

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ANDRÉIA GARCIA WENTZ

**DIFERENTES MÉTODOS E TEMPOS DE CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS
DE LEITE CRU PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA**

Marechal Cândido Rondon

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ANDRÉIA GARCIA WENTZ

**DIFERENTES MÉTODOS E TEMPOS DE CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS
DE LEITE CRU PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como requisito parcial do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição Animal, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Prof. Dr^a. Magali Soares dos Santos Pozza

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Fôlha Bermudes

Marechal Cândido Rondon

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ANDRÉIA GARCIA WENTZ

**DIFERENTES MÉTODOS E TEMPOS DE CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS
DE LEITE CRU PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como requisito parcial do Programa de Pós Graduação *stricto sensu* em Zootecnia para obtenção do título de Mestre em Zootecnia

Marechal Cândido Rondon, 07 de Março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Magali Soares dos Santos Pozza
Orientadora – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Rogério Folhâ Bermudes
Co-orientador – Universidade Federal de Pelotas

Dr.^a Marcela Abbado Neres
Membro da banca – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Dr.^a Milene Puntel Osmari
Membro da banca – Universidade Estadual de Maringá

*Aos meus pais Ari Wentz e Namyr Garcia Wentz e a minha irmã Alana...
pelo exemplo de vida, pelo incentivo, por inúmeras vezes serem meu suporte,
minha base, meu tudo... por terem possibilitado a realização deste mestrado
e que muitas vezes sacrificaram-se para que eu pudesse chegar até onde cheguei .*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida! Por ter me concedido saúde, força, proteção e por sempre estar junto de mim.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do Mestrado em Zootecnia.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Laboratório de Qualidade de Leite e Derivados, por possibilitar a realização do meu experimento.

A minha orientadora professora Dr^a. Magali Soares dos Santos Pozza, pela confiança, orientação na execução desta dissertação e ensinamentos a mim transmitidos. E também pela paciência e compreensão.

Ao meu coorientador e amigo professor Dr. Rogério Fôlha Bermudes. Obrigado por ter me amparado todas as vezes que precisei; por todas as orientações, desde o início de minha graduação; pelo incentivo, dedicação e orientação na execução desta dissertação. Também pela sua alegria e sabedoria compartilhada com todos e pelos valiosos conselhos.

Aos membros componentes da banca examinadora, pela disponibilidade, avaliação, sugestões e contribuições fornecidas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu amigo e Zootecnista Cristian Marlon Martins pela ajuda prestada e pela realização das análises estatísticas.

Aos meus amigos do grupo NUPECLE por todo auxílio e empenho para que este fosse realizado. Obrigado pela ajuda e pela amizade.

Aos meus incansáveis amigos que me receberam em Marechal Cândido Rondon e me deram todo apoio que necessitei... Daniele Salete Lourenço, Suzana da Cruz Pires e Weiler Giacomazza Cerutti. Obrigada por todo auxílio, apoio, companheirismo, carinho, ajuda, recepção e amizade.

A toda minha família que eu amo muito, pelo apoio e incentivo recebido.

Ao secretário do PPZ, Paulo Henrique Morsh pela constante preocupação com os mestrados na realização de assuntos burocráticos.

A todos meus amigos e colegas de mestrado pela convivência e amizade no decorrer da realização desta pós-graduação. Em especial a Daniele, Edirlene, Samantha e Suzana que tornaram a jornada mais leve e meus dias mais divertidos.

E a todos que aqui não foram citados, mas que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a conquista desta etapa em minha vida.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

Andréia Garcia Wentz

"Não desanimes. Persiste mais um tanto.
Não cultives o pessimismo. Centraliza-te no bem a fazer.
Esquece as sugestões do medo destrutivo.
Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros.
Avança ainda que seja por entre lágrimas.
Trabalha constantemente. Edifica sempre.
Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração.
Não te impressiones à dificuldade.
Convence-te de que a vitória espiritual é construção para o dia a dia.
Não desistas da paciência.
Não creias em realização sem esforço.
Silêncio para a injúria. Olvido para o mal.
Perdão às ofensas. Recorda que os agressores são doentes.
Não permitas que os irmãos desequilibrados te destruam o trabalho ou te apaguem a esperança.
Não menosprezes o dever que a consciência te impõe.
Se te enganaste em algum trecho do caminho,
Reajusta a própria visão e procura o rumo certo.
Não contes vantagens nem fracassos.
Estuda buscando aprender. Não se voltes contra ninguém.
Não dramatizes provações ou problemas.
Conserva o hábito da oração para que se te faça luz na vida íntima.
Resguarda-te em Deus e persevera no trabalho que Deus te confiou.
Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar.
Age auxiliando. Serve sem apego. E assim vencerás."

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

DIFERENTES MÉTODOS E TEMPOS DE CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE CRU PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA

O presente estudo foi realizado objetivando comparar três métodos de conservação (sem adição de conservante, azidiol e bronopol), na conservação de leite cru destinado a análise de contagem bacteriana total (CBT) pelo método de contagem padrão em placas, composição centesimal (gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos desengordurados), pH e do ponto de congelamento do leite. O trabalho também objetivou estudar a influência do período de armazenamento (dias), temperatura (refrigerado e não refrigerado) e a qualidade microbiológica inicial de amostras de leite cru. Foi utilizado delineamento em blocos casualizados com arranjo fatorial de 3 (métodos) x 2 (temperaturas) x 5 (tempos). A CBT foi influenciada pelo conservante, pois aos sete dias de armazenamento a amostra sem conservante apresentou maior CBT. Nas amostras com bronopol sem refrigeração houve redução gradual de CBT. Observou-se que as amostras conservadas com azidiol, independente da temperatura de armazenagem, reduziram a CBT ao longo do tempo. A temperatura influenciou o teor de gordura ($P < 0,001$). Os teores de proteína, lactose, sólidos desengordurados e densidade média do leite foram influenciados pelo tipo de conservante e dias de armazenamento ($P < 0,001$). O pH foi influenciado pelo tipo de conservante e pelos dias de armazenamento ($P < 0,001$). Para análises de CBT, o uso de azidiol, independente de refrigeração ou armazenagem, é o método mais adequado para manter as características originais do produto. A partir do primeiro dia de armazenamento das amostras ocorre aumento dos teores médios de proteína, lactose e sólidos desengordurados em relação aos quantificados no dia da coleta. Por outro lado, a CBT foi alterada de forma isolada pela CBT inicial, temperatura de armazenagem e dias de armazenagem ($P < 0,001$). Houve aumento da CBT de acordo com os dias de armazenagem, uma vez que até o primeiro dia de armazenagem os valores aumentaram, já a partir do segundo dia de armazenagem a CBT começou a reduzir. Nos teores de gordura, houve apenas efeito de CBT inicial e temperatura de armazenagem ($P < 0,001$). Nos percentuais de proteína houve efeito de dias de armazenagem, a proteína aumentou até o primeiro dia de armazenagem, onde estabilizou até 7 dias de armazenagem. Lactose foi alterada pela CBT inicial e pelos dias de armazenagem ($P < 0,001$), teor de lactose aumentou até o primeiro dia de armazenagem, onde estabilizou até o sétimo dia. O teor de ST foi alterado pela CBT inicial, temperatura e dias de armazenagem ($P < 0,001$), amostras com alta CBT inicial apresentaram maiores teores de ST. O teor de SD foi alterado apenas pela CBT inicial e pelos dias de armazenagem ($P < 0,001$). O pH foi alterado pela CBT inicial, temperatura e dias de armazenagem. Para análise de CBT, o uso de azidiol como conservante é dependente do uso de refrigeração durante a armazenagem para manter as características microbiológicas mais estáveis ao longo de sete dias de armazenagem. Para análises de composição físico-química, a partir do primeiro dia de armazenagem das amostras, ocorreu aumento dos teores de proteína, lactose e sólidos desengordurados do leite, em relação aos teores observados quando quantificados no mesmo dia da coleta do leite.

Palavras-chave: azidiol, bronopol, contagem bacteriana total, qualidade do leite

ABSTRACT

DIFFERENT METHODS AND TIMES OF MILK SAMPLES OF CONSERVATION RAW FOR DETERMINATION OF PHYSICOCHEMICAL COMPOSITION AND QUALITY MICROBIOLOGICAL

The present study aimed to compare three methods of conservation (no added preservative, azidiol and bronopol), conservation of raw milk for total bacteria count analysis (TBC) for the standard counting method plating, chemical composition (fat, protein, lactose, total solids and fat solids), pH and freezing of milk. The research also aimed to study the influence of the storage period (days), temperature (cooled and uncooled) and the initial microbiological quality of raw milk samples. It was used a randomized block design with factorial arrangement of 3 (methods) x 2 (temperature) x 5 (times). The TBC was influenced by the preservative, since after seven days of storage the sample without preservative had greater TBC. In the unrefrigerated samples with bronopol there was a gradual reduction of TBC. It was observed that the samples preserved with azidiol, regardless of storage temperature, TBC reduced over time. The temperature affected the fat content ($P < 0.001$). The protein, lactose, solids and milk medium density were influenced by the type of preservative and storage days ($P < 0.001$). The pH was influenced by the type of preservative and the storage days ($P < 0.001$). For TBC analysis, the use of azidiol, independent of refrigeration or storage, is the most appropriate method to maintain the original characteristics of the product. From the first day of storage of the samples, there was an increase of the average levels of protein, lactose and decreased solids in relation to the quantified on the collection day. On the other hand, the TBC was changed isolated by the initial TBC, storage temperature and storage days ($P < 0.001$). There was an increase of TBC according to the days of storage, since until the first day of storage values increased already from the second day of storage TBC started to reduce. In fat content, there was only initial TBC effect and storage temperature ($P < 0.001$). In the protein percentage there was the effect of days of storage, the protein increased until the first day of storage, where it stabilized until 7 days of storage. Lactose was amended by initial TBC and the storage days ($P < 0.001$), lactose increased until the first day of storage, which stabilized until the seventh day. The total solids (TS) content was amended by initial TBC, temperature and storage days ($P < 0.001$), samples with high TBC showed higher initial TS levels. The SD content was changed only by the initial TBC and the storage days ($P < 0.001$). The pH was amended by initial TBC, temperature and days of storage. For TBC analysis, using azidiol preservative is dependent on the use of refrigeration during storage to maintain more stable microbiological characteristics over seven days of storage. For analysis of physical and chemical composition, from the first day of sample storage, there was an increase of protein, lactose and fat solids of milk, compared to levels observed when quantified in the same day of collection of milk.

Keywords: azidiol, bronopol, total bacterial count, milk quality

LISTA DE TABELAS

INFLUENCIA DO BINÔMIO TEMPERATURA/TEMPO NA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE DESTINADAS A ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E PARA CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS

Tabela 1 - Variação da contagem bacteriana (Log 10) do leite com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	33
Tabela 2 – Média dos teores de gordura do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	34
Tabela 3 – Média dos teores de proteína do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	35
Tabela 4 – Média dos teores de lactose do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	36
Tabela 5 – Média dos teores de sólidos totais do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento.....	37
Tabela 6 – Média dos teores de sólidos desengordurados do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	38
Tabela 7 – Média da densidade do leite (em g/l) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	38
Tabela 8 – Média do ponto de congelamento do leite (em graus Horvert (°H)) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	39
Tabela 9 – Média de pH do leite com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento ..	40

FATORES INTERFERENTES NA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE CRU DESTINADAS A ANÁLISE DE CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS

Tabela 1 - Variação da contagem bacteriana total (Log 10) do leite com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento.....	50
Tabela 2 – Média dos teores de gordura do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	52
Tabela 3 – Média dos teores de proteína do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	53
Tabela 4 – Média dos teores de lactose do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento	53
Tabela 5 – Média dos teores de sólidos totais do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento.....	54
Tabela 6 – Média dos teores de sólidos desengordurados do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento.	55
Tabela 7 – Média de pH do leite com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento ..	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Produção de leite no Brasil	14
2.2 Constituintes e qualidade do leite.....	15
2.3 Qualidade microbiológica do leite	17
2.4 Coleta de amostras.....	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
4 INFLUÊNCIA DO BINÔMIO TEMPERATURA/TEMPO NA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE DESTINADAS A ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS.....	26
RESUMO.....	26
4 INFLUENCE OF THE BINOMIAL TEMPERATURE / TIME IN MILK SAMPLES CONSERVATION DESTINATED TO PHYSICOCHEMICAL ANALYSES AND STANDARD COUNTING ON PLATES	27
ABSTRACT	27
4.1 Introdução	28
4.2 Material e Métodos	29
4.2.1 Amostras.....	29
4.2.2 Análises realizadas	30
4.2.3 Análise estatística.....	31
4.3. Resultados e Discussão	32
4.4 Conclusão.....	40
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
6 FATORES INTERFERENTES NA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE CRU DESTINADAS A ANÁLISE DE CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS.....	44
RESUMO.....	44
6 FACTORS INTERFERING IN CONSERVATION OF RAW MILK SAMPLES DESTINED TO ANALYSIS OF STANDARD COUNTING ON PLATES	45
ABSTRACT	45
6.1 Introdução	46
6.2 Material e Métodos	47
6.2.1 Amostras.....	47

6.2.2 Análises realizadas	48
6.2.3 Análise estatística.....	49
6.3. Resultados e Discussão	50
6.4 Conclusão.....	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o regulamento técnico vigente de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite é a Instrução Normativa nº 62 (IN 62), de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, estabelece teor mínimo de gordura de 3%; proteína total mínimo de 2,9%; extrato seco desengordurado (ESD) de 8,4%; unidade formadora de colônia máximo 300.000/ml e contagem de células somáticas máximo 500.000/ml, sendo este requisito microbiológico e de células somáticas para o período de 01 de julho de 2014 a 30 de junho de 2016, nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste (MAPA, 2011).

