

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

**INFLUÊNCIA DO GRUPO DE MICRORGANISMOS – MESÓFILOS,
PSICROTRÓFICOS – NA LINEARIZAÇÃO DOS RESULTADOS
DO EQUIPAMENTO BACTOSCAN FC®.**

Rodrigo Balduino Soares Neves

Orientador : Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

GOIÂNIA

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) 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: **Rodrigo Balduino Soares Neves** CPF: E-mail: rbsneves@cpa.vet.ufg.br

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

Vínculo Empregatício do autor: **FUNAPE** Agência de fomento:

País: **Brasil** UF: **Goiás** CNPJ: **00799205/0001-89** Sigla: **Funape/EV/CPA/LQL**

Título: **INFLUÊNCIA DO GRUPO DE MICRORGANISMOS – MESÓFILOS, PSICOTRÓFICOS – NA LINEARIZAÇÃO DOS RESULTADOS**

DO EQUIPAMENTO BACTOSCAN FC®. Palavras-chave: Citrometria de fluxo, contagem bacteriana total, psicrotróficos, mesófilos, azidiol.

Título em outra língua: **INFLUENCE OF MESOPHYLIC AND PSYCROPHYLIC MICROORGANISMS ON BACTOSCAN FC® RESULTS LINEARIZATION**

Palavras-chave em outra língua: **Flow cytometry; bacterial total count; psychrophylic; mesophylic; azidiol.**

Área de concentração: **Higiene e Tecnologia de Alimentos** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **22/08/2008**

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

Orientador(a): **Prof. Dr. Albenones José de Mesquita** CPF: E-mail: albenones@funape.org.br

Co-orientador(1): **Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau** CPF: E-mail: rena@cpa.vet.ufg.br

Co-orientador(2): **Prof. Dr. Cristiano Sales Prado** CPF: E-mail: pradocs@cpa.vet.ufg.br

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação 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 12 de setembro de 2008

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.

RODRIGO BALDUINO SOARES NEVES

**INFLUÊNCIA DO GRUPO DE MICRORGANISMOS – MESÓFILOS,
PSICROTRÓFICOS – NA LINEARIZAÇÃO DOS RESULTADOS
DO EQUIPAMENTO BACTOSCAN FC®.**

Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre junto ao
programa de pós-graduação
em Ciência Animal da Escola
de Veterinária da Universidade
Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Higiene e Tecnologia de Alimentos.

Linha de Pesquisa:

Controle de Qualidade de Alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau

Prof. Dr. Cristiano Sales Prado

GOIÂNIA

2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(GPT/BC/UFG)

Neves, Rodrigo Balduino Soares.
N514i **Influência do grupo de microrganismos – mesófilos, psicrotróficos – na linearização dos resultados do equipamento bactoscan FC®.[manuscrito] / Rodrigo Balduino Soares Neves. – 2008. vi,40f. : il. ; figs., tabs.**

Orientadores: Prof. Dr. Albenones José de Mesquita; **Co-Orientadores:** Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau, Prof. Dr. Cristiano Sales Prado.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2008.

Bibliografia: f.33-38.
Inclui listas de figuras e de tabelas.
Anexos.

1. Leite – Microbiologia – Análise 2. Microbiologia veterinária 3. Citometria de fluxo 2. Contagem bacteriana total 3. Psicrotróficos 4. Mesófilos 5. Azidiol I. Mesquita, Albenones José de. II. Nicolau, Edmar Soares. III. Prado, Cristiano Sales. IV. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária. V. Título.

CDU: 637.12:579.62

RODRIGO BALDUINO SOARES NEVES

Dissertação defendida e aprovada em ___/___/_____, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

**Prof. Dr. Albenones José de Mesquita – EV/UFG
(Orientador)**

**Prof. Dr. Antonio Nonato Oliveira – EV/UFG
(Membro)**

**Dr. Válter Ferreira Félix Bueno – MAPA – SFA-TO
(Membro)**

*Dedico a Deus ,
meu pai Berlim Balduino Dias,
minha mãe Sueli Soares Dias e
meus irmãos Andrey, Maraisa e Breno.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Albenones José de Mesquita, pela orientação, pela confiança e pela amizade. Obrigado por sempre acreditar, apoiar e incentivar o meu desenvolvimento profissional. O senhor para mim tem o mesmo valor de um Pai.

Ao professor Antonio Nonato de Oliveira por apoiar e viabilizar a execução deste trabalho.

Ao professor Edmar Soares Nicolau por me apoiar e acreditar em todas as minhas decisões.

Ao meu colega de graduação e amigo Válter Ferreira Félix Bueno, quem me incentivou e em quem eu tento me espelhar.

À colega e amiga Karyne Oliveira Coelho pelo precioso auxílio no experimento, pela presteza, alegria, companheirismo e ajuda imprescindível e colaboração na análise estatística dos resultados.

À colega Camila Silveira de Melo pela imprescindível ajuda e execução da análise estatística dos resultados.

Aos colegas e amigos Rolando, Marcele e Camila que contribuíram no tradução de trabalhos científicos afim de facilitar o nosso entendimento.

Aos funcionários do LQL, Silmara, Leandro e Adriele, assim como os estagiários que me auxiliaram, estando sempre disponíveis para me ajudar, com paciência e ótimo humor.

À Cíntia Ninafra, pela amizade e auxílio em todos os momentos difíceis que precisei de uma palavra amiga ou um conselho.

À Fabianne Fava que abriu mão de muitos finais de semanas, em função do desenvolvimento deste experimento, pelo apoio, compreensão e companheirismo.

Aos professores e amigos do Centro de Pesquisa em Alimentos – CPA, em especial a Sandra Queiroz e Rosângela Nunes que realizaram as análises da metodologia de referência no Laboratório de Microbiologia do CPA, pelo apoio, sugestões e ensinamentos valiosos durante toda a realização do curso.

À estagiária Tainá que esteve sempre disposta a colaborar com a realização da coleta das amostras deste experimento, enfrentando com garra as madrugadas frias e tardes quentes dentro da boleia do caminhão de transporte de leite.

Aos transportadores de leite que tiveram a paciência e compreensão para a realização de experimento.

Aos meus eternos amigos e companheiros de faculdade André, Luciano, Luiz Henrique, Tácio e Fábio, que mesmo distante, acreditaram nesta minha conquista.

*“Não devemos resistir às tentações...
Elas podem não voltar mais.”*

Millôr Fernandes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Microbiologia do Leite	4
2.2. Situação da Qualidade do leite no Brasil, pelo parâmetro de CBT	7
2.3. Métodos de Análises bacteriológicas em Leite.....	9
2.3.1. Contagem Bacteriana Total pelo método de Citometria de fluxo.....	9
2.3.2. Contagem Bacteriana Total pelo método de referência	11
2.4. Metodologias de Citometria de Fluxo <i>versus</i> de Referência para CBT.	13
2.5. Conservação da amostras para contagem bacteriana total	16
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 Geral	19
3.2 Específicos	19
4.MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Coleta e conservação das amostras de leite.....	20
4.2 Análise laboratorial	21
4.2.1 Preparo de amostras.....	21
4.2.2 Análise de CBT por citometria de fluxo.....	22
4.2.3 Contagem Padrão em Placas de microrganismos mesófilos e psicrotróficos.	23
4.3 Calibração do equipamento	24
4.4 Análise estatística	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema do funcionamento do Bactoscan FC [®] (adaptado de Foss Electric, Hillerod, Dinamarca).....	11
Figura 2 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de microrganismos psicrotróficos, em amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de janeiro a novembro de 2007.....	26
Figura 3 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de microrganismos mesófilos, em amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de janeiro a novembro de 2007.....	28
Figura 4 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e para a contagem de mesófilos no período das chuvas, em amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de janeiro a abril de 2007 e novembro de 2007.....	29
Figura 5 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e para a contagem de mesófilos no período da sêca, em amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de maio a outubro de 2007.	29
Figura 6 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de mesófilos em amostras de leite cru conservadas com azidiol líquido, coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de janeiro a junho de 2007.....	31
Figura 7 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de mesófilos em amostras de leite cru conservadas com azidiol em comprimido, coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de outubro e novembro de 2007.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análises descritivas das amostras de leite cru colhidas e conservadas com azidiol (CBI e CBT) e sob refrigeração (mesófilos e psicotróficos), de janeiro a novembro de 2007, no entorno de Goiânia-GO (n = 366).....	25
Tabela 2 Comparação entre os valores de CBI, CBT, Mesófilos e Psicotróficos das amostras de leite cru colhidas no período das chuvas (n = 266), de janeiro a abril e novembro de 2007 e seca (n = 100), de maio a outubro de 2007, no entorno de Goiânia-GO.	26
Tabela 3 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos psicotróficos.	40
Tabela 4 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos.	40
Tabela 5 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos, no período das chuvas.	40
Tabela 6 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos, no período das secas.	40
Tabela 7 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos, em amostras conservadas com azidiol na apresentação líquida.	40
Tabela 8 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos, em amostras conservadas com azidiol na apresentação de comprimido.	40

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo determinar o grupo de microrganismo – mesófilos ou psicotróficos – mais adequado para linearização de resultados do equipamento Bactoscan FC[®] e avaliar a eficiência do azidiol em comprimido na conservação de amostras de leite cru destinadas à análise de contagem bacteriana total – CBT. Entre os meses de janeiro e novembro de 2007, foram colhidas 732 amostras, com 40 mL cada, que compuseram três grupos distintos, sendo o 1º de 366 amostras conservadas apenas sob refrigeração, o 2º de 280 conservadas com azidiol líquido e o 3º de 86 conservadas com azidiol, na apresentação de comprimidos. As amostras originaram-se de 181 tanques de uso individual, 324 de caminhões tanque e 29 de reboque. Elas foram enviadas aos laboratórios sob refrigeração e, no dia seguinte à chegada ao laboratório, as amostras do grupo 1 foram enviadas ao laboratório de microbiologia para serem analisadas pelos métodos de referência e, depois, foram analisadas pelo método de citometria de fluxo. As dos grupos 2 e 3 foram analisadas apenas pelo método de citometria de fluxo, utilizando o equipamento Bactoscan FC[®]. Os dados obtidos nos diferentes grupos foram submetidos às análises de variância e regressão linear. As variáveis avaliadas não apresentaram diferença significativa entre os períodos do ano. O coeficiente de determinação (R^2) entre a contagem bacteriana individual (CBI) e as contagens de mesófilos e psicotróficos foi 0,81 e 0,62, respectivamente. O valor de R^2 obtido na comparação dos resultados da CBI com a contagem de mesófilos nas amostras de leite conservadas com azidiol sólido e líquido foi 0,91 e 0,81, respectivamente. Os resultados obtidos permitiram verificar que os mesófilos são mais adequados para desenvolvimento da curva de linearização dos resultados de CIB para UFC/mL e que o conservante azidiol sólido pode substituir o azidiol líquido na conservação de amostras destinadas à CBT.

Palavras-Chave: Citometria de fluxo, contagem bacteriana total, psicotróficos, mesófilos, azidiol.

