

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO
DE AMOSTRAS DE LEITE CRU NOS RESULTADOS DAS
ANÁLISES ELETRÔNICAS**

Thamara Venâncio de Almeida
Orientador: Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau

GOIÂNIA
2015



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Thamara Venâncio de Almeida** E-mail: **thamara_almeida@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: **Brasil** UF: **Goiás** CNPJ: Sigla:

Título: **EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS DE LEITE CRU NOS RESULTADOS DAS ANÁLISES ELETRÔNICAS.** Palavras-chave: **azidiol, bronopol, citometria de fluxo, composição centesimal, contagem bacteriana total, contagem de células somáticas.**

Título em outra língua: **Effect of temperature and time of storage of raw milk samples on electronic analysis results.**

Palavras-chave em outra língua: **azidiol, bronopol, flow cytometry, chemical composition, total bacterial count, somatic cell count.**

Área de concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **21/08/2015**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Edmar Soares Nicolau** E-mail: **rena@cpa.evz.ufg.br**

Co-orientador(1): **Cíntia Silva Minafra e Rezende** E-mail: **cintiaminafra@gmail.com**

Co-orientador(2): **Antônio Nonato de Oliveira** E-mail: **nonato@cpa.evz.ufg.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberção para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 1 de setembro de 2015

Thamara Venâncio de Almeida
Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

THAMARA VENÂNCIO DE ALMEIDA

**EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO
DE AMOSTRAS DE LEITE CRU NOS RESULTADOS DAS
ANÁLISES ELETRÔNICAS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau – EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende – EVZ/UFG

Prof. Dr. Antonio Nonato de Oliveira – EVZ/UFG

GOIÂNIA

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Almeida, Thamara Venâncio de
Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras
de leite cru nos resultados das análises eletrônicas [manuscrito] /
Thamara Venâncio de Almeida. - 2015.
xi, 41 f.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau; co-orientadora Dra.
Cíntia Silva Minafra e Rezende; co-orientador Dr. Antonio Nonato de
Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ) , Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2015.

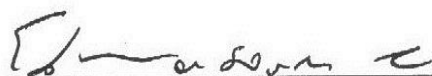
Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

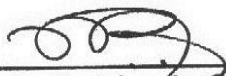
1. Azidiol. 2. Bronopol. 3. Citometria de fluxo. 4. Composição química.
5. Contagem bacteriana total. I. Nicolau, Edmar Soares , orient. II.
Rezende, Cíntia Silva Minafra e , co-orient. III. Título.

Thamara Venâncio de Almeida

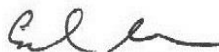
Dissertação defendida e aprovada em **21/08/2015**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Marco Antônio Pereira da Silva – IFG/Campus Rio Verde



Prof. Dr. Emmanuel Arnhold

Aos meus Pais
Saulo Carlos de Almeida e
Maura Venâncio X. Almeida
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau, pela oportunidade, confiança e valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Balduino Soares Neves pela orientação fundamental para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Arnhold pela disponibilidade e ajuda imprescindível na análise estatística.

Aos meus coorientadores Prof^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende e Prof. Dr. Antônio Nonato de Oliveira pela atenção e presteza.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisa em Alimentos, especialmente Juan Carlos e Rafael Vieira, pela solicitude com que sempre me ajudaram.

Aos meus amigos Thiago Quaresma, Rebeka, Flávia, Jaqueline e Daniela pelo companheirismo e apoio.

Aos meus Pais, Saulo e Maura, pelo amor incondicional e incentivo.

Obrigada a todos!

“Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente de
qualquer jeito.”

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Produção de leite no Brasil e no mundo.....	3
2.2 Legislação sobre leite no Brasil.....	3
2.3 Principais parâmetros de qualidade do leite.....	5
2.3.1 Contagem Bacteriana Total.....	6
2.3.1 Contagem de Células Somáticas	9
2.3.3 Composição Química	10
2.4 Qualidade do leite cru produzido no Brasil	11
2.5 Análise da qualidade do leite por meio de equipamentos eletrônicos	13
2.6 Coleta e envio de amostras de leite para análises eletrônicas.....	15
2.7 Fatores interferentes na avaliação da qualidade do leite por métodos eletrônicos.....	16
2.7.1 Conservantes para amostras de leite.....	16
2.7.2 Tempo e temperatura de armazenamento das amostras de leite	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Geral.....	18
3.2 Específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Amostras	19
4.2 Análises laboratoriais	20
4.3 Análise estatística	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de leite sob inspeção dos estados brasileiros no ano de 2014.	3
Tabela 2 – Média, desvio padrão (DP) e valores mínimos e máximos dos resultados de composição química e CCS de amostras de leite cru refrigerado armazenadas por um dia a 3°C.....	21
Tabela 3 - Médias dos resultados de CBT (log de UFC/mL) em amostras de leite cru armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	22
Tabela 4 - Médias dos resultados de CCS (log de CS/mL) em amostras de leite cru armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	25
Tabela 5 - Médias dos valores de proteína (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	28
Tabela 6 - Médias dos valores de gordura (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	29
Tabela 7 - Médias dos valores de lactose (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	30
Tabela 8 - Médias dos valores de extrato seco total (EST) (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.....	31
Tabela 9 - Médias dos valores de extrato seco desengordurado (ESD) (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Médias dos resultados de CBT (logUFC/mL) em amostras de leite cru armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	23
Figura 2 - Médias dos resultados de CCS (log CS/mL) em amostras de leite cru armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	26
Figura 3 - Médias dos valores de proteína (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	28
Figura 4 - Médias dos valores de gordura (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	29
Figura 5 - Médias dos valores de lactose (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	30
Figura 6 - Médias dos valores de extrato seco total (EST) (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	31
Figura 7 - Médias dos valores de extrato seco desengordurado (ESD) (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.	32

RESUMO

Para a avaliação do cumprimento dos requisitos de qualidade estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62, uma amostra de leite de cada propriedade ou tanque comunitário deve ser analisada mensalmente por um dos laboratórios credenciados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite. Ainda existem dúvidas sobre quais seriam a temperatura e o tempo máximos de armazenamento das amostras de leite sem que houvesse comprometimento dos resultados das análises eletrônicas. Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras de leite cru refrigerado nos resultados das análises eletrônicas da qualidade do leite. Amostras de leite cru refrigerado foram coletadas de tanques de expansão de uso individual de fazendas localizadas na mesorregião Centro Goiano no Estado de Goiás e armazenadas em quatro temperaturas diferentes (3°C, 11°C, 17°C e 25°C) durante 16 dias. Foram realizadas diariamente análises de contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS) e composição química. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância em esquema de parcelas subdivididas no tempo em delineamento de blocos ao acaso e as médias comparadas pelo teste de Duncan. Concluiu-se que as amostras destinadas à análise de CBT, adicionadas do conservante azidiol, podem ser analisadas por até 16 dias após a coleta quando armazenadas em temperaturas de 3°C e 11°C e por até 10 dias quando armazenadas a 17°C. E as amostras destinadas às análises de CCS e composição química, adicionadas do conservante bronopol, podem ser analisadas por até 16 dias após a coleta quando armazenadas em temperaturas de 3°C e 11°C e por até sete dias quando armazenadas a 17°C.

Palavras-chave: azidiol, bronopol, citometria de fluxo, composição química, CBT, CCS.

ABSTRACT

For assessing compliance with the quality requirements established by the Normative Instruction No. 62, a milk sample each property or community tank should be analyzed on a monthly basis by one of the laboratories accredited by the Brazilian Laboratories Network for Milk Quality Control . There are still doubts about what would be the maximum temperature and the time of milk sample storage without jeopardizing the results of the electronic analysis. The objective of this study was to evaluate the effects of temperature and storage time of cooled samples of raw milk on the results of milk quality electronic analysis. Refrigerated raw milk samples were collected from expansion tanks for individual use of farms located in the middle region of the state of Goiás, and stored at four different temperatures (3 °C, 11 °C, 17 °C and 25 °C) for 16 days. Total bacterial count (TBC), somatic cell count (SCC) and chemical composition were performed daily. The results were submitted to analysis of variance in split plot design in randomized blocks, and the means were compared by Duncan test. We concluded that, when azidiol is added as preservative to samples for TBC, they can be analyzed up to 16 days after collection when stored at temperatures of 3 °C and 11 °C, and up to 10 days when stored at 17 °C. Moreover, when bronopol is added as preservative, samples for SCC and chemical composition analysis can be stored for up to 16 days after collection when stored at temperatures of 3 °C and 11 °C, and for up to seven days when stored at 17 °C.

Keywords: azidiol, bronopol, flow cytometry, chemical composition, total bacterial count, somatic cell count.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a Instrução Normativa nº 62 (IN nº 62), em vigor atualmente, define os parâmetros de qualidade e os critérios de avaliação do leite cru refrigerado, estabelecendo requisitos microbiológicos, físico-químicos, de contagem de células somáticas e resíduos químicos. Os principais parâmetros utilizados para caracterizar a qualidade do leite, e comumente utilizados para definir o preço pago ao produtor são: contagem bacteriana total, contagem de células somáticas e teores de proteína e gordura¹.

Para avaliação do cumprimento dos requisitos estabelecidos pela IN nº62 quanto aos parâmetros de qualidade, uma amostra de leite de cada propriedade ou tanque comunitário deve ser analisada mensalmente por um dos laboratórios credenciados à Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL)¹. A confiabilidade dos resultados das análises depende das condições de coleta, armazenamento e transporte das amostras, sendo a temperatura de armazenamento e o tempo entre a coleta e a análise condições importantes que podem interferir nos resultados².

Segundo Cassoli et al.³ as amostras de leite cru refrigerado com conservante adequado (bronopol nas amostras destinadas às análises de composição química e contagem de células somáticas; azidiol nas amostras destinadas à contagem bacteriana total), armazenadas sob-refrigeração a 7°C podem ser analisadas até sete dias após a coleta sem que ocorram diferenças significativas nos resultados. De acordo com Leite⁴ a temperatura e tempo de armazenamento das amostras podem ser ainda maiores, até 10°C por até 10 dias.

Atualmente, de acordo com norma técnica interna da RBQL, são consideradas aptas para as análises eletrônicas as amostras de leite cru refrigerado que chegam ao laboratório com conservante adequado e com temperatura na faixa de 1°C a 10°C. Estas amostras são mantidas sob-refrigeração no laboratório até o momento da análise, que deve ocorrer no máximo até sete dias após a data da coleta.

Eventualmente ocorrem problemas que prejudicam a temperatura e o tempo estabelecidos para se efetuar as análises, como por exemplo, em casos de

mau acondicionamento ou atrasos no envio das amostras, fazendo com que estas cheguem ao laboratório com temperaturas superiores a 10°C, ou ainda em casos de falhas nos equipamentos dos laboratórios, fazendo com que se ultrapasse o período de sete dias de armazenamento das amostras. Nestes casos as amostras não são analisadas, gerando transtornos para produtores, indústrias e laboratórios.