Com base na IN 62, empresas do setor de laticínios estão trabalhando e remunerando o produtor pela qualidade do leite produzido, pois a normativa prevê valores tanto para a composição físico-química quanto para os constituintes microbiológicos (contagem bacteriana total (CBT)) e de contagem de células somáticas (CCS). Os constituintes físico-químicos do leite são influenciados pela estação do ano, fase produtiva da vaca e principalmente pela nutrição do rebanho leiteiro. A CCS e a CBT são ferramentas utilizadas para avaliar a saúde da glândula mamária, higiene de ordenha, eficiência de armazenagem e condições de transporte. Assim, as análises de composição do leite, bem como as de CBT e CCS tornam-se ferramenta indispensável no gerenciamento das propriedades leiteiras, resultando em maior lucratividade da atividade devido ao pagamento pela qualidade do produto e direcionam a qualidade do leite recebido nas indústrias de laticínios.

A IN 62 determina também que o setor de laticínios efetue com periodicidade mínima, uma análise mensal para CBT, CCS e composição. Essas devem ser realizadas em uma unidade operacional da Rede Brasileira de Laboratórios para Controle da Qualidade do Leite, independente das análises efetuadas pelo controle de qualidade interno. Ainda a IN 62 salienta que as amostras devem ser transportadas em caixas térmicas higienizáveis, na temperatura e demais condições recomendadas pelo laboratório que procedera às análises (MAPA, 2011).

De acordo com Cassoli et al. (2010), o Brasil difere-se de muitos países que utilizam somente a refrigeração como método de conservação das amostras, devido a possibilidade de análise em tempo inferior a 48 horas. Desta forma, no país faz-se necessário a adição de conservantes nas amostras destinadas às análises de qualidade do leite, devido a grande extensão territorial do país e também ao grande número de propriedades leiteiras.

Mediante ao exposto, as principais estratégias utilizadas pelos laboratórios na conservação das amostras é a adição de conservantes químicos podendo ser associados ao resfriamento das amostras. Segundo diversos autores (MONARDES et al., 1996; GONZALO et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2005) o principal conservante utilizado na conservação das amostras para a análise de composição físico e química é o bronopol. Em relação à CBT, o principal conservante de amostras de leite cru, atualmente é o azidiol, podendo a amostra ser analisada até sete dias após a coleta se mantida a temperatura de 7°C, sem congelamento e sem aquecimento (CASSOLI et al., 2010).

Desta forma, este estudo foi realizado objetivando comparar três métodos de conservação (sem adição de conservante, azidiol e bronopol), na conservação de leite cru destinado a análise de CBT pelo método de contagem padrão em placas, composição centesimal (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos desengordurados), pH e do ponto de congelamento do leite. O trabalho também teve como objetivo estudar a influência do período de armazenamento (dias), temperatura (refrigerado e não refrigerado) e a qualidade microbiológica inicial de amostras de leite cru.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de leite no Brasil

Em 2014 a produção nacional de leite foi de 35,17 bilhões de litros, apresentando-se 2,7% superior à produção de leite registrada no ano de 2013 (IBGE, 2015). Considerando o cenário mundial no ano de 2014, o Brasil ocupou a quinta posição no ranking, ficando atrás da União Européia, Índia, Estados Unidos e China (USDA, 2015).

A região Sul, representada pelo Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, no ano de 2014, pela primeira vez na série de dados, foi a região com maior produção, representando 34,7% da produção nacional, desbancando a histórica região Sudeste que, neste ano, representou 34,6% da produção de leite do Brasil (IBGE, 2015). O estado de Minas Gerais manteve-se como maior produtor no ano de 2014, com produção de 9,37 bilhões de litros. O Rio Grande do Sul colocou-se como o segundo estado maior produtor, seguido pelo Paraná. Os municípios de Castro (PR), Piracanjuba (GO) e Patos de Minas (MG), tiveram destaque em termos municipais na produção de leite (IBGE, 2015).

A região Sul além de ser a região mais produtora, também apresentou a maior produtividade nacional (2.789 litros/vaca/ano), sendo maior que a média da produção de leite no Brasil (1.525 litros/vaca/ano), que apresentou um crescimento de 2,2% quando comparada a produtividade de 2013 (1.492 litros/vaca/ano). O Rio Grande do Sul apresenta atualmente a maior produtividade de leite do Brasil, com 3.034 litros/vaca/ano, seguido este de Santa Catarina e Paraná com 2.694 e 2.629 litros/vaca/ano, respectivamente. Os municípios brasileiros que apresentaram as três maiores médias de produtividade em 2014 foram: Araras (SP), Castro (PR) e Carlos Barbosa (RS) (IBGE, 2015).

Em contraponto ao expressivo aumento na produção de leite no Brasil, no período entre 2000 e 2010, o país se destacou pelo elevado número de fazendas que abandonaram a atividade leiteira. Cerca de 3,2% dos produtores deixaram a atividade leiteira e passaram a exercer outras atividades agropecuárias. Neste mesmo período, entre os maiores produtores mundiais o Brasil apresentou-se em primeiro lugar em crescimento na quantidade de vacas por fazenda (5,3% ao ano) e o primeiro em crescimento relativo da produção por estabelecimento. Devido ao fato de que a indicação de tecnologia de produção (genética,

nutrição e manejo) vem evoluindo, o Brasil ocupa o quarto lugar com maior crescimento em produção por vaca (EMBRAPA, 2011).

De acordo com Zoccal et al. (2011), a pecuária leiteira no Brasil apresenta duas características marcantes; a primeira é que a produção ocorre em todo o território nacional, e a segunda é a não existência de um padrão de produção. A diversidade dos sistemas de produção de leite é muito grande e ocorre em todos os estados do país; existem propriedades de subsistência, sem nenhum tipo de técnica e com produção diária menor que 10 litros, até produtores comparáveis aos mais competitivos mundialmente, usando tecnologias avançadas e com produção superior a 60.000/litros/dia.

Ainda segundo os mesmos autores, no país observa-se existência de um grande número de estabelecimentos que desenvolvem a atividade leiteira em condições ainda precárias, onde os produtores, com volume muito baixo de produção, praticam um tipo de exploração muito aquém do que é a expectativa de um sistema eficiente e sustentável, mesmo existindo no Brasil tecnologias desenvolvidas e adaptadas às condições climáticas, que podem mudar a situação desse perfil de produtores (ZOCCAL et al., 2011).

2.2 Constituintes e qualidade do leite

O leite, de maneira geral, é um produto da secreção mamária de todos mamíferos, que tem a função biológica de fornecimento de nutrientes e proteção imunológica para o neonato. Além dessas funções biológicas, o leite ainda oferece diversas possibilidades de processamento industrial para obtenção de produtos destinados a alimentação humana (SANTOS e FONSECA, 2007).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) no artigo 475, leite é o produto oriundo de ordenha completa, interrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e bem descansadas (MAPA, 1952).

De maneira mais detalhada, o leite é uma combinação de diversas substâncias em água, como: suspensão coloidal de micelas de caseína ligadas a cálcio e fósforo; emulsão de glóbulos de gordura e vitaminas lipossolúveis; solução de lactose, proteínas solúveis em água, sais minerais e vitaminas hidrossolúveis (SANTOS e FONSECA, 2007). Desta forma então, a água é o componente mais abundante do leite, onde se encontram as soluções acima descritas. Alguns minerais encontram-se na solução iônica; a lactose e a albumina aparecem como

solução verdadeira; a caseína e os fosfatos no estado de dispersão coloidal e a gordura encontra-se na forma de pequenos glóbulos dispersos, e assim constituindo uma emulsão (TRONCO, 2013).

De acordo com Tronco (2013), os termos sólidos totais (ST) ou então extrato seco total (EST) compreendem-se os componentes do leite, com exceção da água e esse encontra-se num percentual médio de 12,7%. Sólidos não-gordurosos (SNG) ou extrato seco desengordurado (ESD), entende-se todos constituintes do leite, subtraindo-se o percentual de água e o teor de gordura e, desta forma, apresenta 9,1% na composição do leite. A IN 62 determina que o extrato seco desengordurado apresente requisito mínimo de 8,4 g para cada 100 g (MAPA, 2011).

A gordura do leite encontra-se na forma de emulsão de glóbulos graxos e está presente numa proporção de 3,5%. A gordura em maior parte é constituída por triglicerídeos (97-98%), e em menores quantidades, na forma de esteróis, ácidos graxos livres e fosfolipídios. Os glóbulos encontram-se envoltos por uma membrana de natureza proteica na qual, ficam aderidos os fosfolipídios, proteínas e outras substâncias (TRONCO, 2013).

Ainda, o leite bovino apresenta cerca de 3,2 a 3,5% de proteína na sua constituição, sendo que, 95% dos compostos nitrogenados ocorrem como proteína e 5% como compostos nitrogenados não-proteicos. Aproximadamente 80% do nitrogênio proteico do leite é constituído pela caseína e os demais 20% por proteínas do soro (TRONCO, 2013). De acordo com Santos e Fonseca (2007), a fração de compostos nitrogenados não-proteicos (NNP), que compõe aproximadamente 5% do total de nitrogênio do leite, são sobretudo de origem sanguínea, que incluem principalmente substâncias como a ureia, creatina e a creatinina.

A lactose é encontrada totalmente em solução verdadeira na fase aquosa do leite, tratando-se de um dissacarídeo formado por glicose e galactose e apresenta-se numa proporção de aproximadamente 48 gramas/litro (TRONCO, 2013).

A lactose, conforme Santos e Fonseca (2007) é o principal carboidrato encontrado no leite e ainda é o principal determinante do volume de leite produzido. A lactose representa 50% da pressão osmótica do leite e assim, juntamente com íons de sódio, cloro e potássio, exercem papel fundamental no controle da pressão osmótica na glândula mamária, então, quando ocorre redução da concentração de lactose, como na mastite, existe uma compensação pelo aumento da concentração de minerais solúveis no leite. A secreção de lactose dentro do lúmen alveolar estimula a passagem de água, efetuando importante controle do volume de leite, onde cada micrograma de lactose é capaz de arrastar aproximadamente dez vezes o seu peso em água.

Os minerais presentes no leite, representam cerca de 0,6 a 0,8% do seu peso. Dentre os minerais encontrados, o cálcio e o fósforo encontram-se ligados a caseína na forma de um complexo de fosfocaseinato de cálcio. Além do cálcio e do fósforo, também são encontrados no leite em quantidades bastante reduzidas o sódio, potássio, magnésio, flúor, iodo, enxofre, cobre, zinco, ferro, etc. O leite ainda contém vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e lipossolúveis (B e C), além de enzimas naturais como as lipases, peroxidases, catalase, fosfatase, etc (TRONCO, 2013).

2.3 Qualidade microbiológica do leite

O leite torna-se um excelente meio de cultura para os microrganismos, devido as suas características intrínsecas, como alta atividade de água, pH próximo ao neutro e sua riqueza de nutrientes. Isso acontece porque as substâncias inibitórias para os microrganismos, como as lactoperoxidase e aglutininas, presentes no leite cru recém-ordenhado, são inativadas rapidamente (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A lactoferrina presente no leite também possui atividade antimicrobiana, sendo essa uma proteína que inibe a multiplicação dos microrganismos através da retirada de íons de ferro do leite (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Durante a síntese do leite, nas células epiteliais da glândula mamária dentro dos alvéolos, o leite é considerado estéril, porém este pode ser contaminado por microrganismos ainda no interior da glândula mamária infectada, e, posteriormente pela pele e pêlos do úbere e dos tetos, e a superfície interna dos equipamentos de ordenha e tanque de resfriamento. Mas quando o leite é ordenhado do úbere de vacas sadias, a contagem de microrganismos é bastante reduzida, onde apresenta níveis inferiores a 1.000 bactérias/mL (SANTOS e FONSECA, 2007).

A contagem de bactérias totais (CBT) ou então a carga microbiana, que atualmente não deve ultrapassar o máximo 300.000/ml de leite, está relacionada com a contaminação inicial do leite e com a taxa de multiplicação dos microrganismos, e está relacionada diretamente com a temperatura do leite, que deve ser de no máximo 4°C, dentro de duas horas até o término da ordenha (TRONCO, 2013).

A temperatura e o período de armazenamento do leite determinam, de maneira seletiva e pronunciada, a intensidade de desenvolvimento das diversas espécies microbianas

contaminantes. As temperaturas baixas inibem ou reduzem a multiplicação da maioria das bactérias e diminuem a atividade de enzimas degradativas (ARCURI et al., 2006).

As bactérias podem ser classificadas em três categorias distintas com relação a faixa ótima de temperatura para multiplicação, essas podem ser: psicrófilas, mesófilas e termófilas. A faixa ótima de crescimento dos microrganismos psicrófilos encontra-se entre 0 e 15°C; mesófilas entre 20 e 40°C e termófilas entre 44 e 55°C. Além dessas, também são importantes as bactérias psicrotróficas e as termodúricas, onde as psicrotróficas são capazes de multiplicarem a temperatura inferior a 7°C (independente de sua temperatura ótima de crescimento) e as bactérias termodúricas, correspondem ao grupo capaz de resistir ao tratamento térmico (SANTOS e FONSECA, 2007).

