágulos e gás nos frascos, com odor fétido, que segundo Salomão (2012), em função do número e do tipo de microrganismos, alterações indesejáveis são produzidas na aparência e/ou no odor do leite. A presença de gás, pode ser um indicativo de coliformes, bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, que fermentam a lactose com a produção de ácido e gás, os coliformes diminuem a qualidade e a vida de prateleira do leite e dos derivados, devido à acidificação e à atividade proteolítica e lipolítica. Os coliformes são considerados como um dos principais grupos de microrganismos indicadores da qualidade do leite (ROSA, 2012).

Segundo Leite (2006), a ocorrência de coágulo nas amostras pode estar associada com a qualidade microbiológica inicial das mesmas, o que não foi confirmado por este experimento, já que tanto para o leite com baixa contagem bacteriana, como para o leite com contagem elevada verificamos a presença dos coágulos, e por este motivo as amostras foram descartadas antes do término do período de incubação.

Não existe associação entre as variáveis para os tratamentos T-1, T-2 e T-3 do G-1 nas três temperaturas de incubação, uma vez que a análise de probabilidade exibe resultado de  $p > 0,05$ ; e as variáveis apresentaram o mesmo comportamento.

Para os mesmos tratamentos do G-2 nas três temperaturas de incubação, existe associação entre as variáveis, com valor de  $p \leq 0,05$ ; já que as variáveis apresentaram

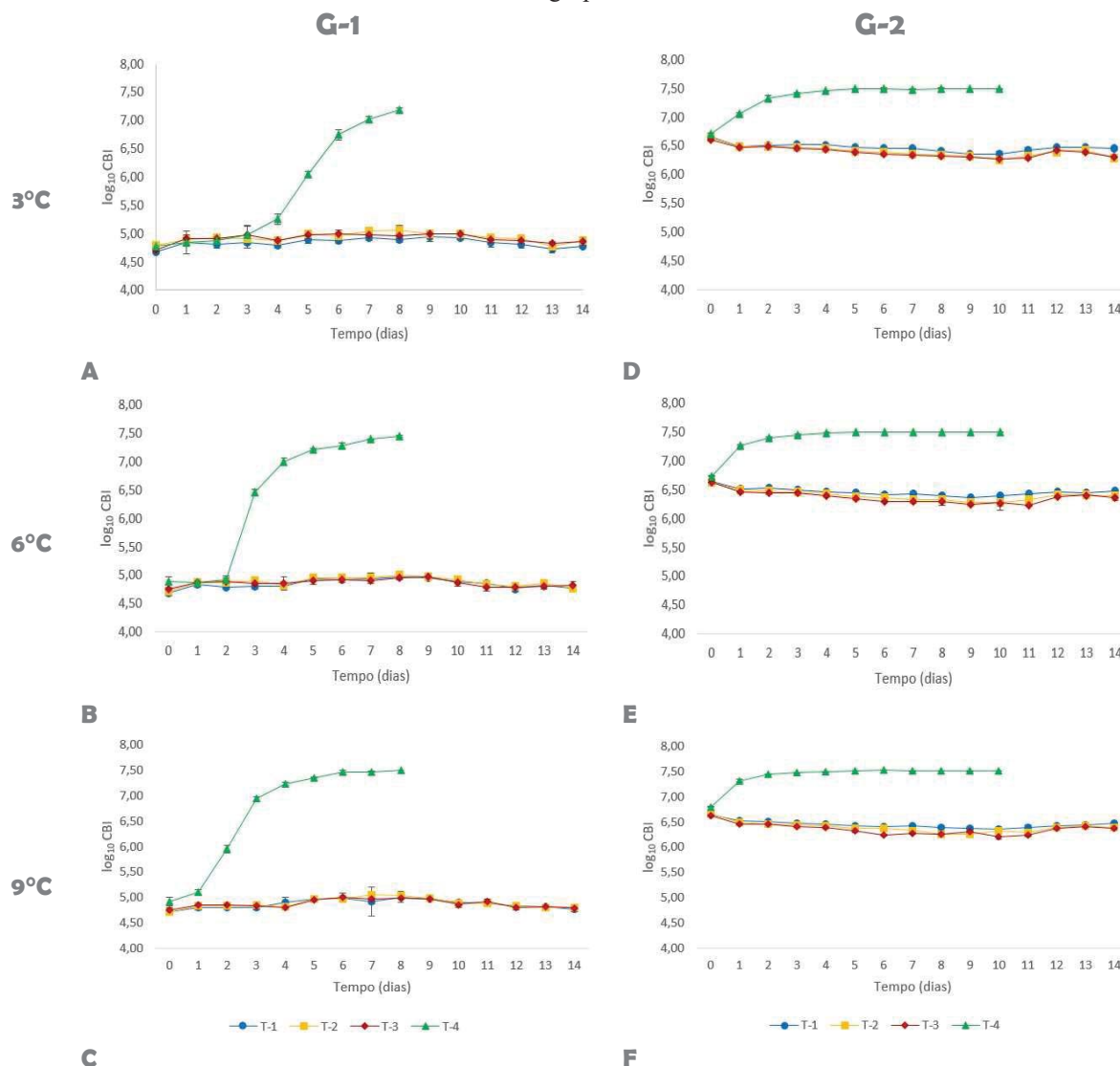
comportamentos opostos, ou seja, a medida em que o tempo aumentou, o valor da contagem bacteriana das amostras foi reduzido, de igual forma aos achados de Wentz (2016), que evidenciou para as amostras conservadas com azidiol, independente da temperatura de armazenagem, a redução da contagem bacteriana ao longo do tempo.