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da temperatura e tempo de armazenamento de amostras de leite cru refrigerado nos resultados das análises eletrônicas da qualidade do leite. Assim, será possível sanar dúvidas ainda existentes sobre quais seriam a temperatura e tempo máximos de armazenamento das amostras sem comprometer a confiabilidade dos resultados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de leite no Brasil e no mundo

Atualmente, os maiores produtores mundiais de leite são Estados Unidos, Índia, China e Brasil, tendo produzido no ano de 2013 cerca de 91,271; 60,600; 35,670; e 34,255 bilhões de litros de leite respectivamente⁵. Dentre os estados brasileiros, os maiores produtores de leite são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, São Paulo e Santa Catarina (Tabela 1)⁶.

No Brasil foram adquiridos pelas indústrias processadoras sob inspeção federal, estadual ou municipal 24,741 bilhões de litros de leite no ano de 2014, indicando um aumento de 5% sobre o volume registrado em 2013. A produção de leite mais que dobrou nos últimos 15 anos, pois no ano de 2000 o volume de leite adquirido pelas indústrias foi de 12,108 bilhões de litros⁶.

Tabela 1 - Produção de leite sob inspeção dos estados brasileiros no ano de 2014.

Estados	Mil litros
Minas Gerais	6.589.223
Rio Grande do Sul	3.430.747
Paraná	2.966.734
Goiás	2.685.137
São Paulo	2.524.754
Santa Catarina	2.339.723

Fonte: (IBGE, 2014).

2.2 Legislação sobre leite no Brasil

As primeiras normas relacionadas ao leite no Brasil foram instituídas em 1952, por meio da publicação do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Em 1996 foi criado o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) com o objetivo

de promover a melhoria da qualidade do leite produzido no país. Em abril de 2002, foi instituída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa nº37, a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL). A finalidade principal da criação da RBQL foi dar suporte analítico à implantação da Instrução Normativa nº51 (IN nº51) em setembro de 2002, que definiu novos parâmetros de qualidade e critérios de avaliação do leite. Atualmente a RBQL é composta por um laboratório de referência e dez laboratórios credenciados. Em dezembro de 2011 a IN nº51 foi substituída pela Instrução Normativa nº 62 (IN nº62), que está em vigor até o momento.

A IN nº 62 traz como definição de leite o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Em relação às características sensoriais, o leite é um líquido branco, opalescente e homogêneo com sabor e odor característicos. Deve ser isento de sabores e odores estranhos, bem como de qualquer neutralizante de acidez ou reconstituente de densidade¹.

A IN nº62 estabelece os requisitos mínimos de qualidade que o leite deve apresentar, sendo estes requisitos microbiológicos, físico-químicos, de contagem de células somáticas e de resíduos químicos. Os requisitos físico-químicos estabelecidos pela IN nº62 para o leite cru refrigerado estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Requisitos físico-químicos para o leite cru refrigerado

Requisitos	Limites
Matéria gorda (g/100g)	Mínimo de 3,0
Densidade relativa a 15°C (g/mL)	1,028 a 1,034
Acidez em ácido láctico (g/100mL)	0,14 a 0,18
Extrato seco desengordurado (g/100g)	Mínimo de 8,4
Índice crioscópico	- 0,512°C a - 0,531°C
Proteínas (g/100g)	Mínimo de 2,9
Contagem Bacteriana Total (CBT) UFC/mL	Máximo 300.000
Contagem de Células Somáticas (CCS) CS/mL	Máximo 500.000

Fonte: (BRASIL, 2011).

Cada propriedade rural ou tanque comunitário deve ter uma amostra de leite analisada no mínimo uma vez por mês por um dos laboratórios que compõem a RBQL, sendo feita uma média geométrica sobre o período de três meses para avaliação do cumprimento dos requisitos estabelecidos pela legislação¹.

O leite deve ser refrigerado preferencialmente a uma temperatura igual ou inferior a 4°C no máximo até três horas após o término da ordenha. E o tempo entre a primeira ordenha do leite e seu recebimento no estabelecimento processador deve ser de no máximo 48 horas. A temperatura máxima de conservação do leite cru é de 7°C na propriedade rural ou tanque comunitário e 10°C no estabelecimento processador¹.

2.3 Principais parâmetros de qualidade do leite

Os principais parâmetros utilizados para caracterizar a qualidade do leite são: CBT, CCS e teores de proteína e gordura. Estes parâmetros devem atender aos requisitos estabelecidos pela legislação vigente e também se tornaram importantes no cálculo do preço do leite pago ao produtor.

A implantação da IN n°51 em 2002 influenciou as indústrias processadoras de leite no Brasil a mudarem a forma de pagamento do leite. Desde então aumentou-se o número de indústrias aplicando algum tipo de bônus ou penalidade com base nos parâmetros de qualidade do leite, tornando mais evidente a influência destes parâmetros no preço do leite pago ao produtor⁷.

Nightingale et al.⁸ avaliaram um programa de pagamento por qualidade em uma cooperativa nos Estados Unidos e concluíram que um programa de penalidade e premiação para o leite de baixa e alta qualidade, respectivamente, é um forte incentivo aos produtores para a melhoria da qualidade do leite produzido. Botaro et al.⁹ também sugeriram uma associação entre a adoção de um programa de pagamento baseado na qualidade do leite e a redução na CBT e na CCS.

O leite com baixa CBT, baixa CCS, e altos teores de proteína e gordura é mais bem remunerado. Desta forma, seja para atender às exigências da legislação, seja para ter uma melhor remuneração, os produtores de leite têm sido pressionados cada vez mais a produzirem um produto de melhor qualidade.

2.3.1 Contagem Bacteriana Total

A CBT avalia a qualidade microbiológica do leite, isto é, sua população bacteriana. As principais fontes de contaminação bacteriana do leite são superfícies de utensílios e equipamentos de ordenha, superfície externa dos tetos e úbere e patógenos causadores de mastite no interior do úbere. Assim, os procedimentos de limpeza dos utensílios e equipamentos de ordenha, a higiene do ambiente em que as vacas são alojadas, da sala de ordenha e dos ordenhadores, e a saúde da glândula mamária dos animais são fatores que afetam diretamente a contaminação bacteriana do leite cru¹⁰.

Silva et al.¹¹ determinaram os principais pontos de contaminação microbiológica do leite durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. Os pontos de maior contaminação identificados foram: água residual de latões, fundo dos latões, tanque de refrigeração, tetos, três primeiros jatos de leite, teteiras, baldes e mãos do ordenhador.

Outra fonte de bactérias para o leite pode ser a água utilizada na limpeza dos equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração e utensílios em geral. A água pode estar contaminada em sua origem ou ser contaminada nos encanamentos, levando esta contaminação para o leite. Por isso é importante que a água utilizada seja de boa qualidade¹².

Matsubara et al.¹³ avaliaram o impacto da implantação de boas práticas de ordenha na melhoria da qualidade microbiológica do leite em quatro propriedades do Agreste Pernambucano, em que as condições higiênicas eram precárias. As práticas implantadas foram o desprezo dos três primeiros jatos de leite, imersão direta dos tetos em solução clorada, higienização de latões e baldes com detergente alcalino clorado e inversão dos mesmos para eliminação da água residual. A implantação destas práticas levou a uma redução de 99,9% na contagem de aeróbios mesófilos no leite (de 130.000.000 para 18.000 UFC/mL).

Vallin et al.¹⁴ avaliaram a eficiência da implantação de boas práticas de higiene na melhoria da qualidade do leite. Foram analisadas amostras de 46 propriedades na região central do Paraná, sendo 32 propriedades com ordenha manual e 14 com ordenha mecânica. As boas práticas implantadas foram: desprezo dos três primeiros jatos de leite, *pré-dipping* direto com solução clorada

à 750 ppm em caneca sem refluxo e secagem com papel toalha, higienização dos utensílios e equipamentos com detergente alcalino clorado 2% e inversão dos latões e baldes para escoamento da água residual. Após a implantação destas práticas houve uma redução na CBT de 87,90% e 86,99% nas propriedades com ordenha manual e mecânica, respectivamente. Em relação à CCS houve uma redução de 33,94% em propriedades com ordenha manual e 51,85% nas propriedades com ordenha mecânica.

Picoli et al.¹⁵ coletaram amostras de leite cru de tanques de refrigeração em 274 propriedades na região sul do Rio Grande do Sul. Foram realizadas análises microbiológicas para a identificação dos microrganismos, as médias das contagens foram: *Staphylococcus* spp. 59.200 UFC/mL, *S. aureus* 4.860 UFC/mL, enterobactérias (microrganismos da família *Enterobacteriaceae*) 396.000 UFC/mL. Houve presença de *Escherichia coli* (27,8% das propriedades), *Streptococcus agalactiae* (6,2%), *S. dysgalactiae* (37,2%), *S. uberis* (16,8%), *S. Bovis* (6,9%), *Candida* sp. (15,7%), *Aspergillus* sp. (5,8%), *Trichosporum* sp. (3,6%) e *Cryptococcus* sp. (1,5%). Os autores concluíram que os fatores que mais influenciaram na ocorrência destes diversos microrganismos foram a realização ou não do pré-*dipping*, a forma como foi realizada a secagem dos tetos (com pano ou papel toalha) e a higiene das instalações da sala de ordenha.

As características intrínsecas do leite, como alta atividade de água, pH próximo ao neutro (6,6 a 6,8) e riqueza em nutrientes o tornam um excelente meio de cultura para os microrganismos. O ideal seria que não houvesse nenhuma contaminação durante a obtenção, porém, como na prática isto é impossível, torna-se necessária a adoção de medidas para controlar a multiplicação dos microrganismos. No caso do leite cru a maneira pela qual esse controle é exercido é a utilização de baixas temperaturas durante o armazenamento¹⁶. Tanto a temperatura como o tempo de armazenamento do leite na propriedade rural são fatores importantes, pois estão diretamente relacionados com a multiplicação dos microrganismos presentes no leite, afetando, conseqüentemente, a CBT¹⁷.

Os microrganismos mesófilos são aqueles que têm a temperatura ótima de multiplicação entre 25°C e 40°C. Os microrganismos psicotróficos são os capazes de desenvolverem-se entre 0°C e 7°C, ou seja, multiplicam-se bem mesmo em temperaturas de refrigeração. Mesmo para os psicotróficos, no

entanto, quanto mais baixa for a temperatura, menor será a velocidade de crescimento¹⁶.

O armazenamento do leite cru sob-refrigeração reduz o crescimento das bactérias mesófilas, responsáveis pela acidificação do leite cru. Por outro lado, o armazenamento prolongado sob temperatura de refrigeração, cria uma vantagem seletiva para as bactérias psicotróficas, especialmente do gênero *Pseudomonas*. Estas bactérias se tornaram importantes para a vida-de-prateleira de produtos lácteos uma vez que mesmo sendo facilmente inativadas pela pasteurização, as enzimas produzidas por estas, proteases e lipases, são termoresistentes, persistindo após o processamento do leite, contribuindo assim para a deterioração dos produtos lácteos¹⁸. As proteases podem degradar as proteínas do leite causando diferentes tipos de deterioração, como sabores amargos e gelificação. As lipases podem degradar a gordura do leite contribuindo para sabores indesejáveis como ranço e amargo¹⁹.