ABSTRACT

This study aims to determine the most suitable group of microorganism – mesophylic or psychrophylic - for Bactoscan FC[®] results linearization and evaluate the efficiency of azidiol tablets in the conservation of raw milk samples for analysis of total bacterial count - CBT. From January to November 2007 a total of 732 milk samples were collected and divided in three distinct groups: 1) 366 samples kept only under refrigeration, 2) 280 preserved with liquid azidiol and 3) 86 samples preserved with azidiol tablets. Samples were obtained from 181 individual tanks, 324 from tank trucks and 29 trailers and sent under refrigeration to the laboratory. Once arrived to the laboratory, group 1 samples were processed by microbiological reference methods and further analyzed by flow cytometry with Bactoscan FC[®]. Samples from groups 2 and 3 were processed only by means of flow cytometry. Data obtained from the different groups were compared by analysis of variance and linear regression. Results showed no difference among the different periods of the year. The coefficient of determination (R^2) between the individual bacterial count (CBI) and the number of mesophylic and psychrophylic was 0.81 and 0.62, respectively. The R^2 value obtained when comparing CBI results with mesophylic counts in milk samples preserved with solid and liquid azidiol was 0.91 and 0.81, respectively. Our results confirm that mesophylic are more suitable for developing curve linearization from CIB to CFU/mL and that the preservative azidiol in the form of tablets can replace liquid azidiol in the conservation of samples for CBT.

Key words: Flow cytometry; bacterial total count; psychrophylic; mesophylic; azidiol.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, tornou-se auto suficiente na produção de leite em 2004, ultrapassou os 26 bilhões de litros/ano, assumiu o sexto lugar no ranking mundial em 2006, apresentou um crescimento médio de 4,5% ao ano na última década e, no cenário internacional, passou da posição de grande importador na década de 90 para exportador a partir de 2004 (ANUALPEC, 2006).

Em 2004, pela primeira vez na História, o País terminou o ano com “superávit” no comércio internacional, sentindo a necessidade do aprimoramento do controle de qualidade da matéria prima, para atender um mercado exigente (CARVALHO et al., 2005). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, os Estados que mais produzem leite no País são: Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo (IBGE, 2006).

O setor leiteiro brasileiro vem passando por um intenso processo de modernização com significativas mudanças nos sistemas de armazenamento e transporte (SANTOS & FONSECA, 2001). As indústrias de laticínios, com o objetivo de modernizar o sistema de recepção, atender a legislação vigente e melhorar a qualidade do leite, estão substituindo a coleta de leite em latões pela coleta a granel, realizada por caminhões munidos de tanques isotérmicos. Simultaneamente, estão estimulando a utilização de tanques de refrigeração para armazenamento de leite nas propriedades rurais (NASCIMENTO & SOUZA, 2002).

Acompanhando toda modernização do setor, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, normatizou o processo por meio da publicação em 18 de setembro de 2002 da Instrução Normativa nº 51. Dessa norma que regulamentou o leite cru refrigerado produzido e comercializado no País, constam os novos padrões de identidade e qualidade já focados na nova demanda mundial. Dentre os novos padrões foram incluídas a Contagem Célula Somática - CCS e a Contagem Bacteriana Total - CBT, visando controlar, respectivamente, a sanidade da glândula mamária das vacas lactantes, bem como, as condições de higiene de ordenha dos rebanhos.

Ressalta-se que entre os parâmetros previstos na referida normativa, a CBT – ferramenta importante na avaliação da qualidade do leite – teve o limite máximo estabelecido, em 1.000.000 unidades formadoras de colônia por mililitro - UFC/mL até 31 de junho de 2008, reduzindo para os atuais 750.000 UFC/mL a partir de 01 de julho de 2008 e para 100.000 UFC/mL para tanques de expansão de uso individual e 300.000 UFC/mL para tanques de expansão de uso comunitário a partir de julho de 2011 nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste (BRASIL, 2002). Dessa forma, segundo os padrões legais do MAPA, a partir desta data, o leite brasileiro terá qualidade compatível com as exigências internacionais.

Visando atender a demanda por análises destes novos parâmetros, o MAPA criou a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), composta atualmente por oito laboratórios centralizados, distribuídos estrategicamente por todo País. Esses laboratórios possuem equipamentos automatizados, modernos, que oferecem capacidade analítica de realizar 150 análises por hora para CBT. Possuem também boa estabilidade analítica, simplicidade de operação e um excelente desempenho analítico. Empregam metodologias que permitem o tratamento dos componentes do leite que podem interferir nos resultados analíticos. Esses equipamentos utilizam marcadores celulares, como o brometo de etídio, capazes de corar as unidades bacterianas visando a medição por citometria de fluxo.

Esses equipamentos são desenvolvidos tendo como base os métodos de referências para garantir a qualidade analítica, e reproduzir fielmente os resultados das amostras de leite cru analisadas. A velocidade analítica permite que os resultados cheguem mais rápidos aos produtores, possibilitando, dessa forma, rapidez no processo de tomadas de decisões e facilidade na correção de possíveis variações na qualidade do leite, além de reduzir os prejuízos futuros aos produtores. Hoje muitas empresas remuneram os produtores pela qualidade do leite de acordo com resultados das análises realizadas pelos laboratórios da RBQL.

Embora estes equipamentos modernos apresentem inúmeras vantagens, eles demandam alguns cuidados para a padronização de resultados, sobretudo a CBT por citometria de fluxo. Nessa técnica contam-se bactérias

individuais, diferentemente do método de referência que estima - a partir da enumeração de microrganismos viáveis - apenas um grupo, mesófilos ou psicrotróficos, distribuídos em colônias, que podem ser formadas por inúmeras bactérias, subestimando o valor real de bactérias presentes na amostra avaliada.

Embora ocorra este efeito, o padrão definido na IN 51 para CBT foi estabelecido em UFC/mL. Contudo, para expressar os resultados em UFC/mL, torna-se necessário desenvolver uma curva de linearização, - transformação estatística dos resultados - por meio de uma equação de regressão, a qual permite analisar o leite em contagem bacteriana individual - CBI e expressar o resultado em UFC/mL.

Outro aspecto relevante no processo analítico que utiliza equipamentos automatizados, é a possibilidade de conservação da amostra de leite que deve reproduzir fielmente o momento de coleta. Para tal, todas as variáveis envolvidas devem ser controladas para garantir o sucesso do processo de colheita e transporte das amostras até o laboratório. Dentre estas variáveis destacam-se os conservantes utilizados, que podem possuir diferentes apresentações, formulações e princípios ativos.

Além disso, reveste-se de grande importância verificar se a diversidade da microbiota do leite e dos meios de conservação das amostras podem interferir nos resultados obtidos em análises realizadas por meio de equipamentos eletrônicos.

Considerando os aspectos mencionados, estudos que abordam a curva de calibração dos equipamentos e a conservação das amostras podem contribuir na melhoria dos processos analíticos e aumentar a confiabilidade dos resultados, independentemente do laboratório responsável pela execução das análises. Diante do exposto, objetivou-se com este estudo avaliar a influência do grupo de microrganismos - mesófilos e psicrotróficos - sobre o desenvolvimento da curva de linearização, bem como o efeito dos períodos de chuva e seca sobre essa curva. Além disso, o estudo foi também realizado para avaliar a eficiência do azidiol formulado em comprimido na conservação das amostras de leite cru destinadas à CBT.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microbiologia do Leite

A qualidade microbiológica é um dos aspectos mais importantes a ser considerado na avaliação do leite, devido ao risco de contaminação por microrganismos potencialmente nocivos a saúde humana (MONARDES, 2004).

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

A população microbiana do leite é contada ou estimada e usada como parâmetro para avaliar a saúde do úbere, bem como os cuidados higiênicos relacionados às etapas de obtenção, armazenamento e transporte do leite cru. A higiene durante a ordenha constitui o principal recurso na fonte de produção, relacionado ao período de conservação do leite, devido à impossibilidade de se reverter a sua qualidade de ruim para boa (CERQUEIRA, 2006). HORST et al. (2005) citou que a contaminação da superfície dos tetos do animal varia conforme as condições de alojamento das vacas. Mesmo tetos aparentemente limpos podem carregar contaminações bacterianas. Já os equipamentos, acessórios e utensílios de ordenha, somente se mostram devidamente limpos quando higienizados com produtos bactericidas, pois os resíduos de leite constituem meio favorável à proliferação dos microrganismos (HORST, 2005).

Para CERQUEIRA et al. (1999a) a manutenção da qualidade do leite depende das condições adequadas de armazenamento na propriedade e de seu transporte até a indústria. E, segundo PINTO et al. (2006) a estocagem do leite cru sob refrigeração na fonte de produção reduz substancialmente as perdas econômicas por atividade acidificante de bactérias mesofílicas. Dessa forma a refrigeração do leite imediatamente após a ordenha tem por objetivo a conservação de sua qualidade - obtida durante a ordenha – e a diminuição da taxa de multiplicação dos microrganismos mesófilos, entre eles, os coliformes.

Porém, as baixas temperaturas de estocagem do leite, geralmente entre 4 e 7°C, selecionam outro grupo de microrganismos, os chamados psicotróficos, que independentemente de sua temperatura ótima de crescimento, também são capazes de se desenvolver em temperaturas de refrigeração (SANTANA et al., 2001; PINTO et al., 2006). Mesmo assim, a refrigeração do leite a 4°C, no tempo máximo de 3 horas após a ordenha, foi um dos importantes passos para a melhoria da qualidade do leite (CERQUEIRA, 2006).

Os microrganismos que normalmente contaminam o leite multiplicam-se numa ampla faixa de temperatura, abrangendo microrganismos psicotróficos, mesófilos e termófilos (SILVA, 1991).

SANTOS & FONSECA (2001) ressaltaram que a definição do termo psicotrófico tem sido utilizada como sinônimo de psicrófilo gerando confusão. Para resolver este impasse COUSIN (1982) e SANTANA et al. (2001), sugeriram que psicrófilos seria o grupo de bactérias com temperatura ótima de crescimento inferior a 7,2°C e psicotróficos compreenderam aquelas que se desenvolvem em temperatura ótima entre 20 e 40°C, sendo capazes de crescer em temperatura inferior a 7°C.

As bactérias mesófilas constituem um grupo capaz de multiplicar entre 10°C e 45°C, sendo a temperatura ideal em torno de 30-35°C. Esse grupo é importante porque inclui a maioria dos contaminantes do leite, podendo atingir altas contagens quando o leite é mantido à temperatura ambiente (HORST, 2005).

O grupo das bactérias termófilas, é encontrado normalmente em pequeno número, mas em determinadas situações, pode atingir grandes populações. Normalmente se multiplicam entre 20°C e 37°C, mas são capazes de multiplicar em temperaturas acima de 50°C. Seus principais representantes são os gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, encontrados em silagens, no solo e esterco (HORST, 2005).

SOUZA et al. (1999) ao analisarem amostras de leite cru estocado em propriedades rurais por 48 horas e transportados em carros isotérmicos a uma temperatura média de 4,3°C obtiveram um percentual de isolamento de bactérias psicotróficas de 47,3% em relação à contagem de mesófilos. Nas situações onde a ordenha não é higiênica, os microrganismos psicotróficos podem dominar a

microbiota do leite, chegando a representar 75% dos microrganismos (CERQUEIRA, 2006).

Segundo JAY, (1996), ENEROTH et al., (2000a), ENEROTH et al., (2000b), MURPHY et al (2000), a contaminação dos produtos lácteos por bactérias psicotróficas pode originar-se do suprimento de água de qualidade inferior, inadequação dos procedimentos de higiene e mastite.