Existe associação para as variáveis no tratamento 4 para os dois grupos de leite, G-1 e G-2, independente da temperatura de incubação das amostras as variáveis apresentaram a mesma conduta nas três temperaturas, aumentando o tempo de incubação, proporcionalmente aumentou também os resultados da contagem

bacteriana, reforçando os achados de Zeni (2014), de que o tempo decorrido entre a coleta e a análise justifica a necessidade da utilização do conservante associado à refrigeração, já que os resultados aumentaram progressivamente no decorrer do período de incubação, considerando como agravante para este o binômio tempo x temperatura, sendo que a resposta da contagem bacteriana depende da interação destes fatores.

A Figura 3 (Fig. 3) apresenta o efeito do tempo de armazenamento e temperatura de incubação para os tratamentos testados nos grupos de leite G-1 e G-2.

**Fig. 3** - Efeito do tempo de armazenamento para o T-1, T-2, T-3 e T-4 em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C para ambos os grupos de leite



**C**

Legendas:

T-1: Conservante com dose usual; T-2: Conservante com dose dupla; T-3: Conservante com dose tripla e T-4: Sem utilização do conservante.

Em virtude da deterioração das amostras, não foi possível analisar o T-4 por todo o período de incubação.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2018).

Na figura acima, os gráficos A, B e C são representativos do G-1, enquanto que os gráficos D, E e F do G-2. Foram avaliados os quatro tratamentos por 14 dias de incubação em temperatura de 3°C, 6°C e 9°C.

Diante do comportamento do tratamento 4, fica ainda mais evidente a necessidade da utilização do conservante nas amostras, independente da temperatura em que as

mesmas serão mantidas até o momento do ensaio.

#### 4. Conclusões

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que para o T-3, com concentração tripla de azida sódica e cloranfenicol, foi evidenciada a melhor condição de conservação, possibilitando a análise da

contagem bacteriana até o décimo segundo dia em temperatura de incubação de 3°C e até o oitavo dia quando incubadas em 6°C, sem alteração significativa dos resultados, o que confere a eficácia superior da concentração tripla dos componentes do conservante na conservação das amostras.

A manutenção das amostras somente foi possível com a utilização do conservante. O acondicionamento sob baixas temperaturas não foi suficiente para impedir o aumento da contagem bacteriana ao longo do período de incubação e consequente a deterioração das amostras.