Santos et al.²⁰ avaliaram o crescimento de microrganismos psicotróficos em leite cru refrigerado armazenado a 4°C, 7°C e 10°C. Após 96 horas o crescimento médio de psicotróficos a 10°C foi quatro vezes maior que a 4°C, enquanto que a 7°C foi 3,3 vezes maior que o crescimento a 4°C. A contagem de psicotróficos aumentou à medida que aumentaram o tempo e a temperatura de armazenamento. Por isso deve-se garantir o menor tempo e a menor temperatura possível de manutenção do leite cru entre a ordenha e o processamento.

A qualidade microbiológica inicial do leite cru influencia o desenvolvimento dos microrganismos durante o armazenamento. Segundo Perin et al.²¹ quando a contagem inicial de mesófilos aeróbios no leite cru é maior que 100.000 UFC/mL o desenvolvimento da microbiota psicotrófica é significativamente maior do que em um leite com contagem inicial menor, mesmo quando armazenado a 4°C. Isto confirma a importância das boas práticas de produção, uma vez que a contagem inicial de microrganismos no leite cru tem grande importância na qualidade do produto final²².

2.3.1 Contagem de Células Somáticas

A CCS do leite é um indicador da saúde da glândula mamária das vacas. As células somáticas encontradas no leite são células epiteliais de descamação e leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos). Quando há infecção bacteriana ou processo inflamatório afetando o tecido mamário, isto é, uma mastite, ocorre um aumento na CCS. Este aumento na CCS resulta de uma migração de leucócitos do sangue para a glândula mamária com a função de protegê-la do desafio bacteriano²³.

Coentrão et al.²⁴ estudaram os fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras, considerando resultados acima de 200.000 CS/mL como de animais provavelmente infectados. Foram identificados fatores de risco relacionados ao animal, ao equipamento de ordenha e ao manejo. Animais com a base do úbere junto ou abaixo do jarrete apresentaram 1,73 vezes mais chances de terem CCS acima de 200.000 CS/mL, provavelmente devido à maior exposição das extremidades dos tetos aos microrganismos no ambiente. Em relação ao equipamento de ordenha os fatores de risco foram fissuras nas partes de borracha, estado inadequado das teteiras e deficiência de limpeza dos pulsadores. Nas propriedades onde os ordenhadores não recebiam treinamento para a realização da ordenha os animais apresentaram 2,51 vezes mais chances de apresentarem CCS acima de 200.000 CS/mL.

A segregação dos animais no momento da ordenha, a desinfecção dos tetos, o tratamento de todos os animais na secagem, o descarte dos três primeiros jatos de leite e o tratamento imediato dos casos clínicos são fundamentais para o controle e prevenção da mastite nos rebanhos leiteiros²⁴.

A CCS do leite do tanque é um parâmetro importante para monitorar a saúde do úbere em um rebanho leiteiro, no entanto, a contagem individual de células somáticas é o parâmetro mais preciso para resumir a situação de mastite subclínica em um rebanho leiteiro e permitir tomadas de decisões em curto prazo em relação à saúde do úbere²⁵.

A elevação na CCS tem sido relacionada com perdas significativas na produção e alterações na composição do leite, alterações estas decorrentes da mastite. Bueno et al.²⁶ observaram uma redução significativa nos teores de

proteína, lactose e sólidos totais com o aumento da CCS. Já Vargas et al.²⁷ observaram aumento nos teores de gordura, proteína e minerais com a elevação da CCS, aumento este não favorável à qualidade do leite, enquanto os teores de lactose sofreram redução com o aumento da CCS, devido redução na síntese de lactose pela glândula mamária inflamada.

Cunha et al.²⁸ observaram redução progressiva na produção de leite com o aumento da CCS no leite, enquanto os teores de proteína e gordura aumentaram. Entre as classes ≤ 101.000 CS/mL e $\geq 3.000.000$ CS/mL houve redução de 19,4% na produção de leite, aumento de 6,2% no teor de proteína e aumento de 4,3% no teor de gordura. Em relação à ordem de lactação houve elevação da CCS no leite de vacas com maior número de lactações.

O aumento do teor de gordura, apesar da redução na síntese deste componente, pode ser explicado pelo fato de a redução na produção de leite devido à mastite ser mais acentuada que a redução na síntese de gordura, ocorrendo assim uma maior concentração deste componente²⁹. Ou essa elevação pode ser apenas de caráter relativo em virtude da redução nos demais componentes²⁶.

O aumento do teor de proteína, apesar da redução na síntese de caseína, pode ser explicado pela alteração da permeabilidade dos capilares sanguíneos da glândula mamária inflamada, o que permite um maior influxo de albuminas séricas e imunoglobulinas do sangue para o leite³⁰.

Outra consequência de uma CCS elevada é o aumento nos níveis de lipólise e proteólise no leite. A lipólise é espontânea quando causada por enzimas naturais no leite (lipases). No caso de elevação na CCS ocorre um aumento de enzimas originadas de células leucocitárias e bacterianas, chamada lipólise induzida. A lipólise e a proteólise são processos importantes de deterioração do leite cru durante o armazenamento, além de provocar redução do rendimento e vida de prateleira dos produtos lácteos³¹.

2.3.3 Composição Química

O leite é composto por uma mistura complexa de lipídios, proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. Para os filhotes de mamíferos, incluindo

humanos, o leite é o primeiro e único alimento ingerido por um período considerável de tempo. Com a domesticação dos animais o leite passou a fazer parte da dieta de seres humanos adultos, principalmente o leite de vaca³².

A composição químico-bromatológica da dieta, o potencial genético do rebanho e as diferentes condições climáticas entre as estações do ano podem causar variações na produção e composição química do leite³³. A gordura é o componente que sofre maior variação. Já a lactose, carboidrato predominante no leite, e os sais, são os componentes que sofrem menor variação³². A composição média do leite é de 87,3% de água; 3,8 % de gordura; 3,3 % de proteína; 4,9 % de lactose e 0,6 % de minerais. Seus componentes, principalmente proteína e gordura, estão diretamente relacionados ao rendimento industrial de queijos e demais derivados lácteos³⁴.

As proteínas são classificadas basicamente em caseínas e proteínas do soro. Todas as caseínas existem com fosfato de cálcio em um complexo esférico único e altamente hidratado conhecido como micela de caseína. As caseínas compreendem 80% das proteínas do leite bovino, logo, a coalhada formada pela aglomeração das micelas de caseína durante a fabricação de queijo contém a maior parte da proteína do leite. As outras proteínas passam para o soro de queijo, daí a designação proteínas do soro, sendo estas, β -lactoglobulinas, α -lactoalbuminas, albuminas séricas e imunoglobulinas. As caseínas, β -lactoglobulinas e α -lactoalbuminas são sintetizadas nas células epiteliais da glândula mamária. Já as albuminas séricas e imunoglobulinas são transportadas a partir do sangue para o lúmen alveolar³².

Os triglicerídios compreendem a maior parte dos lipídios do leite (96-98% do total de lipídios) e estão presentes na forma de glóbulos de gordura. Estes glóbulos são envoltos por material de membrana, que contém fosfolipídios e colesterol. Outros lipídios presentes no leite são ácidos graxos livres, diglicerídios e monoglicerídios³².

2.4 Qualidade do leite cru produzido no Brasil

Nero et al.³⁵ avaliaram a qualidade microbiológica do leite em 60 propriedades leiteiras localizadas na região de Viçosa, Minas Gerais. 24

propriedades (40%) tiveram contagens bacterianas inferiores a 100.000 UFC/mL, 23 (38,3%) entre 100.000 e 1.000.000 UFC/mL e 13 (21,7%) acima de 1.000.000 UFC/mL.

Martins e Lima³⁶ avaliaram a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado de propriedades rurais do município de Frutal, Minas Gerais, e encontraram resultados variando entre 7.900 e 220.000 UFC/mL no leite proveniente de ordenha manual e entre 7.900 e 64.000 UFC/mL no leite proveniente de ordenha mecânica.

Martins et al.³⁷ avaliaram a qualidade do leite cru em amostras colhidas de tanques de expansão no estado de Goiás. Do total de 30 amostras, 30% (9/30) apresentaram CBT acima de 1.000.000 UFC/mL, 46,67% (14/30) entre 100.000 e 1.000.000 UFC/mL e 23,33% (7/30) <100.000 UFC/mL. As médias de CBT destes três grupos foram de 9.200.000 UFC/mL; 450.000 UFC/mL e 51.000 UFC/mL, respectivamente.

Brasil et al.³⁸ coletaram amostras de leite cru refrigerado, ordenhado mecanicamente e armazenado em tanques de expansão, de 77 propriedades na região de Rio Verde – Goiás. Os resultados médios das análises foram de 3,51% de gordura, 3,27% de proteína, 4,42% de lactose, 12,14% de extrato seco total (EST), 8,64 de extrato seco desengordurado (ESD), 971.000 CS/mL e 911.000 UFC/mL.

Ribeiro Neto et al.³⁹ avaliaram a qualidade do leite cru refrigerado de vários estados da região nordeste do Brasil e encontraram médias de 3,7% de gordura; 3,2% de proteína; 4,4% de lactose; 609.000 CS/mL e 1.186.000 UFC/mL.

Mattos et al.⁴⁰ avaliaram a qualidade microbiológica do leite cru produzido na região Agreste de Pernambuco e encontraram altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos. Das 53 propriedades avaliadas, 44 (83%) apresentaram contagens acima de 1.000.000 UFC/mL. A média geral foi de 16.800.000 UFC/mL.

Ribeiro Junior et al.⁴¹ compararam a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido por pequenos produtores (49) e grandes produtores (21) no Estado do Paraná. Em relação aos pequenos produtores a média de CBT foi de 3.800.000 UFC/mL, enquanto para grandes

produtores a média foi de 15.000 UFC/mL, diferença devido principalmente às práticas de higiene e resfriamento rápido do leite adotado pelos grandes produtores. As médias de CCS foram 220.000 CS/mL e 390.000 CS/mL para pequenos e grandes produtores, respectivamente, o que pode ser explicado pelo fato de animais de alta produção serem mais afetados por mastite. As porcentagens de proteína, gordura e lactose foram de 3,60%, 4,08% e 4,46% para pequenos produtores e 3,16%, 3,47% e 4,54% para grandes produtores.

Na pesquisa realizada por Silva et al.⁴² no leite cru armazenado nos silos de estocagem de duas indústrias de laticínios localizadas no Sudoeste Goiano os valores médios encontrados foram de 3,66% de gordura, 3,20% de proteína, 4,41% de lactose, 12,17% de EST, 8,52% de ESD, 410.000 CS/mL e 142.000.000 de UFC/mL na indústria A e 3,66% de gordura, 3,20% de proteína, 4,45% de lactose, 12,23% de EST, 8,57% de ESD, 530.000 CS/mL e 283.000.000 de UFC/mL na indústria B.