As principais espécies do grupo de psicotróficos são bastonetes Gram-negativos, dos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium*. Também há os Gram-positivos, como *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Listeria* (PRABHA et al., 1996; GARCÍA-ARMESTO & SUTHERLAND, 1997; RYSER, 1999).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* têm sido isoladas com maior frequência do leite e de produtos lácteos refrigerados (COUSIN, 1982; WIEDMANN et al., 2000; ENEROTH et al., 2000a; ENEROTH et al., 2000b), embora não representem mais do que 10% da microbiota do leite cru recém-ordenhado (SORHAUG et al.,1997). Estes microrganismos por proliferarem em baixas temperaturas, podem aumentar a população bacteriana no leite durante a estocagem por 48 horas e causar sérios problemas para as indústrias de laticínios.

A refrigeração do leite cru, por períodos prolongados, na fonte de produção ou na indústria, pode comprometer a sua qualidade, considerando a possibilidade de seleção de bactérias psicotróficas proteolíticas (PINTO et al, 2006). Este grupo de bactérias apresenta capacidade de produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes, que irão degradar, respectivamente, a proteína e a gordura do leite, causando uma série de problemas para as indústrias de leite tipo longa vida, queijos e outros derivados (SANTOS & FONSECA, 2001).

Os microrganismos mesófilos também constituem um importante grupo por compreender a maioria das bactérias acidificantes, que provocam o acúmulo de ácido láctico, a partir da fermentação da lactose (JAY, 1994). Esses microrganismos eram os grandes responsáveis pela acidificação do leite quando o mesmo era transportado em latões, à temperatura ambiente, até as indústrias

de laticínios. A refrigeração do leite mantém estáveis estes microrganismos, mas não os reduz. Assim, se o leite recém ordenhado apresentar uma contagem elevada de microrganismos mesófilos, depois de 48 horas de armazenamento, apresentará uma elevada contagem microbiana, daí a importância da higiene de ordenha, para se obter um leite de qualidade (CERQUEIRA, 2006).

Segundo DIAS FILHO (1997), apesar dos altos índices de produção do Brasil, a maioria das propriedades rurais do País apresenta condições precárias de manejo e, de maneira geral, a mão-de-obra encontra-se despreparada. PINTO (2006) ressalta a necessidade de investimentos contínuos em boas práticas visando a prevenção da contaminação e a multiplicação microbiana na cadeia produtiva do leite para reduzir problemas tecnológicos e econômicos na indústrias de laticínios.

Para que o leite seja obtido com qualidade, o produtor deve ficar atento a um conjunto de práticas que inclui: melhoramento genético, água de boa qualidade, controle sanitário, nutrição adequada e higiene de ordenha. Entre os aspectos que requerem mais cuidados dos produtores para melhoria da qualidade do leite, destacam-se o controle sanitário do rebanho e a higiene nas práticas rotineiras da produção, diretamente relacionadas à CBT (CASSOLI, 2005).

2.2. Situação da Qualidade do leite no Brasil, pelo parâmetro de CBT

A contagem bacteriana total tem sido utilizada como importante indicador mundial de qualidade do leite. Em geral, reflete as condições de limpeza, sanitização, transporte, armazenamento e controle de temperatura durante o processo de obtenção desse produto considerado nobre.

Dentre os parâmetros de qualidade do leite estabelecidos pela IN-51 (BRASIL, 2002), a CBT é o que apresenta o percentual mais elevado de amostras que não atendem às exigências legais. MENDONÇA et al, (2001) em pesquisa realizada no Estado de Minas Gerais, verificaram que 12% das amostras analisadas por meio da técnica de contagem padrão em placa para microrganismo mesófilos foi superior a 1.000.000 UFC/mL. PICININ (2003),

empregando o mesmo método, encontrou 25,81% das amostras de leite cru estocado em tanques de expansão, das 31 amostras analisadas, em desacordo com o padrão de 1.000.000 UFC/mL definido na IN 51.

Em Goiás, BUENO (2004), analisou pelo método eletrônico, 18.949 amostras de leite cru no período de outubro de 2002 a setembro de 2003 e verificou que 19,4% delas apresentavam resultados acima de 1.000.000 UFC/mL.

NERO et al. (2004), avaliaram o leite de quatro regiões brasileiras (Viçosa - MG, Pelotas - RS, Londrina - PR e Botucatu - SP), pelo método da contagem padrão em placas – mesófilos – e verificaram que 48,57% das amostras estavam em desacordo com a IN 51, considerando o limite de 10^6 UFC/mL.

FONSECA et al. (2004) analisaram 11.400 amostras de leite proveniente de tanques de refrigeração por expansão direta, coletadas e enviadas por cinco indústrias laticinistas do Estado de Minas Gerais ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite - Lab-UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, pertencente à RBQL, durante o período de dezembro de 2003 a abril de 2004. Aproximadamente 24,60% destas amostras apresentaram contagem superior a 10^6 UFC/mL. Em outro estudo realizado por FONSECA, (2005), no período de dezembro de 2003 a janeiro de 2005, envolvendo 50.434 amostras, agrupadas na base de dados do Lab-UFMG, o autor encontrou 18,4% das amostras acima de 10^6 UFC/mL.

CERQUEIRA (2006), afirmou que 18,4% do leite analisado no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Universidade Federal de Minas Gerais encontrava acima do padrão estabelecido pela de IN-51. Segundo MESQUITA (2006), 25 % das amostras dos produtores rurais - de um total de 117.010 - analisadas no Laboratório de Qualidade do Leite do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, no período de fevereiro a setembro de 2006, também não atendiam ao padrão da IN-51.

SOUZA et al. (2006), avaliando 80.217 amostras dos produtores dos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo, entre julho de 2005 e junho de 2006, verificaram que 48,7% das amostras apresentaram-se acima do limite estabelecido na IN 51. MACHADO et al. (2006) relataram que 14% das

amostras, analisadas no período de julho de 2005 a agosto de 2006, na Região Sudeste, estavam não conformes, considerando o limite máximo permitido de 1.000.000 UFC/mL. No Rio Grande do Sul, DURR et al., (2006), encontraram uma variação de 31,9% (julho de 2005) e 64,4 % (janeiro de 2006), acima de 1 milhão de UFC/mL, do total de amostras analisadas no Laboratório de qualidade do leite da Universidade de Passo Fundo – UPF, portanto não atendendo o limite máximo da IN 51.

LEITE, (2006) considera que monitorar a qualidade microbiológica do leite cru tem se tornado cada vez mais importante para a indústria laticinista brasileira e, um monitoramento efetivo, significa obter resultados rápidos, seguros, de baixo custo e da forma mais prática possível.

Diante do exposto, torna-se imperativo rever as práticas adotadas nas propriedades leiteiras, pois a CBT constitui um parâmetro que apresenta maior facilidade e rapidez em sua correção. O desafio, portanto, é manter baixas as contagens bacterianas no leite.

2.3. Métodos de Análises bacteriológicas em Leite

2.3.1. Contagem Bacteriana Total pelo método de Citometria de fluxo

O princípio da técnica de citometria de fluxo baseia-se na medição de células que se encontram em suspensão em meio fluido (BARRIENTOS et al., 2000). Durante a Segunda Guerra Mundial surgiram os primeiros equipamentos que utilizavam este princípio com o objetivo de identificar a presença de bactérias e esporos no ar.

Após este período, a citometria de fluxo também foi usada na oncologia para diagnóstico de câncer e defeitos cromossômicos e também na hematologia. Aplicações clínicas da citometria de fluxo ainda constituem a maior parte das publicações científicas que utilizam esta técnica. Mas, nos últimos anos, tem sido uma valiosa ferramenta na biologia, farmacologia, toxicologia, bacteriologia e virologia (LEITE, 2006).

Nas últimas décadas o interesse crescente por métodos rápidos e automatizados possibilitou o desenvolvimento de equipamentos capazes de

identificar microrganismos em meio fluido, visando a aplicação no diagnóstico da qualidade bacteriológica do leite cru. Tendo como base a citometria de fluxo, o Bactoscan FC[®] (Foss Electric[®], Hillerod, Dinamarca) e Bactocount[®] (Bentley Instruments Incorporated[®], Chaska, Estados Unidos da América) são exemplo deste equipamentos. A fabricação destes modernos equipamentos com versáteis sistemas computadorizados de geração e interpretação de dados, garantiu o sucesso desta técnica, disponível comercialmente (RIESEBERG et al., 2001).

Segundo GUNASEKERA et al. (2000), SUHREN & WALTE (2000), estes equipamentos se limitam a estimar a quantidade de bactérias presentes nas amostras de leite, não fornecendo outras informações, como a diferenciação microbiana. No entanto, a citometria de fluxo combinada com diferentes corantes fluorescentes e substratos fluorogênicos possibilita a quantificação e a diferenciação de microrganismos viáveis, injuriados e inviáveis (GUNASEKERA et al., 2000; GUNASEKERA et al., 2003).

A determinação da CBT no Laboratório de Qualidade do Leite da UFG é efetuada por meio do equipamento Bactoscan FC[®] (*Foss electric*), o qual emprega a técnica de citometria de fluxo, conforme esquema apresentado na Figura 01. Esta técnica consiste na adição de brometo de etídio ao leite para que o DNA e RNA das bactérias sejam corados. No equipamento, uma alíquota da amostra de aproximadamente 4,5 mL de leite é aspirada e misturada a uma solução contendo agentes tamponados e enzimas proteolíticas para lisar as células somáticas, solubilizar os glóbulos de gordura e as proteínas e tornar a parede bacteriana permeável ao corante. O corante é um marcador fluorescente, à base de brometo de etídio, que se liga rápida e seletivamente na cadeia dupla do ácido nucléico bacteriano. Posteriormente, são depositados dentro de poço de uma unidade incubadora em forma de carrossel circular, e aquecidos a 50°C por 8 minutos (Foss...2001a).

O leite com o corante é então injetado em um capilar acoplado a um sistema óptico, que recebe, constantemente, um feixe de "laser". Ao passar por este feixe, cada bactéria emite fluorescência (pulso), a qual é captada pelo sistema óptico (foto-multiplicador). Os pulsos são então transformados em contagem individual de bactérias e, finalmente, após transformação estatística automática, baseada em uma curva de linearização previamente elaborada, são

expressos os resultados em UFC/mL (SUHREN et al., 1999; BARRIENTOS et al., 2000; GUNASEKERA et al., 2000; FOSS..., 2001b; BROUTIN, 2004).

Diante do exposto, pode-se observar que esse método permite quantificar todas as bactérias presentes no leite amostrado, mas não diferencia os grupos psicrófilos, mesófilos e termófilos.