A carga microbiana inicial se refere à concentração de microrganismos existentes no leite armazenado no tanque resfriador, imediatamente depois de se realizar a ordenha. A carga microbiana inicial é influenciada pela carga microbiana dentro da glândula mamária, limpeza do úbere, higiene dos equipamentos e também com a água utilizada nos procedimentos de ordenha. Deve-se considerar também que os fatores higiene, tempo e temperatura de armazenamento são de extrema importância na qualidade microbiológica do leite e determinam a CBT dos tanques de resfriamento (TRONCO, 2013).

De acordo com Tronco (2013), a CBT é utilizada como um indicativo da qualidade higiênica do leite. Nessa análise é feita a contagem do número de colônias presentes em uma amostra, por meio de diluições decimais seriadas, onde o resultado final é expresso em UFC/mL. Contagens totais de bactérias mesófilas elevadas podem indicar matéria-prima muito contaminada, devido a falta de higiene na produção, limpeza e desinfecção insuficiente e ainda condições de tempo e temperatura inadequada durante a produção. Desta forma, a contagem total de microrganismos no leite cru pode variar de contagem menor a 1.000 UFC/mL (quando a contaminação durante a obtenção foi mínima), até contagem com valores superiores a 10^6 UFC/mL.

A legislação brasileira (IN 62) estabelece como requisito microbiológico máximo de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL, (a partir de 01.7.2016 nas regiões sul, sudoeste e centro-oeste e a partir de 01.7.2017 nas regiões norte e nordeste), sendo que este deve ser avaliado pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) e com periodicidade mínima de uma análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses (MAPA, 2011).

As bactérias lácticas, que compõem o leite, possuem grande importância no caso do leite e produtos lácteos (os fermentos lácteos). A ação maléfica desse grupo de microrganismos, considerando leite cru, deve-se ao fato de que essas bactérias metabolizam a

lactose, formando proporções significativas de ácido láctico e de ácido pirúvico, que, ao se acumularem no leite, causam redução do pH, e conseqüentemente causam desestabilização de proteínas, principalmente a precipitação da caseína, alterando assim as características do produto. Pertencentes ao grupo de bactérias lácticas estão às famílias *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae* e também alguns representantes identificados como agentes causadores de mastite (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* etc). Uma medida eficaz para deter a ação das bactérias lácticas é realizar a refrigeração do leite, já que as bactérias lácticas são micro-organismos mesófilos ou termófilos, que param a sua proliferação em temperaturas abaixo de 8 a 10°C (ORDÓÑEZ, 2005; TRONCO, 2013).

Outro grupo microbiano importante no leite são os estafilococos, que são anaeróbios facultativos e provocam fermentação acidificante da glicose com diminuição acentuada do pH (até 4,3 e 4,5). A maior preocupação com esse grupo de microrganismos ocorre devido aos estafilococos patogênicos (*Staphylococcus aureus*) produtores de enterotoxinas. Estes microrganismos são termolábeis, mas a toxina é termorresistente, desta forma, se houver condições de produção desta enterotoxina, mesmo o leite sendo submetido a processo de pasteurização posterior, ela não será destruída (TRONCO, 2013).

Na microbiota do leite, também podem haver formas de bactérias esporuladas, que são capazes de resistir a tratamentos térmicos elevados. Os dois gêneros de maior interesse no caso específico de leite são os *Bacillus* e *Clostridium*. Nos laticínios, a maior preocupação com tais bactérias está relacionada com os leites esterilizados. O conceito de leite esterilizado implica em chegar a um produto com estabilidade microbiológica, o que se consegue com a utilização de tratamentos térmicos que objetivam a destruição de todos os microrganismos viáveis, mas o que ainda preocupa a indústria nesse assunto é a termoresistência dos esporos das bactérias, que mesmo após o tratamento térmico ainda podem causar dano ao produto, como redução do tempo de vida de prateleira (ORDÓÑEZ, 2005; VIDAL-MARTINS et al., 2005).

As bactérias psicrótróficas são aquelas bactérias que apresentam temperaturas ótimas de crescimento entre 20 e 40°C, porém podem crescer em temperaturas abaixo de 7°C (SANTOS e FONSECA, 2007). Esse grupo de bactérias produzem enzimas que são capazes de degradar o leite, lipases e proteases, que apresentam termoestabilidade, podendo assim continuar agindo nos produtos lácticos já elaborados, uma vez que as condições de temperatura, armazenamento e pH forem as adequadas, dando margem assim a degradação do material protéico e lipídico nos lácteos e seus derivados (MALACRINO et al., 2001; ORDÓÑEZ, 2005).

Os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Listeria*, *Yersinia*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcace* *Clostridium* são as principais bactérias psicrotróficas. *Listeria*, *Yersinia* e *Bacillus*, ainda são microrganismos capazes de provocar doenças em humanos por ingerir leite cru (SANTOS e FONSECA, 2007).

De acordo com Arcuri et al. (2008), o número de bactérias psicrotróficas presentes no leite cru está relacionado às condições higiênicas na produção e ao tempo e à temperatura em que o leite é armazenado. Uma baixa contagem de psicrotróficos no leite é de fundamental importância para sua qualidade, pois a atividade metabólica desses microrganismos resultam em alterações bioquímicas nos constituintes do leite que limitam a vida de prateleira dos produtos lácteos.

Dentre os principais grupos de microrganismos presentes no leite cru, também podemos citar as enterobactérias, que são importantes sob o ponto de vista higiênico e o tecnológico. Sobre o ponto de vista relacionado a higiene, diversas espécies dessa família são responsáveis por doenças infecciosas que podem até apresentar caráter endêmico (salmonelose, shigelose etc). Em relação ao âmbito tecnológico, os maiores problemas estão relacionados à fermentação de açúcares, com formação de gases (CO₂ e H₂) e ácidos, além da formação de substâncias viscosas ou de sabor desagradável. Em relação às enterobactérias, os gêneros mais importantes são *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella* e *Shigella sp.* (TRONCO, 2013).

O grupo coliforme é formado por diferentes gêneros que incluem bactérias aeróbias e anaeróbias fermentativas, não formadoras de esporos e com capacidade de fermentação da lactose e, conseqüentemente, produção de gás, ácido lático e de outros ácidos orgânicos. Geralmente esses são utilizados como microrganismos testes no monitoramento da qualidade microbiológica de processos em laticínios, uma vez que, se detectados no leite pasteurizado ou em seus derivados, a partir deste, podem indicar um sistema de limpeza deficiente (CASTANHEIRA, 2012).

2.4 Coleta de amostras

Uma das fontes de variação dos resultados de composição e qualidade do leite das propriedades leiteiras está relacionada com incorreto procedimento de coleta de amostra de leite, isso quando a amostragem é realizada sem adequada agitação do tanque de

armazenamento do leite. O leite em repouso tende a acumular a gordura na camada superior, a qual está associada os microrganismos e células somáticas do leite e desta forma levam a resultados errôneos quanto à composição e qualidade da matéria prima. Por mais que seja um ponto crítico na credibilidade dos resultados de composição e qualidade do leite, não existe unanimidade sobre os procedimentos para agitação do leite antes da coleta de amostras, onde o objetivo de qualquer procedimento de homogeneização do leite deve ser a garantia de que a amostra coletada represente a composição do tanque sem, no entanto, causar alterações da qualidade, com a ruptura dos glóbulos de gordura, que pode ocorrer quando submetido à excessiva agitação (SANTOS e FONSECA, 2007).

A coleta de amostras de leite individual deve ser criteriosa, para que as mesmas possam refletir a sua real composição, tornando-se verdadeiramente representativa do leite como um todo. Porém, com diferentes tipos de ordenha e metodologias de coleta, podem ocorrer variações nos teores dos seus componentes, produzindo resultados desiguais na análise laboratorial de uma mesma amostra de leite (REIS et al., 2007).

Como principal estratégia na conservação das amostras, está a adição de conservantes químicos, podendo estes serem ou não associados a resfriamento das amostras. Segundo autores (MONARDES et al., 1996; GONZALO et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2005), o principal conservante utilizado na conservação das amostras para a análise de composição físico e química é o bronopol. No Brasil o Bronopol (Microtabs[®]) é utilizado na forma de pastilhas contendo 8 mg de bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) e 0,3 mg de natamicina (D&F CONTROL SYSTEMS, 2009). O bronopol trata-se de um conservante bactericida, esse também é utilizado na conservação de cosméticos e preparações farmacêuticas, pois possuem a vantagem de não causar reações alérgicas (ARDÖ, 1982).

Com relação à CBT, atualmente o principal conservante de amostras de leite cru é o azidiol, podendo a amostra ser analisada até 7 dias após a coleta se mantida a temperatura de 7°C, sem congelamento e sem aquecimento (CASSOLI et al., 2010). O azidiol tem efeito bacteriostático e é composto de azida sódica, cloranfenicol, etanol, citrato de sódio e azul de bromofenol, sendo que a azida sódica trata-se de um inibidor do processo de respiração aeróbia, por interferir na cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria (LEITE, 2006).

A refrigeração e o armazenamento sob refrigeração constituem um dos métodos mais brandos de conservação, pois as velocidades das reações químicas e enzimáticas diminuem em termos logarítmicos com a temperatura, portanto, a refrigeração permite controlar a perda de qualidade dos alimentos decorrente da atividade fisiológica ou de reações químicas como,

oxidação de lipídeos, degradação de pigmentos e vitaminas e desnaturação de proteínas (ORDÓÑEZ, 2005).

Em muitos países, a adição de algum tipo de conservante nas amostras de leite não se faz necessário, devido à curta distância entre as propriedades e os laboratórios de análises. No Brasil, em função do grande número de propriedades e da própria extensão territorial, impossibilita a coleta e análise em 48 horas, sendo assim, recomenda-se a utilização de conservantes no processo de coleta, transporte e análise do leite (CASSOLI et al., 2010). Isso porque o leite é um excelente meio de cultura para os microrganismos devido a suas características intrínsecas, como alta atividade de água, pH próximo ao neutro e riquezas em nutrientes e as substâncias inibitórias para os microrganismos, como lactoperoxidase e aglutininas, presentes no leite cru recém ordenhado, são inativadas rapidamente após a refrigeração (FRANCO et al., 2008).

Martins et al. (2009) avaliaram o efeito do conservante bronopol em comparação ao azidiol líquido com corante azul de bromofenol na CBT, em amostras de leite cru submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento. Os autores constataram que o efeito do conservante bronopol pode ser influenciado pelo nível de contaminação do leite cru, tratando-se de um produto que possui efeito tanto bacteriostático em amostras de leite com CBT abaixo de 10^5 UFC/mL, quanto bactericida em amostras com CBT superiores a 10^6 UFC/mL. Ainda segundo os autores, a CBT obtida nas amostras de leite cru conservadas com bronopol foi inferior àquela obtida nas amostras com azidiol. A eficiência do azidiol na amostra de leite cru, destinada à CBT como agente bacteriostático, foi dependente da menor temperatura de armazenamento da amostra, independente do nível de contaminação inicial e, a amostra de leite cru destinada à CBT, pode ser analisada em até uma semana depois de colhida, se ela for adicionada de azidiol e mantida sob refrigeração em temperatura entre 1°C e 4°C .

De acordo com Sánchez et al. (2005), quando for dispensado o uso de conservantes químicos se recomenda que as amostras sejam refrigeradas e não ultrapassem temperaturas superiores a 4°C . Sierra et al. (2006), relatam que o tempo decorrido entre a coleta da amostra e sua análise influencia diretamente nos resultados, sendo que estes autores recomendam o tempo máximo de 4 dias para a análises de composição sem a utilização de conservante. Cassoli et al. (2010) obtiveram valores semelhantes para os índices de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e CCS, analisados até 7 dias após a coleta, independente da temperatura de armazenagem das amostras, desde que essas amostras fossem conservadas com bronopol.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E. F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

ARDÖ, Y. Bronopol as a preservative in Milk. **Milchwissenschaft**, v.37, n.3, p.139-142, 1982.

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, p. 434-439, 2010.

CASTANHEIRA, A. C. G. **Controle de qualidade de leite e derivados**. São Paulo: Cap-Lab Indústria e Comércio Ltda, 2012. 368p.

D&F CONTROL SYSTEMS. [2009]. **MicrotabslI**. Disponível em: <http://browse.uk-plc.net/Companies/Sampling_Solutions_Ltd/products/Broad_Spectrum_Microtabs_II.htm> Acesso em maio de 2015.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. [2011] **Sistema de produção de leite para diferentes regiões do Brasil**. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/content/sistemas-deprodu%C3%A7%C3%A3o-de-leite-para-diferentes-regi%C3%B5es-do-brasil>. Acesso em novembro de 2014.

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

GONZALO, C., et al. Evaluation of rapid somatic cells counters under different analytical conditions in ovine milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3623- 3628, 2004.

LEITE, M.O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. 2006. 62 f. Tese – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MALACRINO, P. et al. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. **Journal of Microbiology Methods**, v.45, p.127-134, 2001.

MAPA, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [1952]. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA**. Disponível em:http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf. Acesso em junho de 2015.