Estes resultados mostram que é grande o número de amostras não conformes com a IN nº 62, que estabelece o limite máximo para CBT de 300.000 UFC/mL, indicando baixa qualidade microbiológica do leite produzido no Brasil. Os resultados elevados de CCS e CBT são preocupantes, pois indicam que as condições sanitárias do rebanho e as condições higiênicas não estão satisfatórias.

2.5 Análise da qualidade do leite por meio de equipamentos eletrônicos

Nas últimas décadas foram desenvolvidos equipamentos eletrônicos visando à análise de rotina da qualidade do leite cru. Os equipamentos utilizados para análises de CBT e CCS se baseiam na citometria de fluxo, como por exemplo, BactoScan FC® (Foss Electric®, Hillerod, Dinamarca) e Fossomatic 5000 Basic® (Foss Electric®, Hillerod, Dinamarca). Os equipamentos utilizados para análises de composição química do leite utilizam a metodologia de infravermelho, como por exemplo, MilkoScan 4000® (Foss Electric®, Hillerod, Dinamarca).

A CBT e a CCS são realizadas em equipamentos eletrônicos baseados no método de citometria de fluxo. O princípio da citometria de fluxo é o seguinte: uma suspensão de células é corada e forçada através de um tubo capilar, que é

iluminado em frente à objetiva de um microscópio. Cada célula que passa é registrada pelo sistema eletrônico de fotos associado ao microscópio⁴³.

Na CBT, antes da medição, todos os componentes do leite, com exceção das bactérias, são decompostos durante um período de incubação. Além disso, os aglomerados bacterianos são separados em bactérias individuais, que são tingidas com corante específico de DNA, brometo de etídio. Todos os reagentes envolvidos são automaticamente filtrados para evitar o risco de contaminação⁴³.

Uma seringa de precisão é utilizada para passar a amostra através de um citômetro de fluxo, apresentando as bactérias, uma a uma, a um feixe de luz fluorescente a partir de uma fonte de raio laser. As bactérias coradas emitem luz vermelha, com um pulso de luz para cada bactéria que passa pelo feixe. Os pulsos são contados e transformados em contagem individual de bactérias (CIB)⁴³.

Os limites legais para CBT, estabelecidos pela IN n°62, são expressos em UFC/mL porque o método de referência para a determinação da contagem bacteriana do leite é a contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios, em que se contam as colônias de bactérias e não as bactérias individuais. Assim, o resultado expresso em CIB pelo equipamento eletrônico é convertido para UFC/mL por meio de uma equação de regressão⁴³. Na citometria de fluxo todas as células bacterianas são contadas, mortas, viáveis e não cultiváveis e cultiváveis, independentemente das exigências de crescimento. Assim este método fornece resultados mais precisos do que o método de cultura, além de ser mais rápido e ter menor custo por amostra⁴⁴.

As análises de composição do leite são realizadas por equipamentos eletrônicos baseados na espectroscopia de infravermelho, sendo a espectroscopia de infravermelho médio a mais comum nas análises de leite e produtos lácteos. A principal vantagem desta técnica é sua elevada repetibilidade e a facilidade de amostragem⁴⁵.

O instrumento que obtém o espectro de absorção no infravermelho de um composto é chamado de espectrofotômetro, sendo o mais usado o de transformada de Fourier. Os padrões de absorção no infravermelho, ou espectro infravermelho, de duas moléculas de estruturas diferentes nunca são exatamente

idênticos. Assim, o espectro infravermelho pode servir para moléculas da mesma forma que impressões digitais servem para seres humanos⁴⁶.

2.6 Coleta e envio de amostras de leite para análises eletrônicas

As condições de coleta, armazenamento e transporte das amostras devem ser adequadas, de forma a evitar a contaminação ou deterioração das mesmas. A confiabilidade dos resultados das análises depende, em grande parte, destas condições que antecedem a chegada das amostras ao laboratório².

Há um consenso de que é necessário pelo menos cinco minutos de agitação para homogeneizar o leite em tanques de expansão antes de se realizar a coleta da amostra. Isto é importante para garantir que a amostra obtida seja representativa da totalidade do leite. Comumente utiliza-se uma agitação intermitente do leite combinada com uma agitação por um curto período de tempo antes da amostragem⁴⁷. Servelo⁴⁸ recomendam uma agitação intermitente durante o armazenamento do leite no tanque de dois minutos a cada hora. E sendo realizada a agitação intermitente, o tempo de agitação antes da amostragem pode ser reduzido de cinco para dois minutos.

Os frascos utilizados para armazenamento das amostras de leite são fornecidos pelo próprio laboratório responsável pelas análises. Os frascos utilizados para a CBT são previamente esterilizados e armazenados em sacos plásticos individuais, possuem tampa azul e contém um comprimido do conservante azidiol, de coloração azulada. Os frascos utilizados para a CCS e composição possuem tampa vermelha e contém um comprimido do conservante bronopol, de coloração alaranjada. Cada comprimido de conservante é suficiente para conservar 40 mL de leite².

O leite contido nos frascos também deve ser homogeneizado até a completa dissolução dos comprimidos para que o conservante se distribua uniformemente. As amostras devem ser mantidas sob-refrigeração desde a coleta até a entrega no laboratório, para isso devem ser transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável de forma a manter a temperatura inferior a 7°C².

2.7 Fatores interferentes na avaliação da qualidade do leite por métodos eletrônicos

2.7.1 Conservantes para amostras de leite

Para as análises de CCS e composição é recomendado o conservante bronopol, que contém os ingredientes ativos bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) e natamicina, que inibem o crescimento de bactérias e fungos, respectivamente. Para a CBT é recomendado o conservante azidiol, que contém azida sódica e cloranfenicol².

O bronopol possui ação bactericida, o que resulta em danos às células bacterianas, dificultando a identificação das mesmas pelos equipamentos. Por esse motivo não é recomendável sua utilização em amostras destinadas a CBT, pois os resultados seriam subestimados. O mesmo ocorre em caso de congelamento da amostra, que também provoca injúrias nas células bacterianas. Já o azidiol, ideal para CBT, não é recomendado para análises de composição e CCS, pois se observa uma redução nos teores de gordura, lactose e CCS das amostras conservadas com azidiol em relação às conservadas com bronopol³.

A natamicina é classificada segundo sua estrutura como um antibiótico poliênico, produzido por *Streptomyces natalensis*, muito eficiente contra bolores e leveduras, mas não contra bactérias. Seu modo de ação consiste em se ligar a esteróis da membrana induzindo à distorção na permeabilidade seletiva da mesma¹⁶.

2.7.2 Tempo e temperatura de armazenamento das amostras de leite

Nos Estados Unidos as análises para pagamento por qualidade são realizadas em amostras de leite cru sem conservante. As amostras são refrigeradas e devem chegar ao laboratório a uma temperatura de 0,0°C a 4,4°C e serem testadas no prazo máximo de 72 horas. Uma amostra de leite cru sem conservante é coletada em cada fazenda e a quantidade de leite em um frasco é suficiente para realizar as análises eletrônicas de CBT, CCS e composição. Com isso muitos laboratórios têm utilizado o mesmo frasco para realizar estas análises,

evitando custos adicionais de coleta de amostras separadas. A CBT é realizada primeiramente, antes da análise de composição, porque nesta última a amostra precisa ser aquecida a 40°C por 10 minutos, o que favorece o crescimento de bactérias. A BactoScan FC® (Foss Electric®, Hillerod, Dinamarca) remove uma porção representativa de leite, não interferindo nos resultados das análises posteriores de composição e CCS utilizando a mesma amostra⁴⁹.

No Brasil, para garantir a conservação das amostras de leite até o momento das análises, além da refrigeração utiliza-se também conservante próprio, o que permite manter as amostras em temperaturas mais elevadas e tempos de armazenamento mais prolongados.

De acordo com Martins et al.⁵⁰ amostras de leite cru destinadas à CBT podem ser analisadas em até seis dias após a coleta, se forem adicionadas de conservante azidiol e mantidas sob-refrigeração em temperatura entre 1°C e 4°C.

De acordo com Souza et al.⁵¹ amostras de leite cru destinadas à CCS contendo bronopol como conservante podem ser analisadas até sete dias após a coleta desde que a temperatura de armazenamento esteja entre 0°C e 4,4°C.

Segundo Cassoli et al.³ amostras destinadas à CBT podem ser analisadas em até sete dias após a coleta se adicionadas do conservante azidiol e mantidas sob-refrigeração a 7°C. E amostras destinadas às análises de composição química e CCS podem ser analisadas em até sete dias se adicionadas do conservante bronopol e mantidas sob-refrigeração a 7°C.

Segundo Leite⁴ amostras conservadas com bronopol e armazenadas sob-refrigeração até 7°C podem ser analisadas em até dez dias para CCS e composição. As amostras conservadas por azidiol e armazenadas sob-refrigeração de até 10°C podem ser analisadas para CBT em até dez dias após a coleta sem que ocorram diferenças significativas.

Atualmente são consideradas aptas para as análises eletrônicas, de acordo com norma técnica interna da RBQL, as amostras de leite cru refrigerado que chegam ao laboratório com conservante adequado e com temperatura na faixa de 1°C a 10°C. Estas amostras são mantidas sob-refrigeração no laboratório e devem ser analisadas no máximo até sete dias após a data da coleta.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento de amostras de leite cru refrigerado nos resultados das análises eletrônicas da qualidade do leite.

3.2 Específicos

- Determinar a temperatura e o tempo máximos de armazenamento das amostras de leite cru destinadas à análise de contagem bacteriana total sem que ocorra comprometimento dos resultados.
- Determinar a temperatura e o tempo máximos de armazenamento das amostras de leite cru destinadas às análises de contagem de células somáticas e composição química sem que ocorra comprometimento dos resultados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Dez amostras de leite cru refrigerado (5,1 litros cada amostra) foram coletadas de tanques de refrigeração por expansão direta de uso individual em dez propriedades leiteiras localizadas no município de Bela Vista de Goiás (GO), no dia 22 de novembro de 2014. Cada coleta foi realizada após a homogeneização do leite, para isso ligou-se o agitador do tanque por um período de cinco minutos. As amostras foram acondicionadas em galões plásticos e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo até o Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

No laboratório cada amostra foi homogeneizada com agitador mecânico e subdividida em 128 subamostras, de 40 mL cada, totalizando 1.280 subamostras. As subamostras foram acondicionadas em frascos plásticos contendo um comprimido de conservante, sendo 640 frascos contendo o conservante azidiol (Comprimido Azidiol, Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil), destinados à análise de CBT e 640 frascos contendo o conservante bronopol (Comprimido Brononata, Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil), destinados às análises de CCS e composição química.