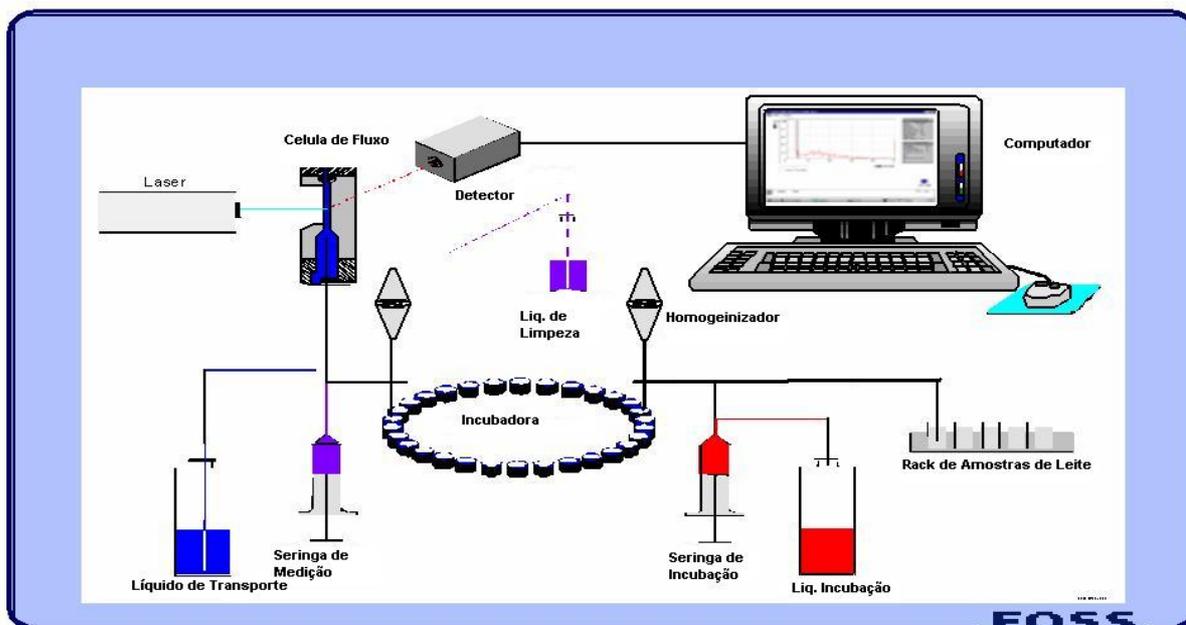


Figura 1 Esquema do funcionamento do Bactoscan FC[®] (adaptado de Foss Electric, Hillerød, Dinamarca).

2.3.2. Contagem Bacteriana Total pelo método de referência

CERQUEIRA & LEITE (1995), CERQUEIRA (1999b), PICININ (2003), afirmaram que a segurança alimentar, a vida de prateleira e a qualidade dos produtos lácteos são afetados pela contaminação microbiana do leite cru. Esta contaminação pode ser avaliada por vários métodos disponíveis, sendo alguns qualitativos como: redutase, lactofermentação e acidez. Embora sejam todos rápidos são muito subjetivos e indiretos (FONSECA & SANTOS, 2000). Outros métodos são quantitativos como a contagem padrão em placas (CPP, kits Petrifilm[®] e Simplate[®]) e contagem bacteriana total (por instrumentos automatizados) que são diretos e mais precisos (CASSOLI, 2005). O método de contagem de unidades formadoras de colônias em placas é indicado para a contagem de microrganismos no leite e subprodutos, sendo definido como método oficial ou método de referência (INTERNATIONAL..., 1991).

O método de referência tem como base numerosos estudos experimentais publicados em trabalhos científicos, desenvolvidos em condições específicas de preparação de diluições, composição dos meios, condições de incubação e métodos de cálculos padronizados. Embora seja fácil de executar, pois, não requer equipamentos sofisticados e nem técnicos de alta qualificação, devem ser realizados por técnicos bem capacitados em todos os procedimentos que norteiam esta técnica (SUHREN & REICHMUTH, 2000).

No método de referência para contagem padrão em placas, uma alíquota de leite é vertida em placa, em seguida o meio de cultura (ágar), procede-se a homogeneização e a incubação a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 3 horas para as bactérias mesófilas e a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 dias para psicotróficos (BRASIL, 2003). Este método determina a quantidade de bactérias aeróbias mesófilas ou psicotróficas após crescimento em ágar padrão. As bactérias viáveis, que crescem nas condições de cultivo, desenvolvem unidades formadoras de colônias que são enumeradas, após o período de incubação, sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônias – UFC por mililitro de leite (LEITE, 2006).

Para GUNASEKERA et al. (2000) a maior desvantagem da técnica de cultura microbiana reside no tempo necessário para a obtenção de resultados, em média, 72 horas. Outros autores apontam com desvantagens: a) falha na detecção de microrganismos viáveis, que não se desenvolvem nos meios de cultura utilizados (DANSEN et al., 1991; GRIFFITHS, 1993; WHITE, 1993; SUHREN & WALTE, 2000), b) detecta somente microrganismos que podem multiplicar até o número requerido para visualização sob as condições particulares do método (nutrientes, oxigênio, tempo de incubação/temperatura), c) unidades formadoras de colônias podem se formar a partir de bactérias individuais ou agregados como cadeias de estreptococos, d) há necessidade de grande disponibilidade de mão de obra e, e) menor precisão dos resultados obtidos em comparação com o método instrumental (automatizado) (SUHREN & REICHMUTH, 2000).

Portanto, o método de referência subestima a quantidade total de bactérias no leite, uma vez que nem sempre uma unidade formadora de colônia origina-se de apenas uma única bactéria. Esse é um dos motivos de maior sensibilidade e especificidade do método instrumental (automatizado) frente à

contagem por placa (GUNASEKERA et al., 2003; BROUTIN, 2004). Além desse aspecto, o método de referência permite a contagem apenas de um grupo bacteriano como os mesófilos, já o método instrumental possibilita a quantificação de todos os grupos microbianos (mesófilo, psicrotróficos, termófilos e termodúricos).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para reduzir esses interferentes, tais como: a ATP bioluminescência, os testes de redução de corantes e a citometria de fluxo (DANSEN et. al., 1991; GRIFFITHS, 1993; WHITE, 1993; SUHREN & WALTE, 2000).

2.4. Metodologias de Citometria de Fluxo *versus* de Referência para CBT.

Apesar de suas limitações, o método de contagem padrão em placas é considerado como método oficial ou de referência. Serve portanto, como um ponto de partida quando se define a qualidade microbiológica no marco da legislação e muitos acordos comerciais, bem como, quando são definidos critérios de comparação dos métodos naqueles casos onde o método de referência é substituído por um método instrumental (automatizado). As análises das amostras por ambos os métodos constituem pré-requisito para: a) avaliação do método instrumental (automatizado), b) transformação apropriada dos valores obtidos em escala de valores do método de referência e c) avaliar se os limites fixados pelo método de referência foram alcançados (SUHREN & REICHMUTH, 2000).

Os padrões de análises microbiológicas para leite adotados no Brasil ainda são baseados em metodologias de análises convencionais, as quais estimam a contagem microbiana do leite a partir da enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos e não a contagem bacteriana total. Para adaptar o resultado obtido pelos equipamentos eletrônicos àqueles especificados pela legislação vigente no Brasil, convencionou-se fazer uma transformação estatística dos resultados, realizada no equipamento, convertendo os resultados de contagem bacteriana total (CBT) em unidades formadoras de colônias (UFC) por meio de uma equação de regressão (LEITE, 2006).

A transformação dos resultados obtidos por equipamentos de contagem eletrônica, baseados em citometria de fluxo é utilizada, também, em outros países. Segundo CASSOLI (2005), os países da Europa adotam diferentes estratégias para adequação desta nova metodologia. Por exemplo, a Alemanha, desenvolveu uma única equação de calibração para todos os laboratórios, baseada na contagem de microrganismos mesófilos. Já a Bélgica, França e Holanda, usaram o mesmo grupo bacteriano, no entanto, cada laboratório desenvolveu a equação para seus equipamentos (BROUTIN, 2004). No Brasil, a exemplo destes países, também utilizou-se o grupo dos mesófilos e cada laboratório desenvolveu sua própria curva.

Para SUHREN et al., (1999), NINANE et al., (2000), GUNASEKERA et al., (2000) e BROUTIN, (2004) embora exista uma boa correlação entre os métodos instrumentais (automatizados) e métodos de referência, todos são unânimes em afirmar a necessidade de se utilizar um grande número de amostras de leite da região a ser monitorada, devido a vários fatores que podem interferir nesta correlação. Os principais fatores citados por SUHREN & REICHMUTH (2000) são: características de agregação das células bacteriana, tamanho, forma e o tipo de microbiota predominante no leite, Gram-positiva ou negativa.

Segundo CASSOLI (2005), a relação entre os métodos de referência e instrumental é alta, $R^2 = 0,8125$. Para estação seca de $R^2 = 0,824$ e para chuvas uma $R^2 = 0,727$, indicando que embora as duas estações possuam diferenças marcantes de clima, não há interferência na curva de regressão linear, sendo possível utilizar apenas uma curva para o ano todo. Mas SUHREN et al. (2000) considerou necessário avaliações periódicas entres os métodos, como forma de monitoramento da equação, possibilitando possíveis correções nas curvas quando se fizer necessário. Já BROUTIN (2004), encontrou uma relação superior a CASSOLI (2005) $R^2 = 0,90$ a $0,98$.

Pesquisadores avaliando a acurácia dos equipamentos eletrônicos, expressa pelo erro padrão ($s(y,x)$), encontraram os seguintes valores: $0,287 \log$ UFC/mL, na Bélgica (NINAME et al., 2000), $0,25 \log$ UFC/mL na Alemanha (SUHREN et al., 2000), $0,16 \log$ UFC/mL na Europa (TROSSAT et al., 2002), e $0,309 \log$ UFC/mL no Brasil (CASSOLI, 2005). O fabricante dos equipamentos Bactocount® e Bactoscan® sugere um erro padrão inferior a $0,25 \log$ UFC/mL.

LEITE (2006) afirma que a metodologia de transformação dos resultados de contagem bacteriana individual – CBI para UFC/mL tem sido questionada por alguns pesquisadores da RBQL, devido à falta de precisão nos resultados finais, em virtude da variabilidade da microbiota presente no leite cru. Portanto, o autor considera que a metodologia de expressar resultado atualmente utilizada no Brasil, transforma um dado preciso e mais abrangente – toda a população microbiana do leite – em um dado estimado sujeito a erro. Além disto, a interferência de fatores como o tratamento térmico do leite e a presença de substâncias antimicrobianas, na contagem bacteriana total ainda não é bem conhecida.

SUHREN & WALTE (2000), relataram que devido a alguns fatores tais como a qualidade higiênica da ordenha, a estação do ano, as condições de estocagem, e as espécies microbianas contaminantes, torna-se inadequada a transformação dos resultados obtidos por citometria de fluxo pela equação de regressão armazenada no equipamento. Assim, os autores reportaram que muitos pesquisadores têm proposto a utilização de dados de contagem bacteriana total não transformados.

Países como o Canadá, Reino Unido e Noruega, estabeleceram em seus padrões a contagem individual de bactérias, realizada pelo método instrumental (automatizado) eliminando a necessidade do desenvolvimento de curva para expressão de resultados e conferindo maior precisão nas informações geradas em decorrência das amostragens em propriedades leiteiras (LESLIE, 2001; BROUTIN, 2004).

No Brasil esta transformação torna-se necessária em função dos limites legais para CBT, previstos na IN 51, terem sido estabelecidos em UFC. Isto implica na necessidade de se desenvolver uma equação de correlação entre o método de referência – contagem padrão em placas de mesófilos – e o instrumental – citometria de fluxo – de modo que os resultados expressos em contagem individual de bactérias sejam transformados em UFC (CASSOLI, 2005).

Segundo recomendações do fabricante do equipamento Bactoscan FC[®], para se efetuar esta transformação, deve ser feita uma linearização dos resultados (calibração) com o mínimo de 200 amostras que devem ser representativas da região na qual está inserido o laboratório (FOSS..., 2001a).

Esta calibração é feita por meio da contagem de bactérias individuais em equipamento eletrônico e, paralelamente, o plaqueamento das mesmas amostras de leite empregando-se a metodologia de referência. Após o período de incubação das amostras plaqueadas, aproximadamente 48 horas para mesófilos, são contadas as UFC e expresso os resultados em mL.