MAPA, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 30 de dez de 2011. Disponível em:<<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=30/12/2011&jornal=1&Pagina=6&totalArquivos=160>>. Acesso em: 27 jan. 2012.

MARTINS, M.E.P., et al. Conservantes Bronopol e Azidiol: Influência do binômio tempo/temperatura na contagem bacteriana total do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.627-633, 2009.

MONARDES, H.G., et al. Preservation and storage mechanisms for raw milk samples for use in mik-recording schemes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n.2, p. 151-154, 1996.

ORDÓÑEZ, J.A., **Tecnologia de Alimentos**, Alimentos de origem animal, vol. 2, 279p. Porto Alegre: Artmed, 2005.

REIS, G.L., et al. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1134-1138, 2007.

SIERRA, D., et al. Temperature effects on somatic cell counts in goats milk. **International Dairy Journal**, Londres, v. 16, p. 385-387, Apr. 2006

SANCHEZ, A., et al. Influence of storage and preservation on somatic cell count and composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**.v.88. p.3095- 3100, 2005.

SANTOS, M.V., FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri – SP. Editora Manole Ltda, 2007. 314p.

TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria. Editora da UFSM, 2013. 207p.

VIDAL-MARTINS A.M.C., ROSSI JR. O.D., REZENDE-LAGO, N.C.. Mesophilic heterotrophic microorganisms and spore forming bacteria from *Bacillus cereus* group in ultra high temperature milk. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.57, n.3, Belo Horizonte. Junho 2005

ZOCAL, R., ALVES, E.R., GASQUES, J.G. **Diagnóstico da pecuária de leite nacional. Estudo preliminar para contribuição para o plano pecuário 2012**, Embrapa Gado de Leite. Dezembro de 2011.

4 INFLUÊNCIA DO BINÔMIO TEMPERATURA/TEMPO NA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE DESTINADAS A ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS

RESUMO

Este estudo objetivou verificar métodos de conservação de amostras de leite cru submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento, destinadas posteriormente a análises físico-químicas e contagem de padrão em placas. Foram adotados três métodos: sem adição de conservantes, com adição de azidiol ou bronopol. O trabalho foi realizado no Laboratório de Qualidade de Leite e Derivados da Universidade Federal de Santa Maria em Palmeiras das Missões – RS. A coleta do leite cru, a 4°C, foi feita direto do tanque de expansão em uma fazenda do município e armazenada em caixa isotérmica e transportada até o laboratório. O leite foi subdividido em 100 amostras de 40 ml cada. Destas, 20 amostras não receberam adição de conservante, em 40 amostras foi adicionado azidiol e nas 40 restantes, bronopol. As amostras foram fracionadas e identificadas de acordo com o método de conservação e temperatura de armazenagem: T1 (Azidiol/ambiente), T2 (bronopol/ambiente), T3 (azidiol/refrigerado), T4 (bronopol/refrigerado) e T5 (sem conservante/refrigerado). Avaliaram-se cinco tempos (dia 0, 1, 3, 5, 7) e duas temperaturas de armazenagem: Temperatura ambiente (20,7 a 22,6 °C) e Temperatura refrigerada (3,9 a 5°C), as amostras sem conservantes foram armazenadas na geladeira. Foi utilizado delineamento em blocos casualizados com arranjo fatorial de 3 (métodos) x 2 (temperaturas) x 5 (tempos). A CBT foi influenciada pelo conservante, pois aos sete dias de armazenagem a amostra sem conservante apresentou maior CBT em relação às demais. Nas amostras com bronopol sem refrigeração houve redução gradual de CBT. Observou-se que as amostras conservadas com azidiol, independente da temperatura de armazenagem, reduziram a contagem bacteriana ao longo do tempo. Não houve observação de efeito sobre a composição físico-química do leite. A temperatura influenciou o teor de gordura ($P < 0,001$), pois houve aumento nas amostras mantidas refrigeradas em relação à temperatura ambiente. Os teores de proteína, lactose, sólidos desengordurados e densidade média do leite foram influenciados pelo tipo de conservante e dias de armazenagem ($P < 0,001$). O pH foi influenciado pelo tipo de conservante e pelos dias de armazenagem ($P < 0,001$). Para análises de CBT, o uso de azidiol, independente de refrigeração ou armazenagem, é o método mais adequado para manter as características originais do produto. A partir do primeiro dia de armazenagem das amostras ocorre aumento dos teores médios de proteína, lactose e sólidos desengordurados em relação aos quantificados no dia da coleta.

Palavras-chave: azidiol, bronopol, contagem bacteriana total, qualidade do leite

4 INFLUENCE OF THE BINOMIAL TEMPERATURE / TIME IN MILK SAMPLES CONSERVATION DESTINATED TO PHYSICOCHEMICAL ANALYSES AND STANDARD COUNTING ON PLATES

ABSTRACT

This study aimed to verify conservation methods of raw milk samples under different temperatures and storage periods, later destined to physical and chemical analysis and standard plate count. Three methods were used: no added preservatives, adding azidiol or bronopol. The analyses were performed in the Laboratory of Milk Quality and Dairy Products of the Universidade Federal de Santa Maria in Palmeira das Missões - RS. The collection of raw milk at 4 ° C, was done directly from an expansion tank in a farm in the same city and stored in isothermal box and transported to the laboratory. The milk was divided into 100 samples of 40 ml each. Of these, 20 samples did not receive addition of preservative; in 40 samples were added azidiol and the remaining 40, bronopol. Samples were fractionated and identified according to the method of preservation and storage temperature: T1 (azidiol / environment), T2 (bronopol / environment), T3 (azidiol / cooled), T4 (bronopol / cooled) and T5 (no preservative / cooled). They were evaluated five times (day 0, 1, 3, 5, 7) and two storage temperature: Environment temperature (20.7 to 22.6 ° C) and refrigerated temperature (3.9 to 5 ° C,) the samples without preservatives were stored in the refrigerator. It was used a randomized block design with factorial arrangement of 3 (methods) x 2 (temperature) x 5 (times). The TBC was influenced by the preservative, because at the seventh day of storage the sample without preservative showed higher TBC in relationship to the others. In the unrefrigerated samples with bronopol there was a gradual reduction of TBC. It was observed that the samples preserved with azidiol, regardless of storage temperature, reduced the bacterial count over time. There was no effect on the physico-chemical composition of milk. The temperature affected the fat content ($P < 0,001$), as there was an increase in the samples kept refrigerated relative to environment temperature. The protein, lactose, solids and milk medium density were influenced by the type of preservative and storage days ($P < 0,001$). The pH was influenced by the type of preservative and the storage days ($P < 0,001$). For analyzes of TBC, the use of azidiol, independent of refrigeration or storage, is the most appropriate method to maintain the original characteristics of the product. From the first day of storage of the samples there is an increase of the mean protein values, lactose and degeared solids in relation to quantified on the collection day.

Keywords: azidiol, bronopol, total bacterial count, milk quality

4.1 Introdução

Em muitos países a adição de algum tipo de conservante nas amostras de leite não se faz necessário, devido a curta distância entre as propriedades e os laboratórios de análises. No Brasil, em função do grande número de propriedades e da própria extensão territorial, há a impossibilidade da coleta e análise do leite em 48 horas, sendo assim, recomenda-se a utilização de conservantes em seu processo de coleta, transporte e análise (CASSOLI et al., 2010).

A principal estratégia utilizada na conservação das amostras é a adição de conservantes químicos, podendo estes estarem ou não, associados ao resfriamento das amostras. Segundo autores (MONARDES et al., 1996; GONZALO et al., 2004; SÁNCHEZ et al., 2005) o principal conservante utilizado na preservação das amostras para a análise de composição físico e química é o bronopol. No Brasil, o Bronopol (Microtabs[®]) é utilizado na forma de pastilhas contendo 8 mg de bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) e 0,3 mg de natamicina (D&F CONTROL SYSTEMS, 2009). Com relação à contagem bacteriana total, atualmente o principal conservante de amostras de leite cru é o azidiol, podendo a amostra ser analisada até 7 dias após a coleta se mantida a temperatura de 7°C, sem congelamento e sem aquecimento (CASSOLI et al., 2010).

Sánchez et al. (2005), relataram que quando for dispensado o uso de conservantes químicos, recomenda-se que as amostras sejam refrigeradas e não ultrapassem temperaturas superiores a 4°C. Sierra et al. (2006), relatam que o tempo decorrido entre a coleta da amostra e sua análise influencia diretamente nos resultados, sendo que recomendam o tempo máximo de 4 dias para a análises de composição sem a utilização de conservante. Cassoli et al. (2010), obtiveram valores semelhantes para os índices de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e contagem de células somáticas, analisados até sete dias após a coleta, independente da temperatura de armazenagem das amostras, desde que essas amostras fossem conservadas com bronopol.

Diante do exposto, realizou-se um estudo objetivando verificar o método de conservação (azidiol, bronopol e sem utilização de conservante) de amostras de leite cru submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento, destinadas às análises físico-químicas e contagem padrão em placas.

4.2 Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Qualidade de Leite e Derivados, da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* de Palmeira das Missões/RS no período de 08/12/2014 a 18/12/2014.

4.2.1 Amostras

Uma amostra de leite cru refrigerado (quatro litros) foi coletada em uma fazenda produtora de leite no município de Palmeira das Missões, situada na região Noroeste do Rio Grande do Sul.

A coleta do leite ocorreu diretamente do tanque de expansão, o qual estava com uma temperatura de 4°C no momento da coleta. Inicialmente foi agitado o leite através do agitador automático do equipamento de refrigeração, por um período de 10 minutos, posteriormente foi proferida a coleta do volume que ocorreu com o auxílio de um copo coletor e um funil analítico para facilitar o preenchimento do balão volumétrico, em que foi armazenado o leite. Após a coleta, a amostra foi acondicionada e transportada em caixa isotérmica, contendo gelo reciclável, até o Laboratório de Inspeção e Qualidade de Leite e Derivados do campus da UFSM-PM.

No laboratório, o leite foi subdividido, em 100 sub amostras de 40 ml cada, acondicionadas em frascos estéreis com capacidade de 50 ml. Destas 100 sub amostras, 20 não receberam adição de conservante, 40 receberam a adição de uma unidade de azidiol comprimido (comprimido entre 41 e 50mg – contendo azida sódica e cloranfenicol) e 40 de um comprimido de bronopol (comprimido entre 41 e 50mg, contendo natamicina e bronopol). Após a adição do conservante, os frascos foram homogeneizados, por inversão e reversão, até completa dissolução do conservante no leite.

Avaliaram-se duas temperaturas de armazenamento de amostras: Temperatura ambiente (20,7 a 22,6°C), onde 20 amostras conservadas com azidiol e 20 amostras conservadas com bronopol foram incubadas em estufa. Temperatura refrigerada (3,9 a 5°C), em 20 amostras conservadas com azidiol, 20 amostras conservadas com bronopol e 20 amostras que não receberam a adição de conservante foram armazenadas em geladeira. A temperatura do local de armazenamento das amostras foi aferida com auxílio de termômetro e registrada a cada 4 horas.

Assim, as sub amostras foram distribuídas e identificadas entre os tratamentos: T1- Azidiol/Ambiente – conservado com azidiol em temperatura ambiente; T2 - Bronopol/Ambiente – conservado com bronopol em temperatura ambiente; T3 - Azidiol/Refrigerado – conservado com azidiol em temperatura refrigerada; T4 - Bronopol/Refrigerado – conservado com bronopol em temperatura refrigerada; T5 - Sem conservante/Refrigerado - sem utilização de conservante em temperatura refrigerada.

Após a incubação, nas duas faixas de temperatura, nos diferentes tempos (dia 0, 1, 3, 5 e 7), analisou-se o leite dos 100 frascos, procedendo-se da seguinte forma: para cada tratamento obteve-se quatro repetições e durante os diferentes tempos de análises não se analisou o mesmo frasco, sendo este descartado após cada período, por motivo de possível contaminação da amostra.

4.2.2 Análises realizadas

Todas as amostras de leite foram submetidas a análises de contagem bacteriana e análises físico-químicas (percentual de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos desengordurado, densidade, ponto de congelamento e pH).

As análises de contagem bacteriana (CBT) foram realizadas pelo método de contagem padrão de microrganismos aeróbios mesófilos em placas, método descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002). Utilizaram-se placas descartáveis (90 x 15mm) e estéreis. A preparação do ágar de contagem padrão – PCA e a solidificação das placas foram realizadas no dia anterior a semeadura do inóculo. Para cada amostra foi utilizado três diluições decimais sucessivas empregando como diluente a água peptonada tamponada a 0,1%. Em seguida, foram transferidos, a partir de três diluições selecionadas, 0,1 ml do diluído para as placas de Petri em duplicata, onde o meio já se encontrava vertido e solidificado e com o auxílio de uma alça de Drigalski, flambada, foram então semeados os inóculos nas placas. Posteriormente as placas foram incubadas invertidas na estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 3 horas, seguindo o protocolo de incubação descrito por Walters et al. (1998). Após o período de incubação, foi efetuada a contagem das UFC com o auxílio de um contador de colônias modelo manual. Os resultados foram transformados em logaritmos de base dez (Log 10), para facilitar as análises estatísticas.