Os frascos foram invertidos até a completa dissolução dos comprimidos e a seguir armazenados em quatro temperaturas diferentes (3°C, 11°C, 17°C e 25°C), sendo 320 frascos para cada temperatura. Destes 320 frascos 160 continham o conservante azidiol e 160 continham o conservante bronopol. Após 24 horas de armazenamento iniciaram-se as análises, que foram realizadas diariamente durante 16 dias consecutivos. Cada dia foram analisadas 80 subamostras (4 temperaturas x 2 conservantes x 10 fazendas).

4.2 Análises laboratoriais

As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Nas amostras contendo bronopol foram efetuadas as análises de CCS e composição química em equipamento eletrônico CombiFoss 5000® (Foss Electric, Hillerod, Dinamarca), sendo Fossomatic 5000basic® para CCS e MilkoScan 4000® (Foss Electric, Hillerod, Dinamarca) para composição química. Nas amostras contendo azidiol foram efetuadas as análises de CBT em equipamento eletrônico BactoScan FC® (Foss Electric, Hillerod, Dinamarca).

4.3 Análise estatística

Utilizou-se o esquema de parcelas subdivididas no tempo em delineamento de blocos ao acaso, em que cada fazenda foi considerada um bloco, tendo como parcelas as temperaturas de armazenamento (3°C, 11°C, 17°C e 25°C) e como subparcelas as idades das amostras (1, 4, 7, 10, 13 e 16 dias). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan. Os resultados de CBT e CCS foram transformados em logaritmo na base 10 para a análise estatística. Utilizou-se o software estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios, mínimos e máximos dos resultados de CBT, CCS e composição química no primeiro dia de análise de amostras de leite cru refrigerado armazenadas a 3°C estão apresentados na Tabela 2. Todas as fazendas apresentaram CBT de acordo com a legislação, que estabelece limite máximo de 300.000 UFC/mL. Quanto à CCS apenas uma fazenda apresentou resultado em desacordo com a legislação, com 599.000 CS/mL enquanto a IN n° 62 estabelece limite máximo de 500.000 CS/mL. Em relação aos resultados de composição química uma fazenda apresentou teor de gordura de 2,94%, enquanto a IN n° 62 estabelece limite mínimo de 3,0%. Outra fazenda apresentou teor de proteína de 2,89% e teor de extrato seco desengordurado (ESD) de 8,39, enquanto a IN n° 62 estabelece limite mínimo de 2,9% e 8,4% respectivamente.

Tabela 2 - Média, desvio padrão (DP) e valores mínimos e máximos dos resultados de composição química e CCS de amostras de leite cru refrigerado armazenadas por um dia a 3°C.

Variáveis analisadas	Média ± DP	Mínimo	Máximo
CBT (10 ³ UFC/mL)	17,08 ± 0,37	7	128
CCS (10 ³ CS/mL)	335,27 ± 0,15	192	599
Proteína (g/100g)	3,14 ± 0,14	2,89	3,35
Gordura (g/100g)	3,41 ± 0,34	2,94	3,92
Lactose (g/100g)	4,54 ± 0,11	4,33	4,72
EST (g/100g)	12,09 ± 0,32	11,64	12,67
ESD (g/100g)	8,68 ± 0,13	8,39	8,84

Para todas as variáveis analisadas ocorreu interação significativa entre temperatura e tempo. Nos resultados de CBT das amostras de leite cru refrigerado, armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas (Tabela 3) foi observado que os resultados das amostras armazenadas a 3°C não diferiram ($p>0,05$) das amostras armazenadas a 11°C ao longo dos 16 dias de armazenamento. Os resultados de CBT das amostras armazenadas a 17°C não diferiram ($p>0,05$) das amostras armazenadas a 3°C e 11°C até 10 dias de armazenamento. No primeiro dia de análise os resultados de CBT das amostras mantidas sob-refrigeração a 3°C, 11°C e 17°C não diferiram ($p>0,05$) das mantidas sob temperatura ambiente de 25°C. Portanto, somente o conservante azidiol foi suficiente para cessar o crescimento bacteriano nas amostras com um dia de armazenamento. Resultado diferente foi encontrado por Cassoli et al.³ em que as amostras mantidas a temperatura ambiente de 24°C já apresentaram uma CBT maior desde o primeiro dia de análise.

Os altos valores de CBT das amostras armazenadas à temperatura ambiente de 25°C ao longo dos 16 dias de armazenamento (Figura 1) ressaltam a importância da refrigeração juntamente com o conservante azidiol para cessar o crescimento bacteriano nas amostras de leite cru.

Tabela 3 - Médias dos resultados de CBT (log de UFC/mL) em amostras de leite cru armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tempo (dias)	Temperatura			
	3°C	11°C	17°C	25°C
1	4,2327 ^{aA}	4,2783 ^{aAB}	4,3106 ^{aA}	4,2309 ^{aA}
4	4,2753 ^{aA}	4,2922 ^{aAB}	4,3127 ^{aA}	5,4430 ^{bB}
7	4,3763 ^{aA}	4,4079 ^{aA}	4,4067 ^{aAB}	6,7217 ^{bC}
10	4,2436 ^{aA}	4,2718 ^{aAB}	4,4883 ^{aAB}	6,8380 ^{bC}
13	4,1493 ^{aA}	4,0899 ^{aB}	4,6866 ^{bB}	6,9187 ^{cC}
16	4,2349 ^{aA}	4,3348 ^{aAB}	5,1763 ^{bC}	7,2322 ^{cD}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$)

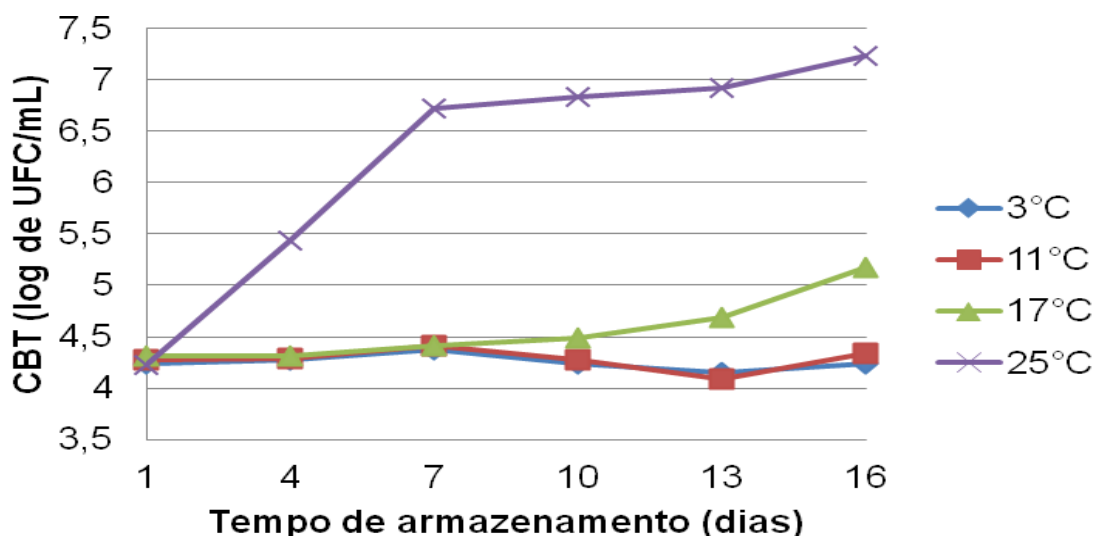


Figura 1 - Médias dos resultados de CBT (logUFC/mL) em amostras de leite cru armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

De acordo com Martins et al.⁵⁰ amostras destinadas à CBT mantidas sob-refrigeração entre 1°C e 4°C podem ser analisadas até 6 dias após a coleta. De acordo com Cassoli et al.³ as amostras destinadas à CBT armazenadas sob-refrigeração a 7°C podem ser analisadas por até sete dias após a coleta. Segundo Zeni⁵² amostras de leite de cabra armazenadas em temperaturas de até 10°C podem ser analisadas em até sete dias após a coleta sem que ocorram diferenças significativas na CBT. Souza et al.⁵³ verificaram que não houve diferença na CBT nas amostras armazenadas até 10°C ao longo dos sete dias de armazenamento. Segundo Leite⁴ amostras armazenadas sob-refrigeração a 4°C, 7°C e 10°C podem ser analisadas para CBT, sem que ocorram diferenças significativas, por até dez dias de armazenamento.

Os resultados encontrados por Cassoli et al.³; Zeni⁵²; Souza et al.⁵³ e Leite⁴ de sete, sete, sete e 10 dias, respectivamente, para o tempo de armazenamento de amostras de leite cru sem que ocorram diferenças significativas na CBT, correspondem ao tempo máximo pesquisado por cada autor.

Neste trabalho observou-se que as amostras destinadas à CBT podem ser armazenadas por um período ainda maior de tempo. Quando mantidas sob-

refrigeração até 11°C podem ser analisadas por até 16 dias de armazenamento. Já amostras armazenadas sob uma temperatura mais elevada, de 17°C, podem ser analisadas quanto a CBT por até 10 dias. Resultado diferente foi encontrado por Souza et al.⁵³ em que as amostras armazenadas a 17°C apresentaram diferença na CBT a partir do 5º dia.

Nos resultados de CCS das amostras de leite cru refrigerado, armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas (Tabela 4) foi observado que os resultados das amostras armazenadas a 3°C não diferiram ($p>0,05$) das amostras armazenadas a 11°C ao longo dos 16 dias de armazenamento. Os resultados de CCS das amostras armazenadas a 17°C não diferiram ($p>0,05$) das amostras armazenadas a 3°C e 11°C até sete dias de armazenamento. As amostras armazenadas à temperatura ambiente de 25°C apresentaram diferenças quanto a CCS a partir do 4º dia. De acordo com Souza et al.⁵¹ amostras armazenadas a 27°C, 32°C e 36°C apresentaram diferenças significativas quanto a CCS a partir do 5º, 5º e 3º dias, respectivamente. Segundo Leite⁴ amostras armazenadas a 30°C apresentaram diferenças significativas quanto a CCS a partir do 6º dia. Zeni⁵² não encontrou diferença entre as médias de CCS para as amostras de leite cru de cabra mantidas até 20°C e analisadas ao longo de cinco dias.

A CCS é maior nas amostras armazenadas sob-refrigeração do que nas amostras armazenadas em temperatura ambiente (Figura 2) porque a temperatura de refrigeração favorece a manutenção da integridade celular⁵⁴. Portanto a causa da diminuição da CCS com o avançar do tempo de armazenamento pode ser atribuída à lise celular⁵⁵. Gonzalo et al.⁵⁴ armazenaram amostras de leite de ovelha em temperatura ambiente de 18°C a 25°C e observaram decréscimo de 31,3% na CCS nas amostras com nove dias de armazenamento. Neste trabalho observou-se decréscimo de 47,9% na CCS nas amostras mantidas a temperatura ambiente de 25°C com 10 dias de armazenamento.