Os dados de contagem individual de bactéria no equipamento e os de contagem de microrganismos mesófilos em placas são inseridos em uma planilha para avaliação estatística. Após as inserções realiza-se uma avaliação dos dados excluindo os pontos extremos (*outliers*) e procede-se a análise estatística para estimativa da curva de regressão linear. Então, são retirados vinte dados que representam toda a curva de regressão para inseri-los no computador do equipamento. Um software de transformação processa todos os resultados lidos na contagem individual de bactérias e transforma os resultados da leitura das bactérias individuais por microlitro, em unidade formadora de colônia por microlitro (FOSS..., 2001a; SUHREN & WALTE, 2000).

2.5. Conservação da amostras para contagem bacteriana total

Embora os laboratórios da RBQL estejam distribuídos estrategicamente no Brasil, o país possui dimensão continental. Assim, para emitir resultados analíticos do leite produzido pelo produtor e captado pelas empresas de laticínios, com segurança e confiabilidade as amostras necessitam de conservação. Em alguns países apenas a refrigeração é responsável pela preservação das amostras. Nestes casos, a distância entre as fazendas e os laboratórios são curtas, possibilitando a análise em, no máximo, 48 horas após a coleta (CASSOLI, 2005).

No Brasil a manutenção da qualidade da amostras de leite durante o transporte entre a propriedade e os laboratórios da RBQL e o conseqüente aumento da vida útil das mesmas, têm sido obtidos por meio do emprego da refrigeração, em torno de 4°C e de conservantes que garantem condições ideais de análises (CASSOLI, 2005).

Segundo CASSOLI (2005) e MARTINS (2006) as amostras de leite destinadas a CBT devem ser conservadas com Azidiol sob temperatura de até 7°C.

Já o tempo de conservação sofre variações como pode ser observado nas citações dos diversos autores. GONZALO et al. (2003) recomendou que amostras conservadas com azidiol sejam analisadas até o quarto dia após a coleta, se mantidas sob refrigeração a 4°C. CASSOLI (2005) considerou que até sete dias as amostras possuem condições analíticas. MARTINS (2005) constatou que podem ser conservadas por até 10 dias, sob temperatura de 4°C.

O conservante de amostras de leite cru refrigerado empregado na preservação das amostras enviadas a RBQL, para contagem bacteriana total em equipamento eletrônico, é o azidiol (CASSOLI, 2005; LEITE, 2006).

O azidiol possui em sua formulação o azul de bromofenol, cloranfenicol, etanol, citrato de sódio e azida sódica. A azida sódica é conhecida como um inibidor do processo da respiração aeróbia, por interferir na cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria. É um conservante tóxico que oferece perigo à contaminação de pessoas e do próprio leite no tanque de expansão, devendo ser manipulada com bastante cuidado e por pessoas capacitadas. No mercado brasileiro existem duas apresentações de azidiol, uma na forma líquida e outra de comprimidos (LEITE, 2006).

A forma líquida foi avaliada por BARCINA (1987), CASSOLI (2005) e MARTINS (2005), todos constataram a eficiência do conservante na forma líquida para as amostras destinadas a análise de CBT.

Todavia a eficiência pode ser influenciada pela forma de adição do azidiol na forma líquida, feita em geral, no momento da coleta das amostras na propriedade rural. Recomenda-se a adição de três a cinco gotas do conservante por amostra para garantir a concentração de 4,79 mg de azida sódica e 0,2 mg de cloranfenicol (LEITE, 2006). No entanto, esse procedimento é laborioso e exige muita atenção do transportador de leite no tocante ao número de gotas adicionadas à amostra, dificultando todo o processo.

Além disso, a quantidade de conservante líquido adicionada à amostra interfere no seu efeito bacteriostático, compromete a ação de conservação, leva a alteração das amostras e afeta a análise laboratorial (LEITE, 2006).

A adição do azidiol comprimido (pastilha) ocorre no momento do processo de fabricação do frasco, em geral uma unidade, que garante a concentração de 4,79 mg de azida sódica e 0,2 mg de cloranfenicol. Esse procedimento não sofre o efeito observado na utilização do azidiol líquido, uma vez que sua formulação é específica para a quantidade de leite amostrada no frasco (40 mL) (LEITE, 2006) e proporciona a conservação adequada da amostra.

MARTINS (2005) e LEITE (2006) compararam em condições laboratoriais o uso do conservante azidiol na forma líquida e de comprimido na conservação de leite cru destinado a análise de CBT por citometria de fluxo e concluíram que há viabilidade de substituição do azidiol líquido pelo comprimido.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar o grupo de microrganismos – mesófilos ou psicrotróficos – mais adequado na linearização de resultados do Equipamento Bactoscan FC[®], bem como avaliar a eficiência do azidiol, na apresentação de comprimido, na conservação de amostras de leite cru destinadas à análise de CBT.

3.2 Específicos

- Verificar a adequação das contagens padrão em placas de microrganismos mesófilos e de psicrotróficos em leite cru refrigerado, para calibração do equipamento Bactoscan FC[®];
- Avaliar a influência dos períodos de chuvas e seca na expressão de resultados em UFC/mL do equipamento Bactoscan FC[®].
- Verificar se a eficiência do azidiol comprimido é equivalente à do azidiol líquido na conservação de amostras de leite cru destinadas a realização de CBT, em nível de campo e analisadas pelo equipamento Bactoscan FC[®].

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e conservação das amostras de leite

Foram coletadas 732 amostras de leite cru que compuseram três grupos distintos, sendo o 1º de 366 entidades individuais, conservadas apenas sob refrigeração, o 2º de 280 conservadas com azidiol líquido e o 3º de 86 conservadas com azidiol, na apresentação de comprimido. Em todos os grupos foram utilizados frascos esterilizados para coleta. As amostras originaram-se de 181 tanques de uso individual, 324 de caminhões tanque e 29 de reboque e foram colhidas em 26 rotas de propriedades leiteiras localizadas no entorno de Goiânia, Estado de Goiás, sede da empresa parceira nesse projeto e do Laboratório de Qualidade do Leite - LQL do Centro de Pesquisa em Alimento - CPA da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, Goiás.

As coletas foram realizadas no período compreendido entre os meses de janeiro, fevereiro, março e abril, além de novembro de 2007 e, de maio a outubro de 2007 que compreendem as estações chuvosa e seca, respectivamente. Foram selecionadas 26 rotas de captação em função do tempo de percurso entre as propriedades e a empresa de laticínios. Esse tempo foi dividido em menor ou igual a 8 horas, entre 8 horas e menor que 16 horas e maior que 16 horas.

As coletas foram realizadas nos tanques de refrigeração por expansão direta antes de realizar o transvase do leite para o caminhão, e dos caminhões ou dos reboques após o transvase do leite da primeira propriedade, e assim, sucessivamente, em todas propriedades visitadas ao longo da rota percorrida.

Uma estagiária do curso de medicina veterinária e um supervisor de campo da empresa parceira, foram capacitados para os procedimentos corretos de coleta das amostras, segundo o manual de procedimento elaborado pela RBQL/MAPA (MESQUITA et al., 2003).

Inicialmente, o leite do tanque foi homogeneizado durante o tempo mínimo de cinco minutos, por meio da pá de agitação do próprio tanque. Em seguida, procedia-se a homogeneização vertical, com auxílio de uma concha

coletora de cabo longo, realizando 10 (dez) movimentos verticais. Os leites dos caminhões tanques e dos reboques foram homogeneizados com auxílio de um agitador em aço inoxidável de cabo longo, sendo realizados movimentos constantes em todas as direções no interior do compartimento, de modo a promover completa agitação. Posteriormente, coletou-se a amostra por compartimento.

Após a coleta os frascos foram identificados com etiquetas de código de barras e encaminhados à empresa captadora, sob refrigeração, à temperatura de 2 a 7°C. Na empresa foram mantidos a 4°C, até a recepção de todas as amostras das rotas estabelecidas para a coleta do dia. Uma vez recebidas e reunidas na empresa, as amostras foram então enviadas ao Laboratório de Qualidade do Leite - LQL do Centro de Pesquisa em Alimento – CPA da Universidade Federal de Goiás – UFG, ao final do dia de coleta ou no dia seguinte, mas nunca ultrapassando o período de 12 horas decorrido entre a coleta e a chegada ao LQL. Durante todo o processo logístico, as amostras permaneceram sob refrigeração à temperatura de no máximo 7°C.

As amostras do grupo 1 foram destinadas às análises pelo método de referência – contagem de mesófilos e psicotróficos – e por citometria de fluxo e as dos grupos 2 e 3, somente pelo método eletrônico para contagem bacteriana total - CBT.

4.2 Análise laboratorial

4.2.1 Preparo de amostras

No dia seguinte à chegada das amostras, ao laboratório, as análises foram realizadas em duplicata e concomitantemente. Inicialmente os frascos foram organizados nas grades aramadas em ordem crescente de numeração o tempo decorrido entre a chegada da amostra ao LQL/CPA e o inícios das análises foi de no máximo 12h. As amostras sem o conservante foram encaminhadas primeiramente ao laboratório de microbiologia do CPA, para retirada das alíquotas destinadas às análises pelo método de referência, ou seja, contagem de

mesófilos e psicrotróficos. Em seguida, o frasco foi encaminhado ao LQL para a contagem bacteriana pelo método de citometria de fluxo. A outra amostra com conservante azidiol na forma líquida e de comprimido foi encaminhada diretamente ao LQL para análise de CBT pelo método de citometria de fluxo.

A CBT foi realizada utilizando-se um Bactoscan FC[®], com capacidade de análise de 150 amostras/hora, e cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo. (Foss...2001a).

4.2.2 Análise de CBT por citometria de fluxo.

Inicialmente procedeu-se a homogeneização manual das amostras que encontravam-se organizadas nas racks de análise, por meio de 10 (dez) movimentos suaves de inversão. Em seguida, as racks foram colocadas na esteira do equipamento, que as conduziu em direção da pipeta de homogeneização, responsável pela segunda homogeneização do leite. Logo após, uma alíquota de aproximadamente 4,5 mL foi pipetada automaticamente para o interior do equipamento, percorrendo o circuito capilar de mangueiras até a deposição de parte do volume, juntamente com o líquido de incubação – composto por enzimas proteolíticas, detergentes e o marcador de DNA/RNA, brometo de etídio – na cavidade do carrossel circular, onde permaneceu incubando por aproximadamente 8 minutos.

Durante a incubação ocorreu lise das células somáticas, a solubilização dos glóbulos de gordura e proteínas e a permeabilização da parede bacteriana para penetração do brometo de etídio que corou o DNA bacteriano. Todo este processo ocorreu sob uma temperatura de 50°C no carrossel. Além disso, a solução de brometo e o leite foram submetidos a mais duas homogeneizações durante a fase de incubação, com o objetivo de promover a quebra de partículas interferentes, separar as colônias bacterianas remanescentes visando melhorar a detecção de bactérias individuais e reduzir a fluorescência de fundo.

Após a incubação, uma alíquota da mistura foi transferida para o citômetro de fluxo onde as bactérias foram alinhadas dentro de um tubo capilar e expostas a radiação “laser” visando a emissão de fluorescência a partir do DNA

das células bacterianas corado pelo brometo de etídio. Os sinais fluorescentes foram coletados pelos receptores ópticos, filtrados e captados por um fotomultiplicador. A intensidade e a amplitude dos pulsos de fluorescência foram registradas e usadas como parâmetros para os resultados. Os pulsos captados foram então traduzidos em CBI e, finalmente, em UFC/mL após transformação estatística automática baseada em uma curva de calibração previamente elaborada. Após análise de cada amostra, o equipamento foi submetido a limpeza automática, por retro-lavagem, com solução tampão (Rinse) (Foss..., 2001a; BROUTIN, 2004; FONSECA, 2005; LEITE, 2005).