As análises físico-químico (percentual de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos desengordurado, densidade, ponto de congelamento) foram realizadas pelo

equipamento MilkoTester, que utiliza o princípio de infravermelho. Antes de realizar a análise, as amostras foram igualmente homogeneizadas. Para cada a higienização do equipamento foi efetuada a cada troca de tratamento.

As análises de pH foram realizadas por meio de pHmetro de bancada (TECNOPON mPA 210), com eletrodo de vidro e que permitiu a leitura direta no dispositivo digital. O eletrodo foi limpo e higienizado a cada troca de tratamento.

4.2.3 Análise estatística

Utilizou-se o delineamento estatístico arranjo fatorial 3 x 2 X 5, sendo que os fatores foram: três tipos de conservação, duas temperaturas de incubação e cinco tempos (dias) de análises.

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System® (SAS, 2001), após verificação da normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias. Para análise dos dados foi utilizado o procedimento MIXED do SAS (2001) de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + C_j + D_k + (C_j \times D_k) + e(a)_{ijk} + (T_i \times C_j) + (T_i \times D_k) + (T_i \times C_j \times D_k) + e(b)_{ijk},$$

em que Y_{ijk} = foi o valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo de temperatura i ; C_j = efeito fixo do conservante; D_k = efeito fixo do dia; $T_i \times C_j$ = efeito fixo de interação entre temperatura e conservante; $T_i \times D_k$ = efeito fixo de interação entre temperatura e dia; $C_j \times D_k$ = efeito fixo de interação entre conservante e dia; $T_i \times C_j \times D_k$ = efeito fixo de interação entre temperatura, conservante e dia; $e(a)_{ijk}$ = erro aleatório associado a cada observação dentro da parcela principal; $e(b)_{ijk}$ = erro aleatório associado a cada observação dentro da subparcela. O efeito de dia de coleta foi analisado como medida repetida no tempo, onde diversas estruturas de erros foram investigadas, e a estrutura escolhida para cada variável avaliada foi de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC). As médias ajustadas foram obtidas utilizando o comando LSMEANS do procedimento MIXED do SAS. Para todas as análises estatísticas a significância foi declarada quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P \leq 0,10$ e as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

4.3. Resultados e Discussão

No presente estudo, a contagem bacteriana total do leite foi influenciada pelo conservante, temperatura, tempo de armazenamento e suas interações ($P < 0,0001$). Ao longo dos sete dias de armazenamento, as amostras de leite conservadas sob refrigeração sem conservante apresentaram maior CBT, enquanto que as amostras conservadas com azidiol a temperatura ambiente ou refrigerado, bem como com bronopol refrigerado, apresentaram CBT intermediária, sem diferença significativa. Porém, amostras conservadas com bronopol sem refrigeração apresentaram redução gradual da CBT ao longo do tempo (Tabela 1). Este resultado pode indicar inibição do crescimento microbiano resultante de acidificação da amostra, principalmente pela atividade de bactérias mesófilas na conversão da lactose do leite em ácido láctico, como podemos observar na Tabela 9, onde as amostras conservadas com bronopol apresentaram menores valores de pH.

Observa-se que a variação da contagem bacteriana ($\text{Log } 10$) do leite (Tabela 1) em função dos tratamentos e tempos de armazenamento. O presente estudo sugere que a utilização de bronopol para conservação de amostras para análise de CBT pode ser utilizado, desde que as amostras permaneçam refrigeradas, enquanto que o uso de azidiol pode ser a melhor alternativa para conservação de amostras de leite não refrigeradas até 7 dias. Cassoli et al. (2010) avaliaram os métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. Os autores observaram que as amostras conservadas com bronopol apresentaram contagem bacteriana total inferior as amostras do tratamento controle, independentemente do tempo de armazenamento das amostras e da temperatura de manutenção das mesmas. Segundo Chemical (2004), o bronopol apresenta efeito bactericida, ou seja, quando utilizado em amostras de leite, esse tipo de conservante elimina os microrganismos presentes.

Tabela 1 - Variação da contagem bacteriana (Log 10) do leite com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento				
	Azidiol		Bronopol		Sem conservante
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado	Refrigerado
0	3,93 ^{aA}				
1	4,40 ^{aA}	4,09 ^{aA}	3,24 ^{bB}	3,41 ^{bB}	4,64 ^{aA}
3	4,13 ^{bA}	3,53 ^{cB}	2,41 ^{dC}	3,25 ^{cB}	4,80 ^{aA}
5	3,28 ^{bB}	3,30 ^{bB}	0,62 ^{cD}	3,10 ^{bB}	5,24 ^{aA}
7	3,28 ^{bB}	3,30 ^{bB}	0,64 ^{cD}	3,10 ^{bB}	5,24 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P > 0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,001$), pelo teste de Tukey.

Leite (2006), avaliando a influência do conservante no armazenamento de amostras destinadas a análises eletrônicas de qualidade do leite, o autor verificou que quando o bronopol foi usado em amostras destinadas à contagem padrão em placas, houve interação entre os efeitos de conservante e tempo, onde as médias obtidas em amostras conservadas com bronopol foram inferiores àquelas obtidas em amostras conservadas com o azidiol líquido e comprimido, apenas em amostras com um dia de armazenamento. Nos demais dias, os efeitos dos três conservantes foram iguais, embora o bronopol sendo considerada uma substância bactericida, não promoveu a redução das contagens bacterianas em placas.

Os dados obtidos neste trabalho, em relação às amostras conservadas com bronopol em temperatura ambiente, também são divergentes aos verificados por Martins et al. (2009), onde os mesmos observaram que as amostras conservadas a 25°C com contagem bacteriana $< 10^5$, apresentaram acentuado crescimento bacteriano.

Para as amostras conservadas com azidiol, independentemente da temperatura de armazenamento, o efeito do tempo de armazenamento foi significativo, em ambos os casos, onde observou-se diminuição da contagem bacteriana total ao longo do tempo de armazenamento das amostras (Tabela 1). Isto pode ser justificado por possíveis injúrias celulares nos microrganismos decorrentes da ação do conservante azidiol que possui azida sódica em sua composição e esta é conhecida como inibidor do processo de respiração aeróbica, por interferir na cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria (LEITE, 2006).

Os valores médios das contagens bacterianas das amostras que não receberam adição de conservante e que foram mantidas refrigeradas, não diferiram ao longo dos sete dias de armazenamento. No entanto, o aumento foi de 1,31 Log ao longo dos setes dias de armazenamento, que pode, eventualmente, prejudicar os produtores de leite devido aos sistemas de pagamento por qualidade do leite impostos pelas indústrias de laticínios.

De acordo com Pinto et al. (2006), as bactérias que estão presentes no leite tem uma alta taxa de replicação, principalmente as psicotróficas, que são os grupos de bactérias que permanecem com atividade acentuada durante a conservação do leite a baixas temperaturas.

Outro fator que deve ser salientado é a baixa contagem inicial de microrganismos do leite utilizado nas amostras, onde o mesmo apresentou 9.000 UFC/mL, desta forma a contagem bacteriana total do leite avaliado apresentou-se bem inferior ao estabelecido pela Instrução Normativa nº 62 (IN 62), de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece máximo de 300.000/ml para unidade formadora de colônia para o período de 01 de julho de 2014 a 30 de junho de 2016, nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste (MAPA, 2011). Apesar da CBT ter sido semelhante em todos os dias de avaliação quando o leite não recebeu adição de conservante e foi mantido em temperatura refrigerada, este método de conservação de amostras não pode ser recomendado sem que haja mais estudos que avaliem a possibilidade de interferência da contagem bacteriana inicial, pois esta pode não condizer com a realidade do país atualmente.

Tabela 2 – Média dos teores de gordura do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento				
	Azidiol		Bronopol		Sem conservante
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado	Refrigerado
0	3,88	3,88	3,88	3,88	3,88
1	3,88	3,97	3,91	3,94	3,84
3	3,81	3,88	3,66	3,91	3,91
5	3,57	3,95	3,55	3,95	3,97
7	3,80	3,90	3,71	3,91	3,47

Não houve efeito de dia, temperatura, e conservante sobre o teor de gordura do leite (Tabela 2). Butler e Stergiadis (2011), em estudo que teve como objetivo testar se o leite conservado com bronopol pode ser usado de forma confiável para a determinação de ácidos graxos, constataram que o uso de bronopol para preservar o leite não tem efeito significativo sobre a composição de ácidos graxos, onde a concentração média foi superior a 4 g/kg de gordura total.

Entretanto, para o teor de proteína do leite (Tabela 3), à partir do primeiro dia de armazenamento das amostras, o teor médio de proteína aumentou em todos os métodos de conservação, exceto nas amostras mantidas sem conservantes sob refrigeração. As amostras mantidas sob refrigeração e sem conservantes apresentaram menor teor médio de proteína do leite durante todos os seis dias posteriores de armazenamento; uma vez que a partir do 1º dia de armazenamento as amostras mantidas sob refrigeração ou temperatura ambiente com azidiol ou bronopol como conservantes, apresentaram aumento no teor médio de proteína do leite.

Tabela 3 – Média dos teores de proteína do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento				
	Azidiol		Bronopol		Sem conservante
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado	Refrigerado
0	3,32 ^{aB}	3,32 ^{aB}	3,32 ^{aB}	3,32 ^{aB}	3,32 ^{aA}
1	3,51 ^{aA}	3,51 ^{aA}	3,48 ^{aA}	3,48 ^{aA}	3,34 ^{bA}
3	3,48 ^{aA}	3,49 ^{aA}	3,44 ^{aA}	3,50 ^{aA}	3,36 ^{bA}
5	3,50 ^{aA}	3,56 ^{aA}	3,46 ^{aA}	3,48 ^{aA}	3,36 ^{bA}
7	3,50 ^{aA}	3,50 ^{aA}	3,47 ^{aA}	3,49 ^{aA}	3,36 ^{bA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P>0,001$), pelo teste de Tukey.

Cassoli et al. (2010), verificaram valores semelhantes entre as amostras conservadas com azidiol e bronopol e mantidas sob refrigeração. Resultado semelhante foi verificado no presente estudo entre o bronopol e o azidiol, mas esses divergiram das amostras conservadas sem conservante. Esse fato pode estar ligado com o crescimento bacteriano, pois quando se realiza a análise dos constituintes físico-químicos do leite pelo método de infravermelho, não

é possível diferenciar quais são as proteínas verdadeiras do leite (caseína, albumina, lactoalbumina, lactoglobulina e imunoglobulinas) das proteínas formadas por nitrogênio não proteico, produzido por alguns grupos de bactérias.

No primeiro momento de avaliação (tempo 0), o teor de lactose do leite foi similar para todos os tratamentos (média = 4,47%) (Tabela 4). De forma semelhante ao que ocorreu com a proteína, à partir do primeiro dia de armazenamento, as amostras apresentaram aumento do teor médio de lactose do leite, principalmente as armazenadas com conservantes. Amostras de leite sem conservantes armazenadas sob refrigeração a partir do 1º dia de conservação apresentaram menores médias de teor de lactose quando comparadas ao teor de lactose do leite armazenado com os demais métodos de conservação. Este resultado sugere que, nas amostras de leite, mesmo mantidas sob refrigeração, pode haver degradação de lactose por atividade microbiana.

Tabela 4 – Média dos teores de lactose do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento				
	Azidiol		Bronopol		Sem conservante
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado	Refrigerado
0	4,47 ^{aA}	4,47 ^{aB}	4,47 ^{aB}	4,47 ^{aB}	4,47 ^{aA}
1	4,47 ^{aA}	4,74 ^{aA}	4,71 ^{aA}	4,71 ^{aA}	4,52 ^{bA}
3	4,71 ^{aA}	4,72 ^{aA}	4,65 ^{aA}	4,74 ^{aA}	4,55 ^{aA}
5	4,72 ^{aA}	4,75 ^{aA}	4,68 ^{aA}	4,71 ^{aA}	4,54 ^{bA}
7	4,73 ^{aA}	4,73 ^{aA}	4,69 ^{aA}	4,71 ^{aA}	4,55 ^{bA}

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P > 0,001$). Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,001$), pelo teste de Tukey.

Os resultados observados neste trabalho em relação ao comportamento da, independentemente do método de conservação é divergente ao relatado por Ordóñez (2005) e Tronco (2013), que atribuem o declínio no teor de lactose com o tempo de armazenamento do leite, a deterioração passível de ocorrer por meio do aumento da temperatura, onde ocorre a transformação da lactose em compostos ácidos e deterioração por meio da fermentação da lactose por microrganismos que degradam esse composto em ácido láctico.

Não foi encontrada diferença significativa entre as médias de sólidos totais do leite referentes ao tipo de armazenamento (Tabela 5). Apesar dos teores de proteína e lactose serem

alterados ao longo dos sete dias de armazenamento, a gordura manteve-se estável durante este período (Tabela 2), o que pode ter diluído o efeito dos demais componentes do leite, resultante da ausência de efeito de tempo sobre o teor de sólidos totais do leite.

O único componente do leite que permaneceu sem alteração durante os sete dias de armazenamento foi à gordura, uma vez que os teores de proteína e lactose aumentaram a partir do 1º dia de conservação. Este resultado sugere que o dia de análise de composição físico-química do leite pode afetar os teores dos componentes acima citados, bem como o teor de sólidos totais do leite. Isto interfere especialmente em sistemas de bonificação/penalização pela qualidade do leite, em que o dia de análise das amostras pode definir o pagamento pelo litro de leite produzido.