Leite⁴ observou uma redução de 14,89% na CCS de amostras mantidas sob-refrigeração (até 10°C) entre o primeiro (363,078 CS/mL) e o décimo dia de armazenamento (309,029 CS/mL). Neste trabalho houve uma

redução na CCS de apenas 1% nas amostras armazenadas a 11°C, de 340,88 CS/mL no primeiro dia para 337,44 CS/mL no décimo dia.

Outros autores também obtiveram resultados diferentes, como Sánchez et al.⁵⁶ que armazenaram amostras de leite de cabra sob-refrigeração a 4°C e observaram decréscimo de 5% na CCS nas amostras com 10 dias de armazenamento. Gonzalo et al.⁵⁴ armazenaram amostras de leite de ovelha sob-refrigeração a 4°C e observaram decréscimo de 2,8% na CCS nas amostras com nove dias de armazenamento. Paula et al.⁵⁵ observaram redução na CCS de 9,98% no sétimo dia de armazenamento de amostras sob-refrigeração.

Tabela 4 - Médias dos resultados de CCS (log de CS/mL) em amostras de leite cru armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tempo (dias)	Temperatura			
	3°C	11°C	17°C	25°C
1	5,5254 ^{aA}	5,5326 ^{aA}	5,5333 ^{aA}	5,5332 ^{aA}
4	5,5283 ^{abA}	5,5358 ^{aA}	5,5269 ^{aA}	5,4774 ^{bB}
7	5,5309 ^{aA}	5,5257 ^{aA}	5,5095 ^{aAB}	5,3553 ^{bC}
10	5,5332 ^{aA}	5,5282 ^{abA}	5,4670 ^{bBC}	5,2499 ^{cD}
13	5,5389 ^{aA}	5,5416 ^{aA}	5,4542 ^{bC}	5,1767 ^{cE}
16	5,5333 ^{aA}	5,5220 ^{aA}	5,3976 ^{bD}	4,9841 ^{cF}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

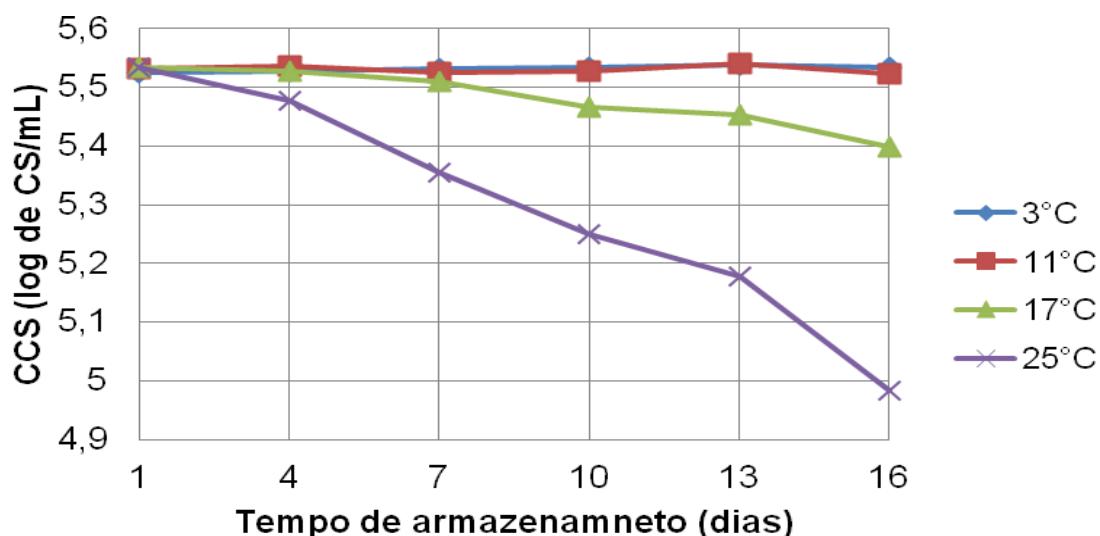


Figura 2 - Médias dos resultados de CCS (log CS/mL) em amostras de leite cru armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

De acordo com Cassoli et al.³ as amostras destinadas à CCS armazenadas sob-refrigeração a 7°C podem ser analisadas por até sete dias após a coleta. De acordo com Souza et al.⁵¹ amostras armazenadas sob-refrigeração a 5°C podem ser analisadas quanto a CCS até sete dias após a coleta. Segundo Zeni⁵² amostras de leite de cabra armazenadas em temperaturas de até 10°C podem ser analisadas em até sete dias após a coleta sem que ocorram diferenças significativas na CCS. Já segundo Leite⁴ amostras armazenadas sob-refrigeração até 7°C podem ser analisadas para CCS, sem que ocorram diferenças significativas, por até dez dias de armazenamento. Estes resultados encontrados por Cassoli et al.³; Souza et al.⁵¹; Zeni⁵² e Leite⁴ de sete, sete, sete e 10 dias, respectivamente, para o tempo de armazenamento de amostras de leite cru sem que ocorram diferenças significativas na CCS, correspondem ao tempo máximo pesquisado por cada autor.

Neste trabalho observou-se que as amostras destinadas à CCS podem ser armazenadas por um período ainda maior de tempo. Quando mantidas sob-refrigeração até 11°C podem ser analisadas com até 16 dias de armazenamento. Quando armazenadas sob uma temperatura mais elevada, de 17°C, as amostras podem ser analisadas por até sete dias.

Em relação aos resultados de composição química (teores de proteína, gordura, lactose, EST e ESD) apesar de o teste de Duncan apresentar diferenças no decorrer do armazenamento, na prática não houve diferença entre os resultados de composição química durante os 16 dias analisados, independentemente da temperatura de armazenamento (Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 e Figuras 3, 4, 5, 6 e 7). Podemos concluir isto levando em consideração que os equipamentos eletrônicos utilizados para as análises apresentam limites de aceitabilidade para o desvio padrão da repetibilidade de 0,06% para proteína, gordura e lactose e 0,1% para EST e ESD. Considerando os resultados das amostras de um dia a 3°C como controle, todos os demais resultados estão dentro destes limites de aceitabilidade⁵⁷.

Cassoli et al.³ encontrou resultados semelhantes. Durante os sete dias avaliados não houve diferença entre as amostras refrigeradas (7°C) e as mantidas em temperatura ambiente (24°C) em relação aos teores de proteína, gordura, lactose e EST. Por outro lado, segundo Leite⁴ os resultados das amostras mantidas à temperatura ambiente de 30°C diferiram a partir do quinto dia de armazenamento para EST e a partir do sexto dia para teor de lactose. Em relação aos teores de proteína, gordura e ESD das amostras mantidas sob mesma temperatura (30°C) não houve diferença significativa durante os oito dias avaliados. Já as amostras mantidas sob-refrigeração até 10°C não apresentaram diferenças significativas durante os 10 dias avaliados em relação as análises de composição química.

De acordo com Sánchez et al.⁵⁶ amostras de leite de cabra armazenadas sob-refrigeração a 4°C não apresentam diferenças significativas para EST e proteína por até 42 dias de armazenamento.

Tabela 5 - Médias dos valores de proteína (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tempo (dias)	Temperatura			
	3°C	11°C	17°C	25°C
1	3,14 ^{aC}	3,14 ^{aD}	3,15 ^{aB}	3,14 ^{aC}
4	3,14 ^{bC}	3,15 ^{abCD}	3,15 ^{abB}	3,15 ^{aAB}
7	3,16 ^{aB}	3,15 ^{abBC}	3,15 ^{bcB}	3,14 ^{cC}
10	3,16 ^{aB}	3,16 ^{aB}	3,16 ^{aA}	3,16 ^{aA}
13	3,17 ^{aA}	3,17 ^{aA}	3,16 ^{aA}	3,15 ^{bBC}
16	3,14 ^{abC}	3,15 ^{aCD}	3,14 ^{bcC}	3,13 ^{cD}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

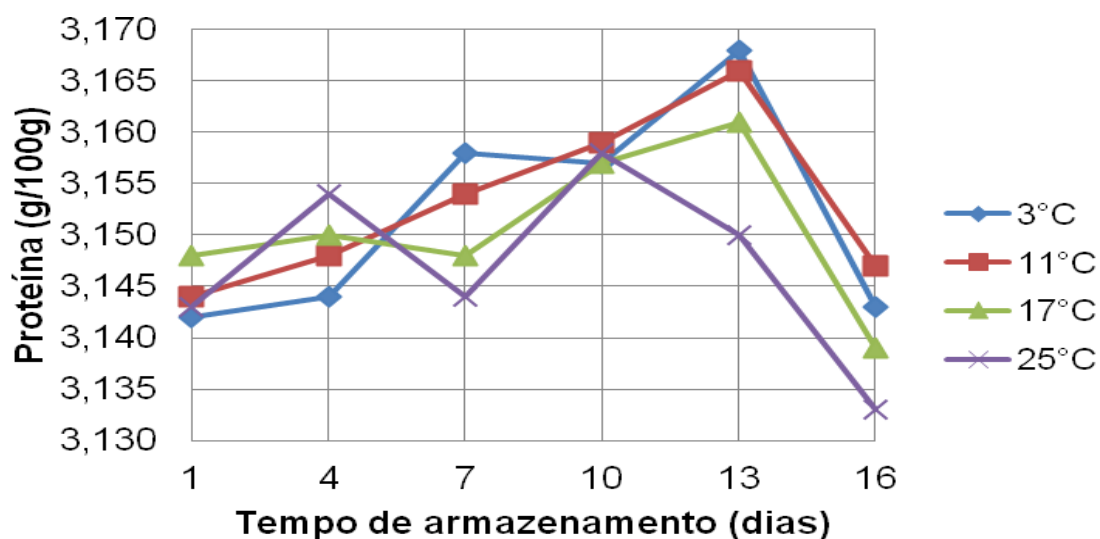


Figura 3 - Médias dos valores de proteína (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tabela 6 - Médias dos valores de gordura (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tempo (dias)	Temperatura			
	3°C	11°C	17°C	25°C
1	3,41 ^{bB}	3,45 ^{aA}	3,44 ^{aAB}	3,43 ^{abAB}
4	3,43 ^{aAB}	3,41 ^{aBC}	3,41 ^{aC}	3,37 ^{bC}
7	3,42 ^{abAB}	3,41 ^{bBC}	3,44 ^{aAB}	3,42 ^{abAB}
10	3,43 ^{abAB}	3,42 ^{abAC}	3,44 ^{aAB}	3,40 ^{bB}
13	3,42 ^{aAB}	3,40 ^{aC}	3,42 ^{aBC}	3,35 ^{bC}
16	3,45 ^{aA}	3,43 ^{aAB}	3,46 ^{aA}	3,44 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