4.2.3 Contagem Padrão em Placas de microrganismos mesófilos e psicotróficos.

A contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios e/ou facultativos mesófilos e psicotróficos viáveis foi realizada pelo método de plaqueamento em “pour plate” em ágar padrão para contagem (PCA) adicionado de cloreto de trifeniltetrazolio (TTC) (SWANSON et al., 2001) para facilitar a visualização das unidades formadoras de colônias. Para tanto, foram preparadas diluições decimais seriadas sucessivas empregando-se como diluente a água peptonada tamponada a 0,1%. A partir de três diluições selecionadas, retirou-se 1 mL que foi vertido em placas de Petri, em duplicata. Em seguida, verteu-se sobre o inóculo, o meio de cultura e procedeu-se a homogeneização em movimentos circulares na forma do numeral oito. Após a homogeneização as placas foram deixadas em superfície plana até a solidificação do ágar. A incubação das placas para a contagem de mesófilos foi realizada a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas e a de psicotróficos a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 dias (HOUGHTBY et al., 1992). Após a incubação, foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colônias expressando os resultados em UFC/mL de leite (BRASIL, 2003).

4.3 Calibração do equipamento

Diariamente, antes de iniciar as análises de rotina do laboratório foram preparados padrões para calibrar o equipamento Bactoscan FC[®], por meio, da análise de uma amostra de controle bacteriano – BCS fornecido pela empresa fabricante Foss Electric[®].

4.4 Análise estatística

Para avaliar os efeitos das estações de chuvas e seca, sobre a CBI utilizou-se Análise de Variância ao nível de 5% de significância. Tal análise também foi utilizada para verificar o efeito do azidiol comprimido e líquido sobre contagem bacteriana individual – CBI. A Análise de Regressão foi utilizada para estabelecer o grau de relação e as respectivas equações de predição entre contagem de mesófilos e CBI; contagem de psicotróficos e CBI; contagem de mesófilos e CBI com azidiol comprimido; contagem de mesófilos e CBI com azidiol líquido e contagem de mesófilos e CBI, nas estações chuvosas e seca.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão distribuídos os dados relativos aos valores de CBI, CBT, Contagem de mesófilos e psicrotróficos das amostras de leite cru (n=366) conservadas com azidiol (CBI e CBT) e sob refrigeração (mesófilos e psicrotróficos), no período de janeiro a novembro de 2007. Nota-se que as médias de CBI e CBT podem ser consideradas relativamente baixas revelando a boa qualidade bacteriológica da matéria prima. O mesmo pode ser dito em relação às médias das contagens de mesófilos e psicrotróficos. No entanto, quando se analisa os valores máximos para os quatro parâmetros constata-se que ainda há muito o se fazer em termos de qualidade do leite, considerando a heterogeneidade da matéria prima. Esses resultados encontram respaldados nos trabalhos de BUENO (2004), CASSOLI (2005), LEITE (2006).

Nota-se ainda na Tabela 1 que, o grupo de microrganismos mesófilos, mesmo sendo o leite refrigerado, predomina sobre os psicrotróficos.

Tabela 1 Análises descritivas das amostras de leite cru colhidas e conservadas com azidiol (CBI e CBT) e sob refrigeração (mesófilos e psicrotróficos), de janeiro a novembro de 2007, no entorno de Goiânia-GO (n = 366).

Parâmetros	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média log	Desvio Padrão em log	Mínimo em log	Máximo em log
CBI (Bac. /mL)*	285.049	653.303	12.000	7.618.000	5,1166	0,4740	4,0792	6,8818
CBT (UFC/mL)**	139.814	364.150	4.000	4.693.000	4,7850	0,4992	3,6021	6,6715
Mesófilo (UFC/mL)	99.502	230.581	1.400	3.000.000	4,6172	0,5431	3,1461	6,4771
Psicrotrófico (UFC/mL)	35.623	175.440	10	1.900.000	2,7537	1,4044	1,0000	6,2788

*CBI contagem bacteriana individual; **CBT contagem bacteriana total.

Com o intuito de avaliar a influência do período das chuvas e seca sobre parâmetros CBI, CBT, contagem de mesófilos e de psicrotróficos foram analisadas 366 amostras de leite cru conservadas com azidiol (CBI e CBT) e sob refrigeração (mesófilos e psicrotróficos), cujos resultados encontram-se na Tabela 2. Ao analisar os dados contidos na Tabela 2 pode-se afirmar que independentemente do período do ano, chuvas ou seca, não há diferença significativa ($p > 0,05$), entre os resultados de CBI, CBT, contagem de mesófilos e de psicrotróficos. Esta constatação permite interferir que o período das chuvas não interferiu na qualidade bacteriológica da matéria prima. Mas, vale ressaltar

que para isto, as boas práticas, devem ser motivo de preocupação no momento da obtenção do leite.

Tabela 2 Comparação entre os valores de CBI, CBT, Mesófilos e Psicrotróficos das amostras de leite cru colhidas no período das chuvas (n = 266), de janeiro a abril e novembro de 2007 e seca (n = 100), de maio a outubro de 2007, no entorno de Goiânia-GO.

Variáveis	Período do Ano	
	Chuvas em log	Secas em log
CBI (Bac. /mL)*	5,1331 ^a	5,0725 ^a
CBT (UFC/mL)**	4,8037 ^a	4,7353 ^a
Mesófilo (UFC/mL)	4,6404 ^a	4,5555 ^a
Psicrotrófico (UFC/mL)	2,8262 ^a	2,5610 ^a

*CBI contagem bacteriana individual; **CBT contagem bacteriana total.

*** Letras iguais na mesma linha indicam ausência de diferença significativa ($p > 0,05$).

Ao observar na Figura 2, o coeficiente de determinação $R^2 = 0,6274$, nota-se que há uma moderada relação entre contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de psicrotróficos (PSI). Isso significa que 62,74 % da variação dos microorganismos de PSI devem-se a variação de CBI.

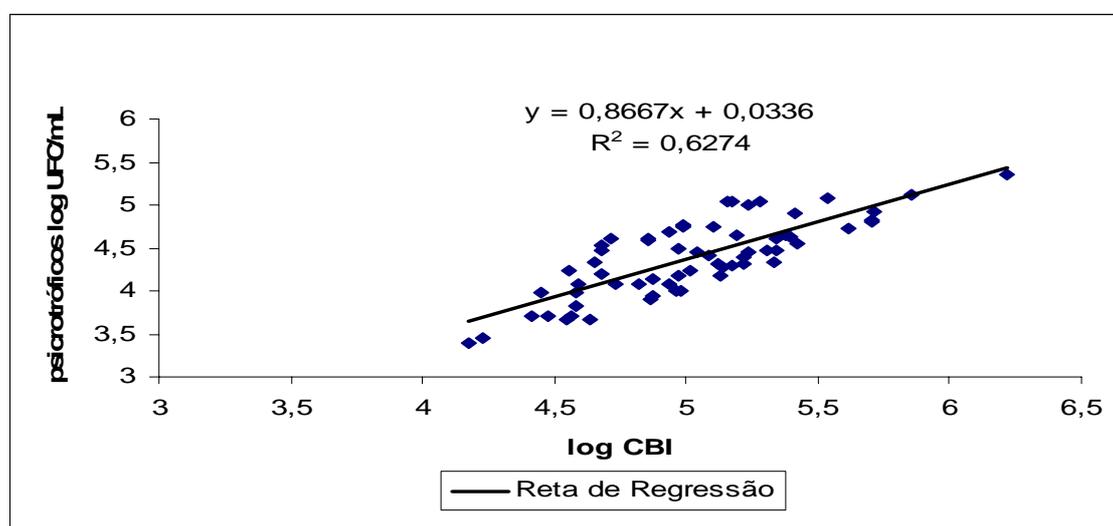


Figura 2 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de microrganismos psicrotróficos, em amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de janeiro a novembro de 2007.

*equação de regressão $y = a + bx$ e $R^2 =$ coeficiente de determinação

Na Figura 3 pode ser observado o coeficiente de determinação, $R^2=0,8145$, da Análise de Regressão, entre a contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de microrganismos mesófilos (MES). Constata-se forte relação entre os indicadores. Isto significa que 81,45% da variação dos microrganismos mesófilos devem-se a variação de CBI. CASSOLI (2005) também encontrou forte relação significativa, $R^2 = 0,8125$, em estudo desenvolvido no Brasil. Já BROUDIN (2004) encontrou uma relação mais significativa que variou de $R^2 = 0,90$ a $0,98$ em estudos desenvolvidos na Europa. Mas, vale ressaltar que a qualidade do leite nas duas regiões geográficas nas quais os experimentos foram conduzidos, revela-se bastante diferente, pois como informa o autor, naquele continente a contagem bacteriana máxima do leite era de 300.000 UFC/mL e, no presente estudo (Tabela 1), a contagem máxima foi de 4.693.000 UFC/mL.

Analisando as Figuras 2 e 3 pode-se inferir que os mesófilos constituem o grupo de microrganismo que mais se adequa ao desenvolvimento da curva de calibração do equipamento Bactoscan FC[®]. Embora o leite seja armazenado sob condição de refrigeração e o desenvolvimento dos microrganismos psicrotróficos favorecido, esse grupo de microrganismos não representa o perfil bacteriológico do leite com importância significativa no desenvolvimento da curva de calibração.

No entanto, devido a existência de muitas variáveis que podem interferir nesta relação, sugere-se que seja feita uma revisão no padrão microbiológico estabelecido pela IN 51, instituindo a contagem bacteriana individual, uma vez que os equipamentos utilizados pelos laboratórios da RBQL quantificam a carga microbiana do leite em bactéria por microlitro. Sugere-se também, que o Brasil adote uma curva nacional única de transformação dos resultados obtidos nos equipamentos eletrônicos, tendo em vista futuras relações comerciais internacionais, visto, que o padrão bacteriológico para o leite cru dos países importadores é estabelecido em UFC/mL.