Tabela 5 – Média dos teores de sólidos totais do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento				
	Azidiol		Bronopol		Sem conservante
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado	Refrigerado
0	12,57	12,57	12,57	12,57	12,57
1	13,03	13,12	12,99	13,02	12,60
3	12,89	13,03	12,65	13,06	12,71
5	12,69	13,17	12,59	13,05	12,77
7	12,92	13,04	12,78	13,01	12,28

Em relação ao teor de sólidos desengordurados do leite (Tabela 6), à partir do 1º dia de conservação das amostras, houve aumento do teor de sólidos desengordurados do leite, com exceção das amostras armazenadas sem conservante sob refrigeração, que não foram alteradas pelos dias de armazenamento. Este resultado provavelmente ocorreu em resposta às alterações dos teores de proteína e de lactose do leite, pois são os principais elementos que compõem o teor de sólidos desengordurados do leite, e que foram alterados de forma similar pelo método de conservação das amostras.

Tabela 6 – Média dos teores de sólidos desengordurados do leite (em percentual) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento				
	Azidiol		Bronopol		Sem conservante
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado	Refrigerado
0	8,69 ^{aB}	8,69 ^{aB}	8,69 ^{aB}	8,69 ^{aB}	8,69 ^{aA}
1	9,15 ^{aA}	9,15 ^{aA}	9,09 ^{aA}	9,09 ^{aA}	8,76 ^{bA}
3	9,08 ^{aA}	9,12 ^{aA}	8,99 ^{aA}	9,14 ^{aA}	8,81 ^{aA}
5	9,12 ^{aA}	9,21 ^{aA}	9,04 ^{aA}	9,10 ^{aA}	8,80 ^{bA}
7	9,13 ^{aA}	9,14 ^{aA}	9,07 ^{aA}	9,10 ^{aA}	8,81 ^{bA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P>0,001$), pelo teste de Tukey.

Para a densidade média do leite (Tabela 7), no tempo 0, todas as amostras de leite, independente do tratamento, apresentaram densidade média de 1028,04 g/l. Porém, a partir do 1º dia de armazenamento, a densidade média do leite foi elevada, de modo que apenas no 5º dia de armazenamento as amostras de leite mantidas sem conservantes sob refrigeração apresentaram menor densidade do leite quando comparada as amostras submetidas aos demais métodos de armazenamento.

Tabela 7 – Média da densidade do leite (em g/l) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento				
	Azidiol		Bronopol		Sem conservante
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado	Refrigerado
0	1028,04 ^{aB}	1028,04 ^{aB}	1028,04 ^{aB}	1028,04 ^{aB}	1028,04 ^{aA}
1	1029,80 ^{aA}	1029,74 ^{aA}	1029,53 ^{aA}	1029,51 ^{aA}	1028,01 ^{bA}
3	1029,62 ^{aA}	1029,67 ^{aA}	1029,34 ^{aA}	1029,73 ^{aA}	1028,41 ^{aA}
5	1029,94 ^{aA}	1029,80 ^{aA}	1029,65 ^{aA}	1029,53 ^{aA}	1028,36 ^{bA}
7	1029,79 ^{aA}	1029,74 ^{aA}	1029,61 ^{aA}	1029,61 ^{aA}	1028,80 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P>0,001$), pelo teste de Tukey.

O aumento de densidade após o 1º dia de conservação, também pode ser associado às alterações observadas para os variáveis teores de proteína e lactose do leite, uma vez que estes componentes aumentaram a partir do primeiro dia de armazenamento. Como os elementos lactose e proteína são mais densos que a água, enquanto a gordura é menor, o aumento do teor de proteína e lactose do leite podem contribuir com aumento médio da densidade do leite.

O ponto crioscópico do leite (Tabela 8), foi alterado apenas pelo tipo de conservante e dias de armazenamento. No tempo 0, o ponto crioscópico médio do leite foi de -0,545 °H, sendo que os valores médios aumentaram à partir do primeiro dia de armazenamento, exceto para as amostras mantidas sem conservante sob refrigeração, que mantiveram-se estáveis ao longo dos sete dias de armazenamento. As amostras armazenadas sem conservante sob refrigeração, do 1º ao 7º dia apresentaram menor média de crioscopia em relação às amostras tratadas com os demais métodos de conservação.

De acordo com a Instrução Normativa nº 62 (IN 62), de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o ponto crioscópico do leite deve estar entre -0,530 e -0,550 graus Horvert, desta forma sugere-se que as amostras destinadas a essas análises, não podem receber adição de conservante e devem ser analisadas preferencialmente no dia da coleta, para que não haja comprometimento das características originais do produto (MAPA, 2011).

Tabela 8 – Média do ponto de congelamento do leite (em graus Horvert (°H)) com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento				
	Azidiol		Bronopol		Sem conservante
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado	Refrigerado
0	-0,545 ^{aB}	-0,545 ^{aB}	-0,545 ^{aB}	-0,545 ^{aB}	-0,545 ^{aA}
1	-0,577 ^{aA}	-0,577 ^{aA}	-0,574 ^{aA}	-0,572 ^{aA}	-0,552 ^{bA}
3	-0,578 ^{aA}	-0,579 ^{aA}	-0,575 ^{aA}	-0,575 ^{aA}	-0,555 ^{bA}
5	-0,578 ^{aA}	-0,576 ^{aA}	-0,572 ^{aA}	-0,577 ^{aA}	-0,555 ^{bA}
7	-0,576 ^{aA}	-0,578 ^{aA}	-0,571 ^{aA}	-0,577 ^{aA}	-0,552 ^{bA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P > 0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,001$), pelo teste de Tukey.

Amostras de leite armazenadas com bronopol como conservante, a partir do 1º dia de armazenamento apresentaram redução nos valores médios de pH, enquanto que esta redução

observada nas amostras conservadas com os demais métodos não foi significativa (Tabela 9). Este resultado novamente comprova que o azidiol é o melhor método de conservação de amostras para manter a qualidade higiênica/microbiológica do leite, independente da amostra estar ou não refrigerada.

Considerando os resultados de ponto de congelamento, bem como pH do leite, o melhor método de conservação de amostras de leite é a não adição de conservante associada a refrigeração, podendo a amostra ser analisada em até sete dias, sem comprometimento dos resultados. Esses resultados são divergentes aos encontrados por Araújo et al. (2010), que verificaram que a adição do conservante químico bronopol, não alterou os valores de pH e o ponto de congelamento do leite. Esses dados confirmam a possibilidade de análises de pH e ponto de congelamento, sem adição de conservante e mantidos refrigerados, que é prática realizada pelo setor de laticínios nas análises de monitoramento e controle interno realizado no laboratório das empresas.

Tabela 9 – Média de pH do leite com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento				
	Azidiol		Bronopol		Sem conservante
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado	Refrigerado
0	6,03 ^{a A}				
1	5,99 ^{a A}	5,98 ^{a A}	5,96 ^{a A}	5,94 ^{a B}	5,98 ^{a A}
3	5,97 ^{a A}	5,98 ^{a A}	5,93 ^{a A}	5,91 ^{a B}	5,97 ^{a A}
5	5,87 ^{a A}	5,96 ^{a A}	5,84 ^{a B}	5,98 ^{a B}	5,93 ^{a A}
7	5,92 ^{a A}	5,94 ^{a A}	5,84 ^{a B}	5,92 ^{a B}	5,91 ^{a A}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P > 0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,001$), pelo teste de Tukey.

4.4 Conclusão

Para análise de CBT do leite, o uso de azidiol como conservante independente do uso de refrigeração ou não durante a armazenagem, é o método mais adequado para manter as características microbiológicas originais do leite ao longo de sete dias de armazenamento. De outra forma, para as análises de composição físico-química do leite, especialmente para os teores de proteína, lactose e sólidos desengordurados do leite, o número de dias de

armazenamento é um importante fator que deve ser considerado e padronizado nas coletadas de leite nas fazendas. A partir do primeiro dia de armazenamento das amostras, ocorre aumento dos teores médios de proteína, lactose e sólidos desengordurados do leite, em relação aos teores observados quando quantificados no mesmo dia da coleta do leite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 17. ed., Washington, DC: Association Official Analytical Chemists, v.1. 2002.

ARAÚJO, V.M., et al. Comparação de metodologias para a determinação de pH e do ponto de congelamento do leite bovino cru sob diferentes características de conservação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 7, p. 1619-1624.

BUTLER, G., STERGIADIS, S. Suitability of bronopol preservative treated milk for fatty acid determination. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 220-225, 2011.

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, p. 434-439, 2010.

CHEMICAL LAND21. [2004]. **2-BROMO-2NITRO-1,3-PROPANEDIOL**. Disponível em: <http://www.chemicaland21.com/arokorhi/specialtychem/perchem/BRONOPOL.htm>. Acesso em junho de 2015.

D&F CONTROL SYSTEMS. [2009]. **MicrotabslI**. Disponível em: http://browse.uk-plc.net/Companies/Sampling_Solutions_Ltd/products/Broad_Spectrum_Microtabs_II.htm. Acesso em maio de 2015.

GONZALO, C., et al. Evaluation of rapid somatic cells counters under different analytical conditions in ovine milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3623- 3628, 2004.

LEITE, M.O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. 2006. 62 f. Tese – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MAPA, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 30 de dez de 2011. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=30/12/2011&jornal=1&Pagina=6&totalArquivos=160>>. Acesso em: 27 jan. 2012.

MARTINS, M.E.P., et al. Conservantes Bronopol e Azidiol: Influência do binômio tempo/temperatura na contagem bacteriana total do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.627-633, 2009.

MONARDES, H.G., et al. Preservation and storage mechanisms for raw milk samples for use in mik-recording schemes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n.2, p. 151-154, 1996.

ORDÓÑEZ, J.A., **Tecnologia de Alimentos**, Alimentos de origem animal, vol. 2, 279p. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PINTO, C.L.O., MARTINS, M.L., VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006

SANCHEZ, A., et al. Influence of storage and preservation on somatic cell count and composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**.v.88. p. 3095- 3100, 2005.

SAS.STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Statistical analysis user's guide**. Version 8.2. Cary: SAS, 2001. 1686 p.

SIERRA, D., et al. Temperature effects on somatic cell counts in goats milk. **International Dairy Journal**, Londres, v. 16, p. 385-387, Apr. 2006

TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria. Editora da UFSM, 2013. 207p.

WALTERS, N.J., ESTRIDGE B.H., REYNOLDS A.P.. **Laboratório Clínico: Técnicas Básicas** 3. Ed., 482p. (368) – Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.

6 FATORES INTERFERENTES NA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE LEITE CRU DESTINADAS A ANÁLISE DE CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS

RESUMO

Objetivou-se verificar possíveis interferências na conservação de amostras de leite conservadas com azidiol e destinadas a análises de contagem bacteriana total. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Qualidade de Leite e Derivados, da Universidade Federal de Santa Maria, em Palmeira das Missões/RS. Duas amostras de leite foram coletadas com valores de CBT pré-determinados. No laboratório, o leite foi subdividido, em 80 sub amostras e essas foram distribuídas entre os tratamentos: T1 - Baixa CBT inicial/temperatura ambiente; T2 - Baixa CBT inicial/temperatura refrigerada; T3 - Alta CBT inicial/temperatura ambiente; T4 - Alta CBT inicial/temperatura refrigerada. Avaliaram-se duas temperaturas de armazenamento (ambiente e refrigerado). Após incubação, analisou-se o leite dos 80 frascos. O delineamento estatístico utilizado foi arranjo fatorial 3 x 2 X 5 (conservação, temperatura e tempos). A contagem bacteriana foi alterada de forma isolada pela CBT inicial, temperatura de armazenamento e dias de armazenagem ($P < 0,001$). Houve aumento da CBT de acordo com os dias de armazenamento, uma vez que até o primeiro dia de armazenamento os valores aumentaram, já a partir do segundo dia de armazenamento a CBT começou a reduzir. Para os teores de gordura, houve apenas efeito de CBT inicial e temperatura de armazenamento ($P < 0,001$). Nos percentuais de proteína houve efeito dos dias de armazenamento, a proteína aumentou até o primeiro dia de armazenamento, onde estabilizou até 7 dias de armazenamento. A lactose foi alterada pela CBT inicial e pelos dias de armazenamento ($P < 0,001$). O teor de lactose aumentou até o primeiro dia de armazenamento, onde estabilizou até o sétimo dia de avaliação. O teor de ST foi alterado pela CBT inicial, temperatura e dias de armazenamento ($P < 0,001$). Amostras com alta CBT inicial apresentaram maiores teores de ST. O teor de SD foi alterado apenas pela CBT inicial e pelos dias de armazenamento ($P < 0,001$). O pH foi alterado pela CBT inicial, temperatura e dias de armazenamento ($P < 0,001$). Para análise de CBT do leite, o uso de azidiol como conservante é dependente do uso de refrigeração durante a armazenagem para manter as características microbiológicas mais estáveis ao longo de sete dias de armazenamento. Para análises de composição físico-química do leite, a partir do primeiro dia de armazenamento das amostras, ocorreu aumento dos teores de proteína, lactose e sólidos desengordurados do leite, em relação aos teores observados quando quantificados no mesmo dia da coleta do leite.