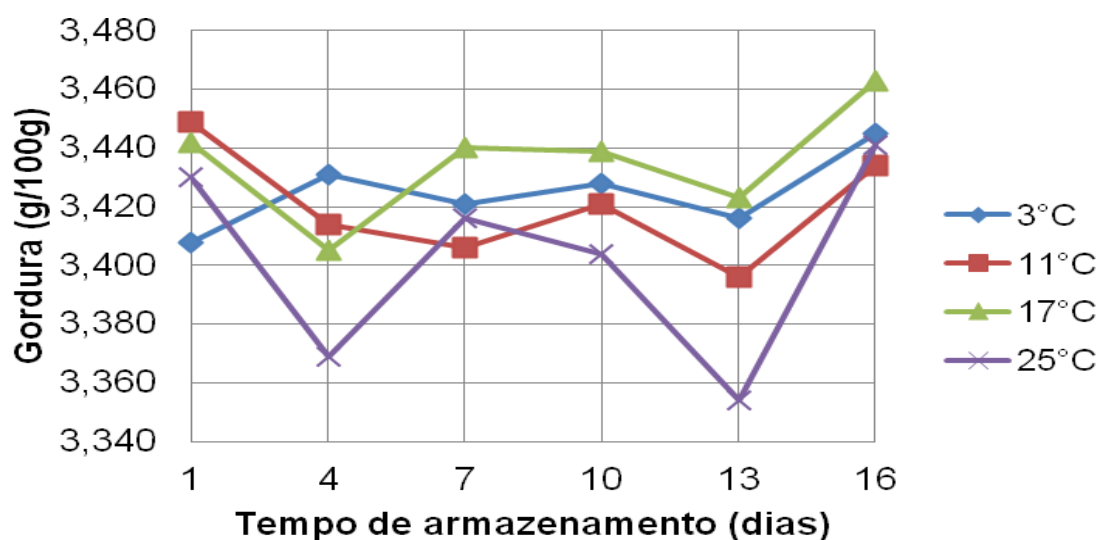


Figura 4 - Médias dos valores de gordura (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tabela 7 - Médias dos valores de lactose (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tempo (dias)	Temperatura			
	3°C	11°C	17°C	25°C
1	4,54 ^{aC}	4,54 ^{aC}	4,55 ^{aC}	4,55 ^{aB}
4	4,56 ^{aAB}	4,56 ^{aA}	4,56 ^{aA}	4,56 ^{aA}
7	4,56 ^{abAB}	4,57 ^{aA}	4,56 ^{abAB}	4,55 ^{bAB}
10	4,55 ^{aB}	4,55 ^{aB}	4,55 ^{aBC}	4,55 ^{aB}
13	4,56 ^{abA}	4,57 ^{aA}	4,56 ^{bAC}	4,55 ^{bAB}
16	4,56 ^{abAB}	4,56 ^{aA}	4,55 ^{bC}	4,53 ^{cC}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

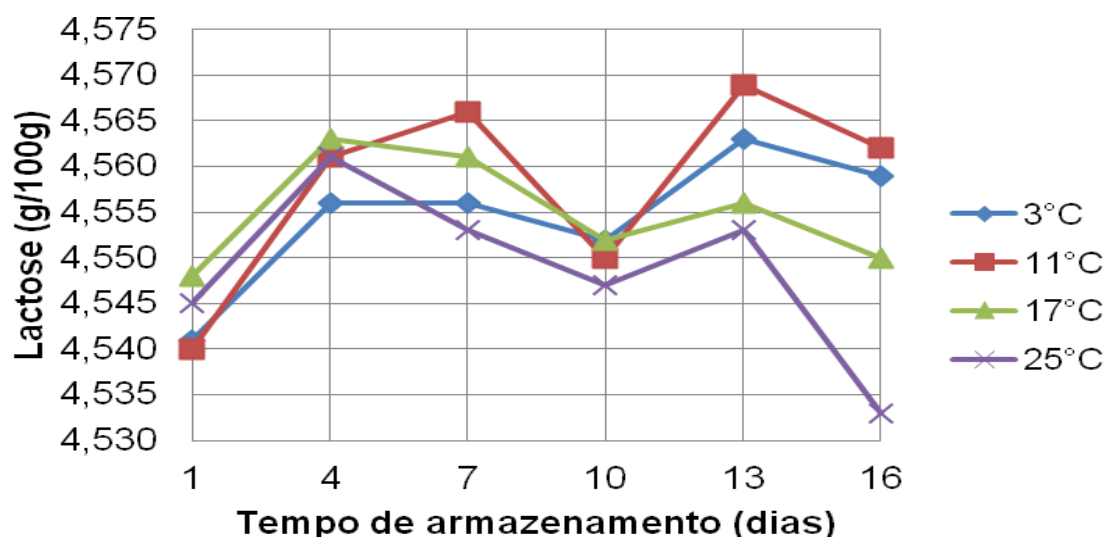


Figura 5 - Médias dos valores de lactose (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tabela 8 - Médias dos valores de extrato seco total (EST) (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado adicionadas de bronopol e armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tempo (dias)	Temperatura			
	3°C	11°C	17°C	25°C
1	12,09 ^{bB}	12,13 ^{aA}	12,14 ^{aA}	12,12 ^{abA}
4	12,14 ^{aA}	12,13 ^{aA}	12,12 ^{aA}	12,09 ^{bAB}
7	12,14 ^{abA}	12,13 ^{abA}	12,16 ^{aA}	12,12 ^{bA}
10	12,14 ^{abA}	12,13 ^{abA}	12,15 ^{aA}	12,11 ^{bA}
13	12,15 ^{aA}	12,13 ^{aA}	12,15 ^{aA}	12,06 ^{bB}
16	12,15 ^{aA}	12,15 ^{abA}	12,16 ^{aA}	12,11 ^{bA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

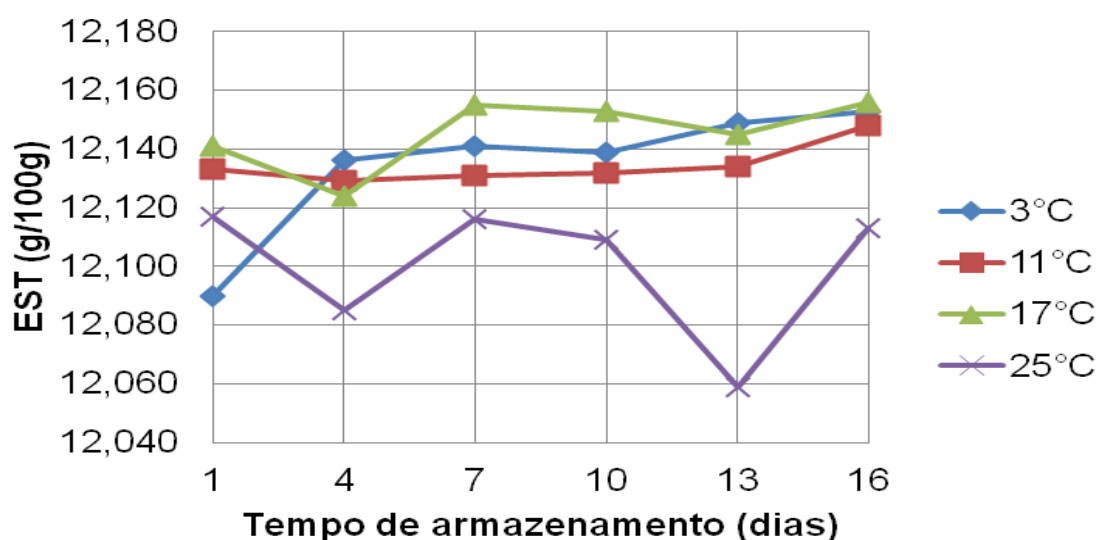


Figura 6 - Médias dos valores de extrato seco total (EST) (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tabela 9 - Médias dos valores de extrato seco desengordurado (ESD) (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Tempo (dias)	Temperatura			
	3°C	11°C	17°C	25°C
1	8,68 ^{aC}	8,68 ^{aC}	8,70 ^{aBC}	8,69 ^{aBC}
4	8,71 ^{aB}	8,72 ^{aB}	8,72 ^{aA}	8,72 ^{aA}
7	8,72 ^{aAB}	8,73 ^{aAB}	8,72 ^{abAB}	8,70 ^{bAB}
10	8,71 ^{aB}	8,71 ^{aB}	8,71 ^{aAB}	8,71 ^{aA}
13	8,73 ^{aA}	8,74 ^{aA}	8,72 ^{aA}	8,71 ^{bA}
16	8,71 ^{abB}	8,71 ^{aB}	8,69 ^{bC}	8,67 ^{cC}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

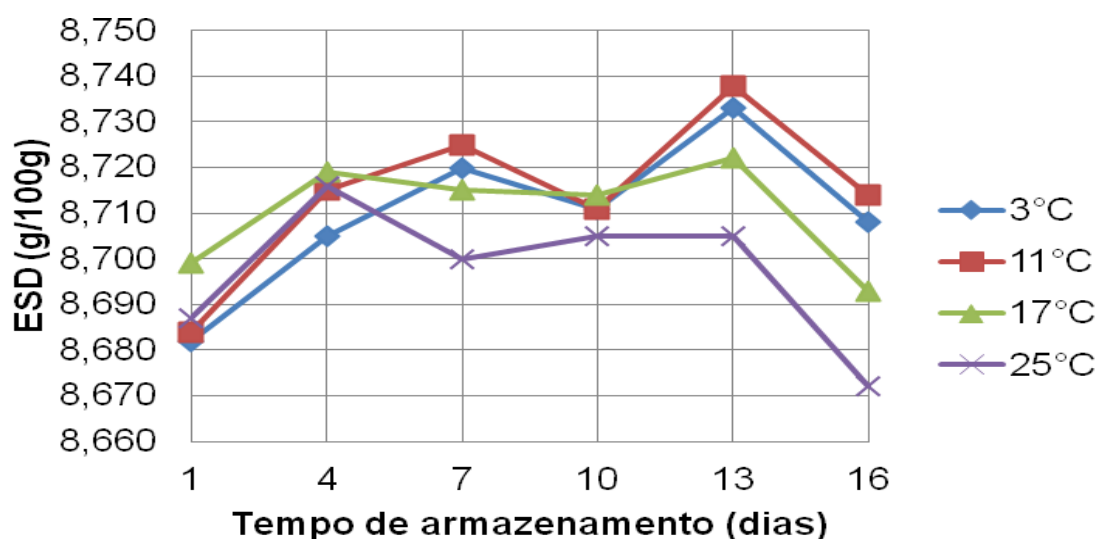


Figura 7 - Médias dos valores de extrato seco desengordurado (ESD) (g/100g) em amostras de leite cru refrigerado armazenadas durante 16 dias em diferentes temperaturas.

Mesmo não havendo diferença em relação ao tempo e temperatura de armazenamento para as análises de composição química, uma vez que a mesma amostra é utilizada tanto para a análise de composição quanto para a análise de CCS, faz-se necessário atender às mesmas exigências de tempo e temperatura das amostras destinadas a CCS.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem a possibilidade de prolongar a vida útil das amostras de leite cru refrigerado sem comprometer a confiabilidade dos resultados.