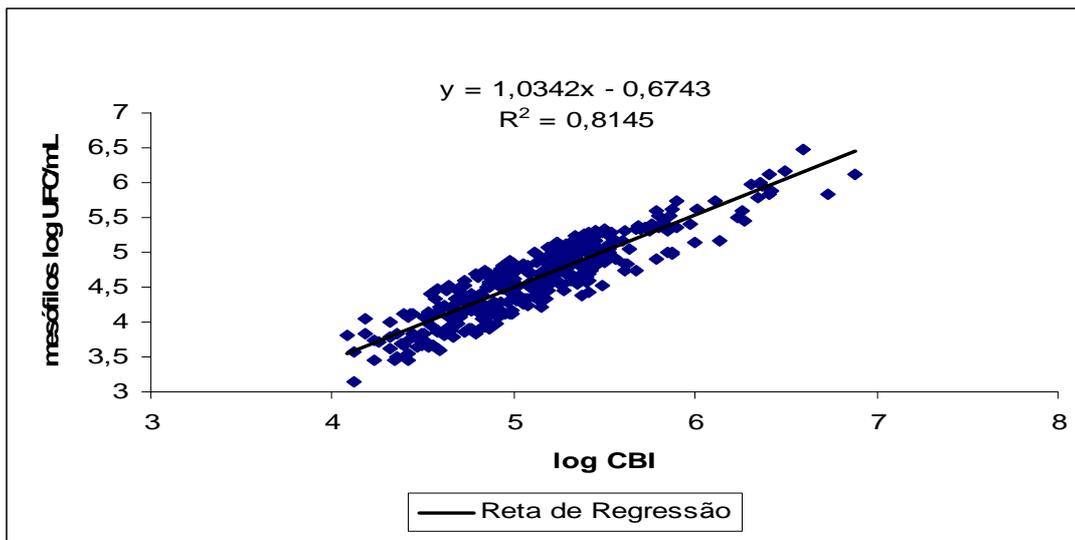


Figura 3 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de microrganismos mesófilos, em amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de janeiro a novembro de 2007

*equação de regressão $y = a + bx$ e $R^2 =$ coeficiente de determinação

Nas Figuras 4 e 5 podem ser visualizados os coeficiente de determinação no período chuvoso ($R^2= 0,8134$) e sêco ($R^2= 0,8153$). Eles revelam a existência de alta relação entre os indicadores (CBI e contagem de mesófilos), independente do período (Tabelas 6 e 7 em anexos). Em função da alta relação observada entre a contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de mesófilos, constata-se que não há necessidade de se construir uma equação visando a transformação dos dados em decorrência dos períodos climáticos avaliados (chuvas e sêca). Tal afirmativa é fortalecida pela Análise de Variância, indicando que não há diferença estatística entre a CBI do período das chuvas e da sêca (anexo Tabela 10). CASSOLI (2005) relatou, em estudo realizado no Brasil, que não havia necessidade de utilizar duas equações de transformação ao longo do ano, em função do período das chuvas ($R^2= 0,727$) ou sêca ($R^2= 0,824$), corroborando com os resultados do presente estudo. Entretanto, SUHREN et al., (2000) considera necessário realizar avaliações de amostras pelo método eletrônico, em paralelo com o método de referência, para verificar a robustez da curva de linearização dos resultados ao longo do tempo.

A acurácia medida pela estimativa do valor de referência do equipamento Bactoscan FC® e expressa pelo erro padrão residual – S_{xy} da regressão, foi de 0,234 log UFC/mL no presente estudo. Esse valor encontra-se

abaixo dos obtidos por TOMASKA & SUHREN (2004), $S_{xy} = 0,25 \log \text{UFC/mL}$, NINANE *et. al.*, (2000), $0,287 \log \text{UFC/mL}$, TOMASKA *et al.*, (2003), $0,263 \log \text{UFC/mL}$, e CASSOLI (2005), $0,309 \log \text{UFC/mL}$. Por outro lado, o erro observado no presente estudo é superior ao encontrado por TROSSAT *et al.*, (2002), $0,167 \log \text{UFC/mL}$. No que pese estas variações de resultados, o fabricante do equipamento considera que erros inferiores a $0,25 \log \text{UFC/mL}$ conferem uma boa acurácia nos resultados.

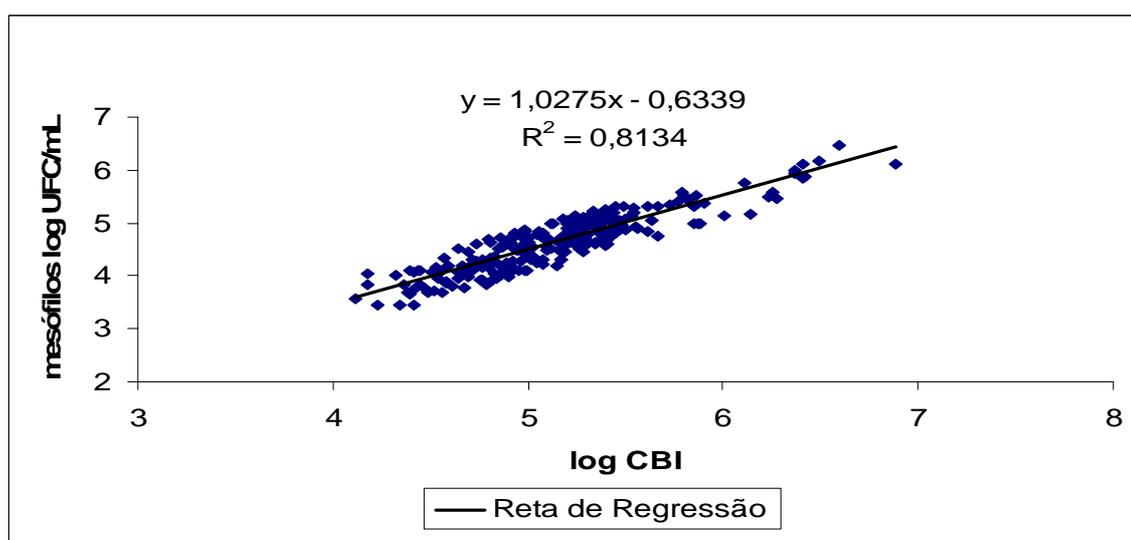


Figura 4 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e para a contagem de mesófilos no período das chuvas, em amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de janeiro a abril de 2007 e novembro de 2007.

*equação de regressão $y = a + bx$ e $R^2 =$ coeficiente de determinação

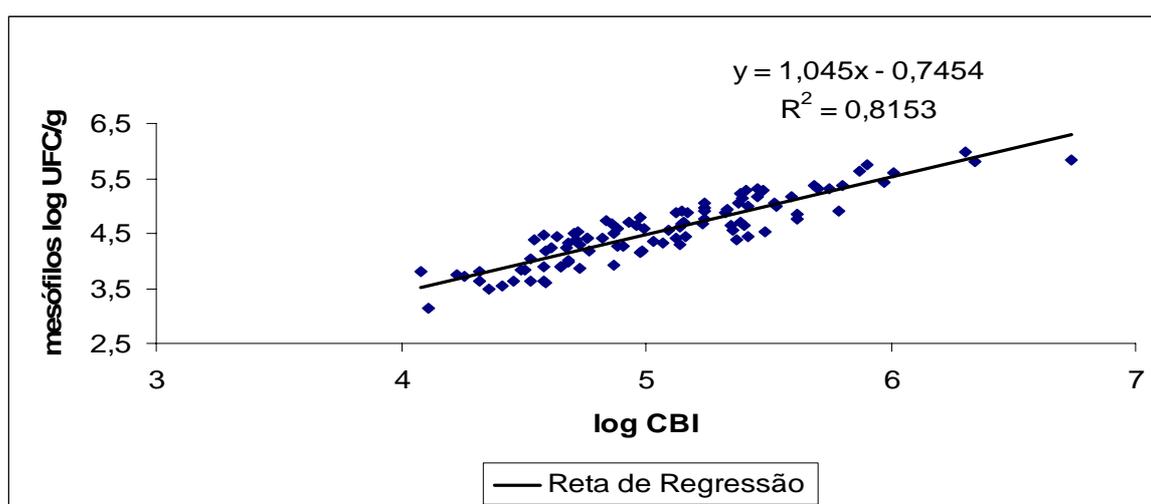


Figura 5 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e para a contagem de mesófilos no período da seca, em amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de maio a outubro de 2007.

*equação de regressão $y = a + bx$ e $R^2 =$ coeficiente de determinação

Ao analisar os dados contidos na Tabela 11 (anexo) pode-se afirmar que independentemente da forma de apresentação do conservante, líquida ou comprimido, não há diferença significativa ($p>0,05$), entre utilizar o azidiol líquido ou comprimido. Por outro lado, observando as Figuras 6 e 7 constata-se que apesar de não haver diferença entre as formas de apresentação, comprimido e líquido, as amostras conservadas com comprimido possuem um maior coeficiente de determinação, $R^2=0,9137$, ou seja, as previsões baseadas na equação ($y = 0,9771x - 0,2751$) destas amostras representam mais satisfatoriamente as contagens de mesófilos.

Nesse sentido, LEITE (2006), verificou que não houve diferença significativa entre resultados das amostras que foram conservadas com azidiol líquido e azidiol comprimido, sendo as médias de CBT igual a 5,76 e 5,68 log UFC/mL ($p>0,05$) respectivamente. MARTINS (2005) não encontrou diferença significativa ($p>0,05$) ao comparar as duas formas de apresentação do conservante. Estes resultados indicam que o conservante na forma de comprimido pode contribuir muito no processo de conservação das amostras devido às suas inúmeras vantagens sobre a forma líquida.

A forma de apresentação do conservante constitui tema de relevância na qualidade de amostra, valendo ressaltar que muitas delas são perdidas dentro dos laboratórios da RBQL, devido a má conservação ou adição incorreta de conservantes. Segundo dados de FONSECA (2005), 173 amostras foram descartadas no período de dezembro de 2003 a janeiro de 2005 em função de erros cometidos na manipulação do conservante azidiol líquido, tais como: amostra sem conservante, adição de conservante em excesso, mistura de conservantes (azidiol+bronopol) e adição de conservante em quantidade insuficiente. A utilização do conservante na forma de comprimido contribui para a redução desses tipos de erros, haja vista que a dose é única e contida de fábrica no frasco de amostragem, não sendo necessário, portanto, a sua manipulação pelo agente de coleta.

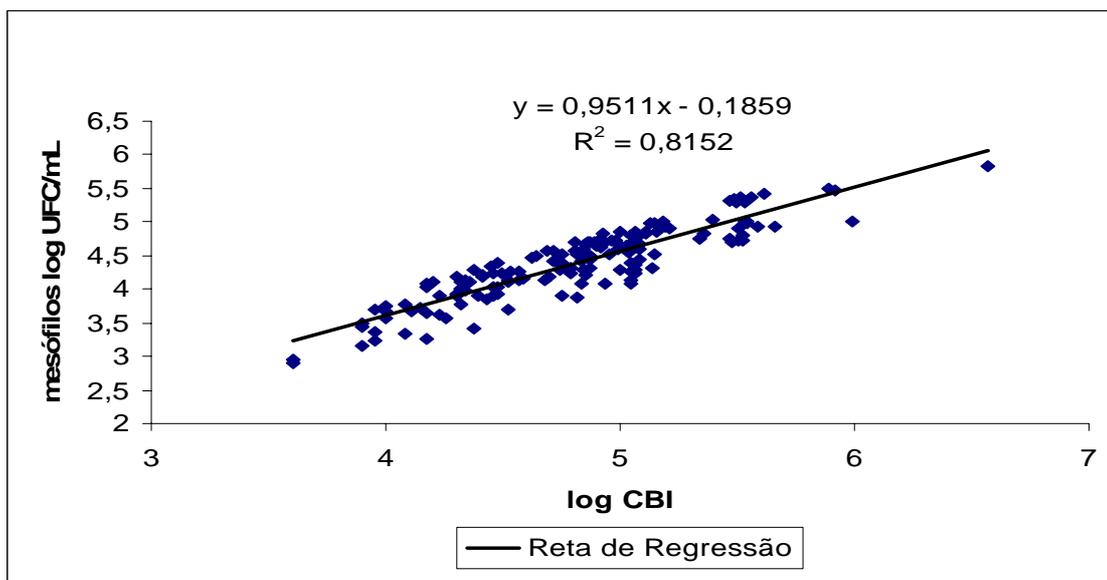


Figura 6 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de mesófilos em amostras de leite cru conservadas com azidol líquido, coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de janeiro a junho de 2007.