Palavras-chaves: azidiol; contagem bacteriana total; qualidade do leite

6 FACTORS INTERFERING IN CONSERVATION OF RAW MILK SAMPLES DESTINED TO ANALYSIS OF STANDARD COUNTING ON PLATES

ABSTRACT

This study aimed to verify possible interferences in conservation of milk samples preserved with azidiol and intended to total bacterial count analysis. The work was developed in the Laboratory of Milk Quality and Dairy Products of the Universidade Federal de Santa Maria in Palmeira das Missões - RS. Two milk samples were collected with predetermined TBC values. In the laboratory, milk was divided in 80 sub samples and these were distributed among the treatments: T1 - Low initial TBC / room temperature; T2 - Low initial TBC / refrigerated temperature; T3 - High initial TBC / room temperature; T4 - High initial TBC / chilled temperature. They were evaluated both storage temperatures (room temperature and refrigerated). After incubation, were analyzed the milk of 80 bottles. The statistical design was a factorial arrangement 3 x 2 x 5 (conservation, temperature and times). The bacterial count was changed in isolation by the initial TBC, storage temperature and storage days ($P < 0.001$). There was an increase of TBC according to the days of storage, since until the first day of storage values increased, yet from the second day of storage CBT started to reduce. For the fat content, there was only initial TBC effect and storage temperature ($P < 0.001$). In the protein percentage was no effect of storage days, the protein increased until the first day of storage, which stabilized within 7 days of storage. Lactose was amended by initial TBC and the storage days ($P < 0.001$). The lactose content increased until the first day of storage, which stabilized until the seventh evaluation day. The TS content was amended by initial TBC, temperature and storage days ($P < 0.001$). Samples with high initial TBC showed higher levels ST. The DS content was modified only by the initial TBC and the storage days ($P < 0.001$). The pH was amended by initial TBC, temperature and storage days ($P < .0001$). For TBC analysis of milk, using azidiol preservative is dependent on the use of refrigeration during storage to maintain more stable microbiological characteristics over seven days of storage. For analysis of physical and chemical composition of milk, from the first day of sample storage, there was an increase of protein, lactose and degreased solids of milk, compared to levels observed when quantified in the same day of collection of milk.

Keywords: azidiol; total bacterial count; milk quality

6.1 Introdução

O setor de lácteos, bem como outros segmentos da produção de alimentos é uma atividade cada vez mais competitiva, tornando-se assim, indispensável a constante busca pelo aumento da produção e melhoria da qualidade, para atender a demanda nacional e conquistar novos mercados internacionais.

O Brasil, no que se refere à produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite é regido pela Instrução Normativa nº 62 (IN 62), de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esse regulamento técnico estabelece como teor mínimo de gordura de 3%; proteína total mínimo de 2,9%; extrato seco desengordurado (ESD) de 8,4%; unidade formadora de colônia (UFC) máximo 300.000/mL e contagem de células somáticas (CCS) máximo 500.000/mL, sendo este requisito microbiológico e de células somáticas para o período de 01 de julho de 2014 a 30 de junho de 2016, nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste, já a partir desta data, os valores tornarão-se mais criteriosos e o máximo permitido de UFC passará para 100.000/mL e CCS máximo de 400.000/mL (MAPA, 2011).

A IN 62 determina também que o setor de laticínios efetue com periodicidade mínima, uma análise mensal para CBT, CCS e composição. Essas devem ser realizadas em uma unidade operacional da Rede Brasileira de Laboratórios para Controle da Qualidade do Leite, independente das análises efetuadas pelo controle de qualidade interno (MAPA, 2011). Com isso as indústrias de laticínios estão remunerando o produtor pela qualidade do leite produzido e assim a produção de leite com qualidade pode resultar em maior lucratividade da atividade devido ao pagamento pela qualidade do produto.

De acordo com Reis et al. (2007), para um resultado confiável, a coleta de amostras de leite individual deve ser criteriosa, para que as mesmas possam refletir a sua real composição, tornando-se verdadeiramente representativa do leite como um todo. E ainda em relação à contagem bacteriana total (CBT), a temperatura e o período de armazenamento do leite determinam, de maneira seletiva e pronunciada, a intensidade de desenvolvimento das diversas espécies microbianas contaminantes (ARCURI et al., 2006).

A principal estratégia utilizada na conservação das amostras destinadas as análises de CBT é o uso de azidiol, podendo a amostra ser analisada até 7 dias após a coleta se mantida a temperatura de 7°C, sem congelamento e sem aquecimento (CASSOLI et al., 2010). Mas ainda são escassas as informações referentes ao efeito dos conservantes utilizados nas amostras, a temperatura de armazenamento, no prolongamento do tempo entre a coleta da

amostra e a análise de CBT e a interferência da qualidade inicial do leite em sua conservação, e desta forma essas informações poderão garantir maior confiabilidade dos resultados.

Diante do exposto, realizou-se um estudo objetivando verificar as possíveis interferências na conservação (temperatura, tempo de armazenamento e qualidade inicial do leite) de amostras conservadas com azidiol e destinadas a análises de contagem bacteriana total pelo método de contagem padrão em placas.

6.2 Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Qualidade de Leite e Derivados, da Universidade Federal de Santa Maria, *Campus* de Palmeira das Missões/RS no período de 08/12/2014 a 18/12/2014.

6.2.1 Amostras

Duas amostras de leite cru refrigerado (de 1.600 mL cada) foram coletadas em duas fazendas produtoras de leite no município de Palmeira das Missões, situada na região Noroeste do Rio Grande do Sul. Essas fazendas possuíam manejos e condições higiênicas distintas com valores de CBT pré-determinados (10.000 e 500.000 UFC/mL, respectivamente).

As coletas de leite ocorreram diretamente do tanque de expansão, os quais estavam com temperatura inferior a 4°C no momento da coleta. Inicialmente o leite foi agitado por meio do agitador automático do equipamento de refrigeração, por um período de 10 minutos. Posteriormente foi proferida a coleta do volume com auxílio de um copo coletor e um funil analítico para facilitar o preenchimento do balão volumétrico, no qual foi armazenado o leite. Após as coletas, as amostras foram acondicionadas e transportadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável até o Laboratório de Inspeção e Qualidade de Leite e Derivados do campus da UFSM-PM.

No laboratório, o leite das duas fazendas foram subdivididos em 80 sub amostras de 40 ml cada, acondicionadas em frascos estéreis e que receberam adição de um comprimido (entre 41 e 50 mg) contendo azida sódica e cloranfenicol. Após a adição do conservante, os

frascos foram homogeneizados por inversão e reversão até completa dissolução do conservante no leite.

Avaliaram-se duas temperaturas de armazenamento de amostras: Temperatura ambiente (20,7 a 22,6°C), onde 40 amostras foram incubadas em estufa (T1 e T3) e temperatura refrigerada (3,9 a 5°C), onde 40 amostras foram armazenadas sob refrigeração de 4°C (T2 e T4).

As sub amostras foram distribuídas e identificadas entre os tratamentos: T1 - Baixa CBT inicial e armazenado em temperatura ambiente; T2 - Baixa CBT inicial e armazenado em temperatura refrigerada; T3 - Alta CBT inicial e armazenado em temperatura ambiente; T4 - Alta CBT inicial e armazenado em temperatura refrigerada.

Após a incubação, nas duas faixas de temperatura, nos diferentes tempos (dia 0, 1, 3, 5 e 7), analisou-se o leite dos 80 frascos, procedendo-se da seguinte forma: para cada tratamento obteve-se quatro repetições e durante os diferentes tempos de análises não se analisou o mesmo frasco, sendo este descartado após cada período, por motivo de possível contaminação da amostra.

6.2.2 Análises realizadas

Todas as amostras de leite foram submetidas às análises de contagem bacteriana e análises físico-químicas (percentual de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos desengordurado e pH).

As análises de contagem bacteriana (CBT) foram realizadas pelo método de contagem padrão de microrganismos aeróbios mesófilos em placas, método descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002). Utilizaram-se placas descartáveis (90 x 15 mm) e estéreis. A preparação do ágar de contagem padrão – PCA e a solidificação das placas foram realizadas no dia anterior a semeadura do inóculo. Para cada amostra foi utilizado três diluições decimais sucessivas empregando como diluente a água peptonada tamponada a 0,1%. Em seguida, foram transferidos, a partir de três diluições selecionadas, 0,1 ml do diluído para as placas de Petri em duplicata, onde o meio já se encontrava vertido e solidificado e com o auxílio de uma alça de Drigalski, flambada, foram então semeados os inóculos nas placas. Posteriormente as placas foram incubadas invertidas na estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 3 horas, seguindo o protocolo de incubação descrito por Walters et al. (1998). Após o período de incubação, foi efetuada a contagem das UFC com o auxílio de um contador de

colônias modelo manual. Os resultados foram transformados em logarítmos de base dez (Log 10), para facilitar as análises estatísticas.

As análises físico-químico (percentual de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos desengordurado) foram realizadas pelo equipamento Milko Tester, que utiliza o princípio de infravermelho. Antes de realizar a análise, as amostras foram igualmente homogeneizadas. A higienização do equipamento foi efetuada a cada troca de tratamento.

As análises de pH foram realizadas por meio de pHmetro de bancada (TECNOPON mPA 210), com eletrodo de vidro e que permitiu a leitura direta no dispositivo digital. O eletrodo foi limpo e higienizado a cada troca de tratamento.

6.2.3 Análise estatística

Utilizou-se o delineamento estatístico em arranjo fatorial 3 x 2 x 5, sendo que os fatores foram: três tipos de conservação, duas temperaturas de incubação e cinco tempos (dias) de análises.

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System® (SAS, 2001), após verificação da normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias. Com a distribuição normal dos dados, o procedimento estatístico adotado foi de acordo com os efeitos principais dos tratamentos, pelo comando PROC MIXED do SAS (2001), adotando-se nível de significância de 0,05. Os dias de armazenamento foram analisados como medidas repetidas no tempo. Diversas estruturas de erros foram investigadas, e a estrutura escolhida para cada variável avaliada foi de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + CBT_i + T_j + (CBT_i \times T_j) + e(a)_{ijk} + DIA_k + (CBT_i \times DIA_k) + (T_j \times DIA_k) + (T_j \times DIA_k \times CBT_i) + e(b)_{ijkl},$$

em que, Y_{ijkl} = é o valor observado; μ = média geral; CBT_i = efeito fixo de contagem bacteriana inicial; T_j = efeito fixo de temperatura de armazenamento; $CBT_i \times T_j$ = efeito fixo de interação entre CBT_i e T_j ; $e(a)_{ijk}$ = erro aleatório associado a cada observação da parcela principal; DIA_k = efeito fixo de dias de armazenamento; $CBT_i \times DIA_k$ = efeito fixo de interação entre CBT_i e DIA_k ; $T_j \times DIA_k$ = efeito fixo de interação entre T_j e DIA_k ; $T_j \times DIA_k \times CBT_i$ = efeito fixo de interação tripla entre T_j e DIA_k e CBT_i . Os graus de liberdade foram calculados de acordo com o método Satterthwaite (DDFM = Satterth).

As médias ajustadas foram calculadas e comparadas pela opção DIFF do ‘statement’ LSMEANS.

6.3. Resultados e Discussão

A contagem bacteriana do leite foi alterada de forma isolada pela CBT inicial, temperatura de armazenamento e dias de armazenagem (Tabela 1). Houve aumento da CBT do leite de acordo com os dias de armazenamento, uma vez que até o primeiro dia de armazenamento os valores desta variável aumentaram, enquanto que a partir do segundo dia de armazenamento a CBT começou a reduzir (Tabela 1). Essa redução significativa, nos valores de CBT de acordo com os dias de armazenamento, independentemente da temperatura de armazenamento, pode ser justificada por possíveis injúrias celulares nos microrganismos decorrentes da ação do conservante azidiol que possui azida sódica em sua composição e esta é conhecida como inibidor do processo de respiração aeróbica, por interferir na cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria (LEITE, 2006).

Tabela 1- Variação da contagem bacteriana total (Log 10) do leite com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento			
	Baixa CBT Inicial		Alta CBT Inicial	
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado
0	3,89 ^b C	3,93 ^b A	5,63 ^a A	5,63 ^a B
1	4,40 ^c A	4,10 ^d A	5,34 ^b B	5,90 ^a A
3	4,13 ^b B	3,53 ^c B	5,30 ^a B	5,25 ^a C
5	3,28 ^c D	3,30 ^c B	4,90 ^b C	5,20 ^a C
7	3,28 ^b D	3,30 ^b B	3,97 ^a D	3,00 ^c D

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P > 0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,001$), pelo teste de Tukey.

As reduções dos valores de CBT (Tabela 1), a partir do dia 1 podem ser ainda associadas às quedas de pH, que tiveram comportamento similar. Este resultado pode então indicar inibição do crescimento microbiano resultante de acidificação da amostra. O que deve ser salientado é que este trabalho foi realizado utilizando a metodologia de contagem

bacteriana em placa, que é um método oficial, mundialmente reconhecido, mas que determina o conteúdo de bactérias aeróbias e/ou facultativos mesófilos viáveis presentes no leite.

De acordo com Gunasekera et al. (2000) existe boa correlação entre a citometria de fluxo (metodologia utilizada pelos laboratórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite) e de contagem padrão em placa, no entanto, em seu estudo, a citometria de fluxo apresentou maior CBT, pois a cultura em placa é dependente da viabilidade das células bacterianas que originam colônias a partir de uma ou várias células.