As variáveis no T-4, apresentaram associação, independente da temperatura, com o tempo de incubação aumentando proporcionalmente a contagem bacteriana.

## Referências

- ALMEIDA, T. V.; NEVES, R. B. S.; ARNHOLD, E.; et al. Effect of temperature and time of storage of raw milk samples on electronic analysis results. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 5, 2016.
- ARCURI, E. F.; et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, 2008.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. **BactoCount 150 Operator's Manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 7 de 04/05/2016. Aprova os Regulamento Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 04 de maio de 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 62 de 29/12/2011. Aprova os Regulamento Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília/DF, 30 de dezembro de 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 51 de 18/09/2002. Aprova os Regulamento 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/DF, 20 de setembro de 2002.
- CASSOLI, L. D. Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2005.
- CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, 2010.
- CASTRO, J. F. Azidiol comprimido esterilizado como conservante do leite cru destinado a contagem microbiana por citometria de fluxo. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2007.
- DAMASIO, D. S. N. Desenvolvimento de comprimidos de azidiol para uso na conservação do leite. Dissertação (Inovação Biofarmacêutica), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2012.
- ELIZONDO, J.; ALDUNATE, A.; EZCURRA, P.; et al. Efficiency of the proportion of azidiol on preservation in ewes's milk samples for analysis. **Food Control**, v. 18, 2005.
- GONZALO, C.; MARTINEZ, J. R.; CARRIEDO, J. A. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factor. **Journal of Dairy Science**, v. 86, 2003.
- GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, 2005.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk: Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results. **IDF Standard**, n. 196. Brussels: International Dairy Federation, 2004.



- LEITE, M. O. Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2006.
- MARTINS, M. E. P. Influência de diferentes conservantes e condições de armazenamento de amostras de leite cru na determinação de contagem bacteriana total. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO, 2005.
- MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; et al. Bronopol and azidiol chemicals: time and temperature influence in the total bacterial count of raw milk. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, 2009.
- MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M.; et al. Influence of raw milk quality on processed dairy products: how do raw milk quality test results relate to product quality and yield? **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, 2016.
- NINANE, V.; et al. Évaluation du Bactoscan FC pour la numération des bactéries du lait cru. **Le Lait**, v. 80, 2000.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, 2006.
- RECHE, N. L. M.; NETO, A. T.; OVÍDEO, L. D.; et al. Microbial multiplication in raw milk stored in direct expansion bulk tanks. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, 2015.
- ROSA, D. C.; et al. Qualidade do leite em amostras individuais e de tanque de vacas leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, 2012.
- SALOMÃO, V. S. C. Influência de diferentes tipos de microrganismos na contagem bacteriana total e de células somáticas por citometria de fluxo e na composição centesimal do leite cru. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG, 2012.
- SAMARZIJA, D.; et al. Psychrotropic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, 2012.
- SAMPAIO; et al. Influência de diferentes tipos de microrganismos na contagem bacteriana total por citometria de fluxo do leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, 2015.
- SESKENA, R.; JANKEVICA, L. Influence of chemical preservatives on the quality and composition indices of raw milk. **Acta Universitatis Latviensis**, v. 723, 2007.
- SOUZA, G. N.; FARIA, C. G.; RIOS, R. J.; et al. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem total de bactérias em amostras de leite cru conservadas com azidiol. **Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes Juíz de Fora**, v. 61, 2006.
- SUHREN, G.; REICHMUTH, J. Interpretation of quantitative microbiological results. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 1, 2000.
- VITHANAGE, N. R.; et al. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. **International Dairy Journal**, v. 57, 2016.
- WENTZ, A. G. Diferentes métodos e tempos de conservação de amostras de leite cru para determinação da composição físico-química e qualidade microbiológica. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon/PR, 2016.
- ZENI, E. Efeito do binômio tempo e temperatura de conservação sobre o aspecto de qualidade higiênico-sanitário de leite de cabra. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados), Universidade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora/MG, 2014.