6. CONCLUSÃO

Amostras de leite cru refrigerado destinadas à análise de CBT, adicionadas do conservante azidiol, podem ser analisadas por até 16 dias após a coleta quando armazenadas em temperaturas de 3°C e 11°C e por até 10 dias quando armazenadas a 17°C sem que ocorram diferenças significativas nos resultados.

Amostras de leite cru refrigerado destinadas às análises de CCS e composição química, adicionadas do conservante bronopol, podem ser analisadas por até 16 dias após a coleta quando armazenadas em temperaturas de 3°C e 11°C e por até sete dias quando armazenadas a 17°C sem que ocorram diferenças significativas nos resultados.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Instrução Normativa nº 62 de 29 dez 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União, Brasília (30 dez 2011); Sec.1.
2. Brito JRF, Souza GN, Faria CG, Moraes LCD. Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias. Circular técnica 92 Embrapa gado de leite. 2007.
3. Cassoli LD, Machado DF, Coldebella A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação de contagem bacteriana total por citometria de fluxo. Rev bras zootec. 2010;39(2):434-39.
4. Leite MO. Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária; 2006.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Food and Agricultural commodities production [Internet]. [acesso 25 mar 2015]. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estatística da Produção Pecuária [Internet]. [acesso 25 mar 2015]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf
7. Cardoso VL, Lima MLPL, Nogueira JR, Carneiro RLR, Sesana RC, Oliveira EJ, Faro LE. Economic values for milk production and quality traits in south and southeast regions of Brazil. R Bras Zootec. 2014;43(12):636-42.
8. Nightingale C, Dhuyvetter K, Mitchell R, Schukken Y. Influence of variable milk quality premiums on observed milk quality. J Dairy Sci. 2008;91(3):1236-44.
9. Botaro BG, Gameiro AH, Santos MV. Quality based payment program and milk quality in dairy cooperatives of Southern Brazil: an econometric analysis. Sci Agric. 2013;70(1):21-6.

10. Guerreiro PK, Machado MRF, Braga GC, Gasparino E, Franzener ASM. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. *Ciênc Agrotec*. 2005;29(1):216-22.
11. Silva LCC, Beloti V, Tamanini R, Ovidio L, Mattos MR, Arruda AMCT, Pires EMF. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do agreste Pernambucano. *Semin Cienc Agrar*. 2011;32(1):267-76.
12. Perkins NR, Kelton DF, Hand KJ, MacNaughton G, Berke O, Leslie KE. An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario Canada. *J Dairy Sci*. 2009;92(8):3714–22.
13. Matsubara MT, Beloti V, Tamanini R, Fagnani R, Silva LCC, Monteiro AA, Battaglini APP, Ortolani MBT, Barros MAF. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. *Cienc Agrar*. 2011;32(1):277-86.
14. Vallin VM, Beloti V, Battaglini APP, Tamanini R, Fagnani R, Angela HL, Silva LCC. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. *Semin Cienc Agrar*. 2009;30(1):181-8.
15. Picoli T, Zani JL, Bandeira FS, Roll VFB, Ribeiro MER, Vargas GDA, Hübner SO, Lima M, Meireles MCA, Fischer G. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de microorganismos em leite cru. *Semin Cienc Agrar*. 2014;35(4):2471-80.
16. Landgraf M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: Franco BDGM, editor. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Ateneu; 1996. p.109-48.
17. Eckstein II, Pozza MSS, Tsutsumi CY, Pozza PC, Sabedot MA, Wobeto JR. Composição e qualidade do leite em diferentes tipos e tempos de resfriamento. *Arch vet sci*. 2013;18(4):46-56.
18. Jonghe VD, Coorevits A, Hoorde KV, Messens W, Landschoot AV, Vos PD, Heyndrickx M. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl environ microbiol*. 2011;77(2):460-70.

19. Baur C, Krewinkel M, Kranz B, Neubeck M, Wenning M, Scherer S, Stoeckel M, Hinrichs J, Stressler T, Fischer L. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *Int dairy j.* 2015; 49:23-29.
20. Santos AS, Pires CV, Santos JM, Sobrinho PSC. Crescimento de microorganismos psicrótróficos em leite cru refrigerado. *Alim Nutr Braz J Food Nutr.* 2013;24(3):297-300.
21. Perin LM, Moraes PM, Almeida MV, Nero LA. Interferência de temperaturas de estocagem no desenvolvimento da microbiota mesófila, psicrótrófica, lipolítica e proteolítica de leite cru. *Semin Cienc Agrar.* 2012;33(1):333-42.
22. Reche NLM, D'Ovideo ATNL, Felipus NC, Pereira LC, Cardozo LL, Lorenzetti RG, Picinin LCA. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. *Cienc Rural.* 2015;45(5):828-34.
23. Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci.* 1994;77:2103-12.
24. Coentrão CM, Souza GN, Brito JRF, Paiva e Brito MAV, Lilenbaum W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008;60(2):283-8.
25. Lievaart JJ, Reneau JK, Kremer WDJ, Barkema HW. Short communication: Influence of sampling interval on the accuracy of predicting bulk milk somatic cell count. *J Dairy Sci.* 2011;94(2):804–07.
26. Bueno VFF, Mesquita AJ, Nicolau ES, Oliveira NA, Oliveira JP, Neves RBS, Mansur JRG, Thomaz LW. Contagem celular somática: relação com a composição química do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Cienc Rural.* 2005;35(4):848-54.
27. Vargas DP, Nörnberg JL, Mello RO, Sheibler RB, Breda FC, Milani MP. Correlações entre contagem de células somáticas e parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do leite. *Cienc anim bras.* 2014;15(4):473-83.

28. Cunha RPL, Molina LR, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Ferreira PM, Gentilini MB. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008;60(1):19-24.
29. Machado PF, Pereira AR, Sarríes GA. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Rev bras zootec.* 2000;29(6):1883-86.
30. Pereira AR, Silva LFP, Molon LK, Machado PF, Barancelli G. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 1999;36(3).
31. Ma Y, Ryan C, Barbano DM, Galton DM, Rudan MA, Boor JK. Effects of somatic cell count on quality and Shelf-Life of pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci.* 2000;83(2):264–74.
32. Swaisgood HE. Characteristics of milk. Damodaran, Parkin KL, Fennema OR, Editors. *Food chemistry.* New York: CRC Press;1996. p.885-922.
33. Fagan EP, Jobim CC, Calixto Júnior M, Silva MS, Santos GT. Fatores ambientais e de manejo sobre a composição química do leite em granjas leiteiras do Estado do Paraná, Brasil. *Acta Sci Anim Sci.* 2010;32(3):309-16.
34. Torres EAFS. Composição química e valor calórico de alimentos de origem animal. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2000;20(2):145-50.
35. Nero LA, Viçosa GN, Pereira FEV. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Cienc tecnol aliment.* 2009;29(2):386-90.
36. Martins ES e Lima CMF. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado obtido de propriedades rurais do município de Frutal-MG: comparação das ordenhas mecânica e manual. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial.* 2013;7(1):955-64.

37. Martins MEP, Nicolau ES, Mesquita AJ, Neves RBS, Arruda MT. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. *Cienc anim bras.* 2008;9(4):1152-58.
38. Brasil RB, Silva MAP, Carvalho TS, Cabral JF, Nicolau ES, Neves RBS. Avaliação da qualidade do leite cru em função do tipo de ordenha e das condições de transporte e armazenamento. *Rev Inst Latic "Cândido Tostes"*. 2012;67(389):34-42.
39. Ribeiro Neto AC, Barbosa SBP, Jatobá RB, Silva AM, Silva CX, Silva MJA, Santoro KR. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2012;64(5):1343-51.
40. Mattos MR, Beloti V, Tamanini R, Magnani DF, Nero LA, Barros MAF, Pires EMF, Paquereau BPD. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. *Semin Cienc Agrar.* 2010;31(1):173-81.
41. Ribeiro Junior JC, Tamanini R, Silva LCC, Beloti V. Quality of milk produced by small and large dairy producers. *Semin Cienc Agrar.* 2015;36(2):883-88.
42. Silva MAP, Santos PA, Leão KM, Neves RBS, Guimarães KC, Nicolau ES. Qualidade do leite na indústria de laticínios. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2010;69(1):23-28.
43. FOSS. BactoScan FC. The approved rapid method for determination of total bacteria in raw milk. Denmark. 2013.
44. Ramsahoi L, Gao A, Fabri M, Odumeru JA. Assessment of the application of an automated electronic milk analyzer for the enumeration of total bacteria in raw goat milk. *J Dairy Sci.* 2011;94(7):3279–287.
45. Karoui R e Baerdemaeker J. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food chem.* 2007;102:621-40.
46. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. Introdução à espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning; 2010. 716p.
47. Goodridge L, Hill AR, Lencki RW. A review of international standards and the scientific literature on farm milk bulk-tank sampling protocols. *J Dairy Sci.* 2004;87(9):3099–104.

48. Servello V, Hill AR, Lencki RW. Towards an Optimum Mixing Protocol for On-Farm Bulk Milk Sampling. *J Dairy Sci.* 2004;87:2846-53.
49. Wojciechowski KL, Melilli C, Barbano DM. Effect of microbiological testing on subsequent mid-infrared milk component analysis of the same milk sample. *J Dairy Sci.* 2014;97(9):5885–97.
50. Martins MEP, Nicolau ES, Mesquita AJ, Neves RBS, Oliveira JP. Conservantes bronopol e azidiol: influência do binômio tempo/temperatura na contagem bacteriana total do leite cru. *Cienc anim bras.* 2009;10(2):627-33.
51. Souza GN, Silva MR, Sobrinho FS, Coelho RO, Brito MAVP, Brito JRF. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem de células somáticas no leite. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2005;57(5):830-34.
52. Zeni E. Efeito do binômio tempo e temperatura de conservação sobre o aspecto de qualidade higiênico-sanitário de leite de cabra. [Dissertação]. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia de Bioquímica; 2014.
53. Souza GN, Faria CG, Rios RJ, Oliveira VC, Santos RRD, Arcuri EF, Lange C, Brito MAVP, Brito JRF. Efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem total de bactérias em amostras de leite cru conservadas com azidiol. XXIII Congresso Nacional de Laticínios; 2006; Juiz de Fora, Brasil. *Anais. Rev Inst Latic “Cândido Tostes”.* 2006;61(351):358-61.
54. Gonzalo C, Martínez JR, Carriedo JA, San Primitivo F. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. *J Dairy Sci.* 2003;86:138-45.
55. Paula MC, Ribas NP, Monardes HG, Arce JE, Andrade UVC. Contagem de células somáticas em amostras de leite. *R Bras Zootec.* 2004;33(5):1303-08.
56. Sánchez A, Sierra D, Luengo C, Corrales JC, Morales CT, Contreras A, Gonzalo C. Influence of storage and preservation on fossomatic cell count and composition of goat milk. *J Dairy Sci.* 2005;88:3095-100.

57. International Dairy Federation. Whole milk – determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid infrared instruments. IDF Standard 141C. Brussels: International Dairy Federation, 2000, 8p.