Amostras de leite com baixa CBT inicial armazenadas refrigeradas apresentaram valores inferiores para esta variável até o terceiro dia de armazenamento (Tabela 1), quando comparado a amostras armazenadas em temperatura ambiente, e assim mostrou-se o tratamento com menor oscilação ao longo dos dias de análises. Isto pode então ser justificado, pela temperatura de armazenamento, aliado a baixa contagem inicial de microrganismos do leite utilizado nessas amostras, onde o mesmo apresentou 9.000 UFC/mL e desta apresentando-se bem inferior ao estabelecido pela Instrução Normativa nº 62 (IN 62), de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que estabelece máximo de 300.000/ml para unidade formadora de colônia para o período de 01 de julho de 2014 a 30 de junho de 2016, nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste (MAPA, 2011).

Martins et al. (2009), avaliando o efeito do conservante bronopol em contraste com o conservante azidiol na CBT (análise por citometria de fluxo) em amostras de leite cru submetidas a diferentes temperaturas de armazenagem, verificaram que no nível de contaminação $<10^5$ UFC/mL, tanto no nível de contaminação $>10^6$ UFC/mL, as amostras conservadas com o azidiol são viáveis para análise até o dia de armazenamento, quando foram mantidas em temperatura entre 1,8 e 4,2°C

Para Cassoli et al. (2010), as amostras de leite cru conservadas com azidiol, podem ser analisadas até 7 dias após a coleta se mantida a temperatura de 7°C, sem congelamento e sem aquecimento, isso devido ao azidiol ter efeito bacteriostático e ser composto de azida sódica, cloranfenicol, etanol, citrato de sódio e azul de bromofenol, sendo que a azida sódica trata-se de um inibidor do processo de respiração aeróbia, por interferir na cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria (LEITE, 2006).

Em relação aos teores médios de gordura do leite, houve apenas efeito de CBT inicial e temperatura de armazenamento para teor de gordura do leite. Amostras de leite com baixa CBT inicial apresentaram menores teores de gordura do leite, do que amostras com alta CBT inicial (Tabela 2). Essa queda verificada no dia 7 para o tratamento alta CBT inicial, conservado em temperatura ambiente, bem como no dia 5 para o tratamento baixa CBT inicial

conservada em temperatura ambiente, pode estar atrelada ao aumento excessivo de viscosidade das amostras conservadas com azidiol e em temperatura ambiente, assim pode ter dificultado a homogeneização das amostras apresentando uma errônea redução dos teores de gordura.

Tabela 2 – Média dos teores de gordura do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento			
	Baixa CBT Inicial		Alta CBT Inicial	
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado
0	3,88 ^{b A}	3,88 ^{b A}	4,53 ^{a A}	4,53 ^{a A}
1	3,88 ^{b A}	3,96 ^{b A}	4,56 ^{a A}	4,55 ^{a A}
3	3,80 ^{b A}	3,88 ^{b A}	4,48 ^{a A}	4,53 ^{a A}
5	3,57 ^{a A}	3,95 ^{a A}	4,45 ^{a A}	4,57 ^{a A}
7	3,78 ^{b A}	3,90 ^{b A}	4,02 ^{b A}	4,56 ^{a A}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P > 0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,001$), pelo teste de Tukey.

Esses resultados obtidos em relação aos teores de gordura, corroboram então com Monardes et al. (1996), Gonzalo et al. (2004) e Sánchez et al. (2005) que recomendam como principal estratégia na conservação das amostras destinadas as análises de composição físico e química a adição do conservantes bronopol, podendo este ser ou não associados a resfriamento das amostras.

Nos percentuais médios de proteína houve efeito de dias de armazenamento sobre o teor de proteína do leite, que aumentou até o primeiro dia de armazenamento, estabilizando-se até 7 dias de armazenamento. O teor de proteína do leite também foi alterado pela CBT inicial, uma vez que amostras de leite com baixa CBT apresentaram menores teores de proteína quando mantidas em temperatura ambiente (Tabela 3).

Esse aumento nos teores de proteína pode estar relacionado com o crescimento bacteriano verificado, pois quando se realiza a análise dos constituintes físico-químicos do leite pelo método de infravermelho, não é possível diferenciar quais são as proteínas verdadeiras do leite (caseína, albumina, lactalbumina, lactoglobulina e imunoglobulinas) das proteínas formadas por nitrogênio não proteico, produzido por alguns grupos de bactérias.

Também pode ser resultado de um aumento na CBT, pois as paredes celulares que revestem as bactérias podem ser consideradas proteínas, pois são constituídas por aminoácidos.

Tabela 3 – Média dos teores de proteína do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento			
	Baixa CBT Inicial		Alta CBT Inicial	
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado
0	3,32 ^{bB}	3,32 ^{aB}	3,41 ^{aB}	3,41 ^{aB}
1	3,51 ^{aA}	3,51 ^{aA}	3,59 ^{aA}	3,59 ^{aA}
3	3,48 ^{aA}	3,49 ^{aA}	3,60 ^{aA}	3,59 ^{aA}
5	3,49 ^{aA}	3,56 ^{aA}	3,60 ^{aA}	3,58 ^{aA}
7	3,50 ^{aA}	3,50 ^{aA}	3,61 ^{aA}	3,59 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P>0,001$), pelo teste de Tukey.

O teor de lactose aumentou até o primeiro dia de armazenamento do leite, onde estabilizou até o sétimo dia de avaliação. Amostras com baixa CBT inicial apresentaram menores teores de lactose, em comparação com amostras de leite com alta CBT (Tabela 4), a alteração pela CBT inicial pode ser justificada por o leite ser oriundo de duas fazendas distintas, com manejo, alimentação e padrão racial diferenciado.

Tabela 4 – Média dos teores de lactose do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento			
	Baixa CBT Inicial		Alta CBT Inicial	
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado
0	4,46 ^{bB}	4,46 ^{bB}	4,62 ^{aB}	4,62 ^{aB}
1	4,74 ^{aA}	4,74 ^{aA}	4,86 ^{aA}	4,84 ^{aA}
3	4,70 ^{aA}	4,72 ^{aA}	4,87 ^{aA}	4,86 ^{aA}
5	4,72 ^{aA}	4,75 ^{aA}	4,88 ^{aA}	4,85 ^{aA}
7	4,73 ^{bA}	4,73 ^{bA}	4,88 ^{aA}	4,87 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P>0,001$), pelo teste de Tukey.

O aumento dos teores de lactose do dia 0 ao 1, pode estar associado a um erro na leitura pelo equipamento de infravermelho, pois Ordóñez, (2005) e Tronco (2013), relatam declínio no teor de lactose com o tempo de armazenamento do leite devido à deterioração da lactose em compostos ácidos.

O teor de ST do leite aumentou até o primeiro dia de armazenamento (Tabela 5), comportamento esse que foi influenciado pelos teores de proteína e lactose, mas como gordura manteve-se estável durante este período (Tabela 2), o que pode ter diluído o efeito dos demais componentes do leite, resultante da ausência de efeito de tempo sobre o teor de sólidos totais do leite. As amostras com alta CBT inicial apresentaram maiores teores de ST (como verificado no percentual de proteína e lactose), enquanto que não foi observado diferença entre as médias na comparação entre as duas diferentes temperaturas de armazenamento (Tabela 5).

Tabela 5 – Média dos teores de sólidos totais do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento			
	Baixa CBT Inicial		Alta CBT Inicial	
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado
0	12,57 ^{b A}	13,12 ^{b A}	13,46 ^{a A}	13,46 ^{a A}
1	13,03 ^{b A}	12,12 ^{b A}	13,91 ^{a A}	13,88 ^{a A}
3	12,89 ^{b A}	13,00 ^{b A}	13,86 ^{a A}	13,89 ^{a A}
5	12,69 ^{b A}	13,17 ^{b A}	13,84 ^{a A}	13,91 ^{a A}
7	12,92 ^{b A}	13,04 ^{b A}	13,41 ^{a A}	13,92 ^{a A}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P > 0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,001$), pelo teste de Tukey.

De forma similar aos ST, o teor de SD aumentou até um dia de armazenamento, onde então estabilizou (Tabela 6). O único componente do leite que permaneceu sem alteração durante os sete dias de armazenamento foi a gordura, uma vez que os teores de proteína e lactose aumentaram a partir do 1º dia de conservação. Este resultado sugere que o dia de análise de composição físico-química do leite pode afetar os teores dos componentes acima citados, bem como o teor de sólidos desengordurados que são compostos em sua grande maioria pela proteína e pela lactose. Além disso, amostras de leite com alta CBT inicial

apresentaram maiores teores de SD, do que amostras com baixa CBT (Tabela 6), e isso ocorreu em decorrência a composição inicial dos leites utilizados que foram distintos.

Tabela 6 – Média dos teores de sólidos desengordurados do leite em percentual, com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento.

Tempo (Dias)	Tratamento			
	Baixa CBT Inicial		Alta CBT Inicial	
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado
0	8,69 ^{bA}	8,69 ^{bB}	8,93 ^{aB}	8,93 ^{aB}
1	9,15 ^{aA}	9,15 ^{aA}	9,35 ^{aA}	9,32 ^{aA}
3	9,08 ^{bA}	9,12 ^{bA}	9,38 ^{aA}	9,36 ^{aA}
5	9,12 ^{aA}	9,21 ^{aA}	9,38 ^{aA}	9,34 ^{aA}
7	9,13 ^{aA}	9,14 ^{aA}	9,39 ^{aA}	9,36 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P>0,001$), pelo teste de Tukey.

Para o pH na comparação de médias, houve diferença apenas nas comparações entre amostras de leite com alta CBT mantidas em temperatura ambiente em comparação com os demais tratamentos a partir do quinto dia de armazenamento. Amostras de leite com alta CBT mantidas em temperatura ambiente apresentaram menor pH nos tempos 5 e 7, em comparação aos demais tratamentos nestes tempos de coletas (Tabela 7).

Tabela 7 – Média de pH do leite com relação aos tratamentos e tempo de armazenamento

Tempo (Dias)	Tratamento			
	Baixa CBT Inicial		Alta CBT Inicial	
	Ambiente	Refrigerado	Ambiente	Refrigerado
0	6,03 ^{aA}	6,03 ^{aA}	5,99 ^{aA}	5,99 ^{aA}
1	5,99 ^{aA}	5,98 ^{aA}	5,91 ^{aA}	5,98 ^{aA}
3	5,99 ^{aA}	5,98 ^{aA}	5,88 ^{aA}	5,94 ^{aA}
5	5,87 ^{bA}	5,96 ^{aA}	5,80 ^{bA}	5,93 ^{aA}
7	5,92 ^{aA}	5,94 ^{aA}	5,82 ^{bA}	5,94 ^{aA}

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,001$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P>0,001$), pelo teste de Tukey.

De acordo com Cassoli et al., (2010), a refrigeração constante das amostras de leite no processo de transporte e durante a conservação dessas é necessária, pois somente o conservante químico não é suficiente para cessar o crescimento bacteriano, e esse comportamento torna-se ainda mais pronunciado quando a qualidade microbiológica inicial do leite possui valores mais elevados.

6.4 Conclusão

Para análise de CBT do leite, o uso de azidiol como conservante é dependente do uso de refrigeração durante a armazenagem para manter as características microbiológicas mais estáveis ao longo de sete dias de armazenamento.

Para as análises de composição físico-química do leite, especialmente para os teores de proteína, lactose e sólidos desengordurados do leite, o azidiol não pode ser utilizado, pois a partir do primeiro dia de armazenamento das amostras, ocorre aumento dos teores médios de proteína, lactose e sólidos desengordurados do leite, em relação aos teores observados quando quantificados no mesmo dia da coleta do leite.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E. F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 17. ed., Washington, DC: Association Official Analytical Chemists, v.1. 2002.

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, p. 434-439, 2010.

GONZALO, C., et al. Evaluation of rapid somatic cells counters under different analytical conditions in ovine milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3623- 3628, 2004.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D. A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1228-1232, 2000.

LEITE, M.O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. 2006. 62 f. Tese – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MAPA, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 30 de dez de 2011. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=30/12/2011&jornal=1&Pagina=6&totalArquivos=160>>. Acesso em: 27 jan. 2012.

MARTINS, M.E.P., et al. Conservantes Bronopol e Azidiol: Influência do binômio tempo/temperatura na contagem bacteriana total do leite cru. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.627-633, 2009.

MONARDES, H.G., et al. Preservation and storage mechanisms for raw milk samples for use in milk-recording schemes. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n.2, p. 151-154, 1996.

ORDÓÑEZ, J.A., **Tecnologia de Alimentos**, Alimentos de origem animal, vol. 2, 279p. Porto Alegre: Artmed, 2005.

REIS, G.L., et al. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1134-1138, 2007.

SAS.STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Statistical analysis user's guide**.Version 8.2. Cary: SAS, 2001. 1686 p.

SANCHEZ, A., et al. Influence of storage and preservation on somatic cell count and composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**.v.88. p. 3095- 3100, 2005.

TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria. Editora da UFSM, 2013. 207p.

WALTERS, N.J., ESTRIDGE B.H., REYNOLDS A.P.. **Laboratório Clínico: Técnicas Básicas** 3. Ed., 482p. (368) – Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.