*equação de regressão $y = a + bx$ e $R^2 =$ coeficiente de determinação

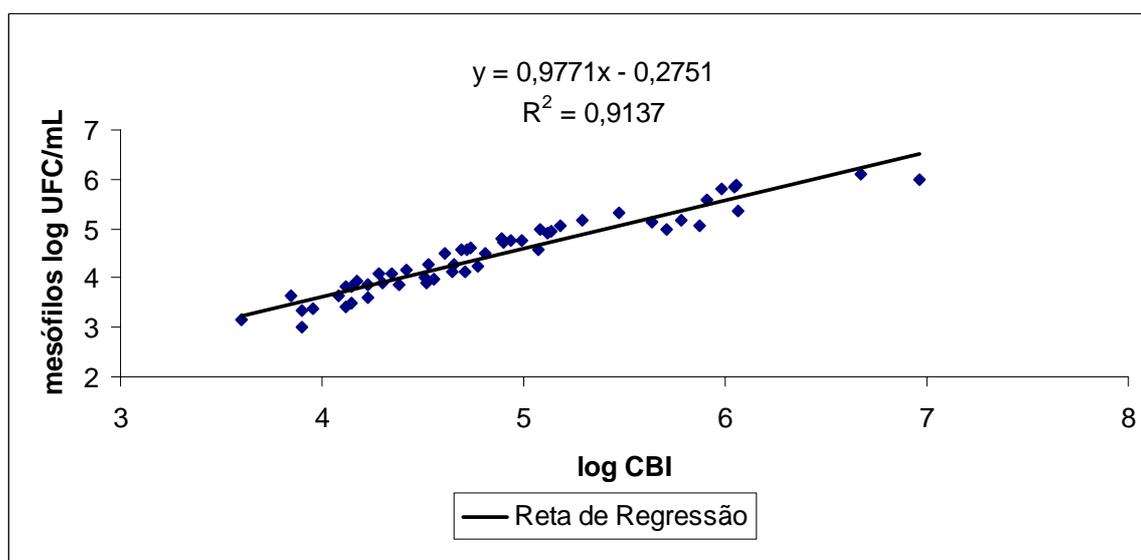


Figura 7 Dispersão dos resultados obtidos entre contagem bacteriana individual (CBI) e a contagem de mesófilos em amostras de leite cru conservadas com azidol em comprimido, coletadas em propriedades leiteiras do entorno de Goiânia-GO, no período de outubro e novembro de 2007.

*equação de regressão $y = a + bx$ e $R^2 =$ coeficiente de determinação

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

6.1 Os microrganismos mesófilos constituem o grupo que mais se adequa ao desenvolvimento da curva de linearização dos resultados de CBT para o equipamento eletrônico Bactoscan FC[®].

6.2 Em decorrência da alta relação observada nos coeficientes de determinação da análise de Regressão dos indicadores (CBI e contagem de mesófilos), nos dois períodos do ano, definidos em chuvas e seca, não há necessidade de se construir uma curva para cada período.

6.3 O conservante azidiol, independentemente de sua forma de apresentação, líquida ou em comprimido, apresenta eficácia equivalente na conservação de amostras de leite cru destinadas a CBT. Entretanto há um maior grau de relacionamento, na Análise de Regressão, para a CBI das amostras conservadas com azidiol em comprimido e a contagem de mesófilos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANUALPEC 2006. **Anuário da Pecuária Brasileira**. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2006. 470p.
2. BARCINA, Y.; ROS, G.; RINCON, F. Azidol as a preservative for milk samples. In: ANALES DE VETERINARIA DE MURCIA, Murcia, 1987, **Anales**, Murcia: Universidad de Murcia, 1987. p. 65-69.
3. BARRIENTOS, A.A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R.; NOMBELA, C. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.2, p.167-195, 2000.
4. BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p.13, 21 set. de 2002.
5. BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Aprova os Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtor de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p.13, 27 ago. de 2003.
6. BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O compromisso da qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. cap.26, p.317-333.
7. BUENO, V. F. F. **Contagem celular somática e bacteriana total do leite refrigerado em tanques de expansão de uso individual no Estado do Goiás**. 2004. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
8. CARVALHO, M. P.; ALVIM, R. S.; MARTINS, M. C. Considerações sobre a inserção do Brasil no mercado mundial de lácteos. In: ZOCCAL, R.; CARVALHO, L. A.; MARTINS, P. C.; ARCURI, P. B.; MOREIRA, M. S. P. A. **A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos**. Juiz de Fora: Embrapa gado de Leite, 2005. cap. 3, p. 39-55.
9. CASSOLI, L. D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana em leite cru**. 2005. 46 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
10. CERQUEIRA, M.M.O.P.; LEITE, M.O. Doenças transmissíveis pelo leite e derivados. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, n.13, p.39-62, 1995.

11. CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; SENA, M.J. Fatores determinantes na qualidade do leite: estudo de uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, p.241-245, 1999a.
12. CERQUEIRA, M.M.O.P.; SENA, M.J ; SOUZA, M.R. Avaliação da qualidade do leite estocado em tanque de imersão e expansão por 48 horas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, p.251-54, 1999b.
13. CERQUEIRA, M. M. O. P. Contagem bacteriana de leite: como está e como melhorá-la? **Revista Técnica de Bovinocultura de Leite**, Belo Horizonte, v.1, n.2, p.56 – 66, 2006.
14. COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophict microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v.45, p.172-207, 1982.
15. DANSEN, A.; OLID. R.M.; PITON-MALLERET, C.; GRAPPIN, R. Evalution du bactscan 8000 pour la numeration automatique et rapide de 1 aflore microbienne du lait cru. **Le Lait**, v 71, p. 661-670, 1991.
16. DIAS FILHO, F. C. **Perfil do produtor e características das propriedades rurais que utilizam ordenhadeira mecânica na bacia leiteira de Goiânia-GO**. 1997. 63 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás.
17. DÜRR, J. W.; MORO, D. V.; RHEINHEIMER, V.; TOMAZI, T. Estado atual da qualidade do leite no Rio Grande do Sul. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento,2006. cap. 6, p.83-94.
18. ENEROTH, A.; AHRNE, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p.99-106, 2000a.
19. ENEROTH, A.; AHRNE, S.; MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, v.10, p. 325-331, 2000b.
20. FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. São Paulo, SP: **Lemos Editorial**, p.1-176. 2000.
21. FONSECA, L.M.; RODRIGUES, R.; CESQUEIRA, M.M.O.P. Contagem bacteriana de leite cru granelizado do Estado de Minas Gerais. In CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo, **Anais eletrônicos...** [CD-ROM] Passo Fundo. UPF, 2004.
22. FONSECA, C.S.P. **Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais**. 2005. 62 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

23. FONSECA, L. M.; RODRIGUES, R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FONSECA, C. S. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. Situação da qualidade do leite cru em Minas Gerais. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. cap. 2, p.23-37.
24. FOSS ELECTRIC. **BactoScan FC Type 73700**: Reference Manual. Hillerod, 2001a. 172p.
25. FOSS ELECTRIC. **BactoScan FC Type 73700**: Operator's Manual. Hillerod, 2001b. 104p.
26. GARCÍA-ARMESTO, M. R.; SUTHERLAND, A. D. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. **Journal of Dairy Research**, v.64, p.261-270, 1997.
27. GONZALO, C.; MARTINEZ, J.R.; CARRIEDO, J.A. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.138-145, 2003.
28. GRIFFITHS, M.W. Applications of bioluminescence in the dairy industry. **Journal of Dairy Science**. v.76, p.3118-3125, 1993.
29. 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, n.3, p.1228-1232, 2000.
30. GUNASEKERA, T.S.; VEAL, D.A.; ATTFIELD, P.V. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.269-279, 2003.
31. HORST, J. A.; SILVA, M.S.G. Contagem bacteriana: indicador de qualidade do leite. **Revista Balde Branco**. v 77, p.16-17, 2005.
32. HORST, J. A. Impacto da refrigeração na contagem bacteriana do leite. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. cap. 12, p.163-174.
33. HOUGHTBY, G. A.; MATURIN, L. J.; KOENING, E. K. Microbiological Count Methods. In: **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. Robert T. Marshall (Ed.) *American Public Health Association* Ed., p.213-246, 1992. 547p.
34. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/economia/agropecuaria/2006. Acessado em: 15 de jun. 2008.
35. International Dairy Federation. Enumeration of Microorganisms. Colony count technique at 30°C. **IDF Standard 100B**. Brussels: International Dairy Federation, 1991. 8p.

36. JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3ed. Zaragoza: Acríbia, 1994. 804p.
37. JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5.ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 661p.
38. LEITE, M. O.; **Fatores Interferentes na Análise Eletrônica da Qualidade do Leite Cru Conservado com Azidiol Líquido, Azidiol Comprimido e Bronopol**. 2006. 62p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
39. LESLIE, K.; KELTON, D.; DAY, K. A investigation of the relationship between the presence of Prototheca and Bactoscan counts in raw milk sample. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MASTITIS AND MILK QUALITY, 2, Ithaca, 2001. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University Press, 2001. p. 135-139.
40. MACHADO, P. F.; CASSOLI, L. D. Diagnóstico da qualidade do leite na Região Sudeste. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. cap. 4, p.55-72.
41. MARTINS, M. E. P. **Influência de Diferentes Conservantes e Condições de Armazenamento de Amostras de Leite Cru na Determinação de Contagem Bacteriana Total**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
42. MENDONÇA, A.H.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Qualidade físico-química de leite cru resfriado: comparação de diferentes procedimentos e locais de coleta. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.56, n.321, p.276-281, 2001.
43. MESQUITA, A. J.; MORO, D. V., HORST J. A., SOUZA G. N., CASSOLI L. D., NEVES, R. B. S.; **Procedimentos de Amostragem de Leite Cru Refrigerado**. Goiânia, 2003, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003 p.11.
44. MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; COELHO, K. O.; BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. Q. A qualidade do leite na região Centro-Oeste. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. cap. 1, p.9-21.
45. MONARDES, H. G. Reflexões sobre a qualidade do leite. In CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo, **Anais eletrônicos...** [CD-ROM] Passo Fundo. UPF, 2004.
46. MURPHY, S. C.; BOOR, K. J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.20, p. 606-611, 2000.

47. NASCIMENTO, M. S.; SOUZA, P. A. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em placa, a contagem de psicotróficos e a prova da redutase em leite cru resfriado. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.97, p.81-86, 2002.
48. NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela IN51. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo. **Anais eletrônicos...** [CD-ROM], Passo Fundo: UFP, 2004.
49. NINANE, V.; REU, K.; OGER, R.; REYBROECK, W.; GUYOT, A. Évaluation du Bactoscan FC pour la numération des bactéries du lait cru. **Le Lait**, v.80, p.527-538, 2000.
50. PICININ, L.C.A. **Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais**. 2003. 89 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
51. PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p.1-11, 2006.
52. PRABHA, R. et al. Identification of gram-negative rod shaped psychotropic bacteria of dairy origin. **Indian Journal Dairy Science**, v.49, n.8, p.517-524, 1996.
53. RIESEBERG, M.; KASPER, C.; REASDON, K.F. Flow cytometry in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.56. p.350-360. 2001.
54. RYSER, E. Microorganisms of importance in raw milk. **Michigan Dairy Review**, v.8, p.7-9, 1999.
55. SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Microrganismos psicotróficos em leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.88, p.27-33, 2001.
56. SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrófilas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.13-19, 2001.
57. SILVA, M. H. **Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microorganismos e propriedades físico-químicas do leite**. Viçosa, 1991. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.
58. SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.35-37, 1997.

59. SOUZA, M. R. et al. Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48h e recebido por uma indústria de laticínios. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16, 1999, Juiz de Fora. **Anais...** p.238-241.
60. SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; FARIA, C. G. Qualidade do leite de rebanhos bovinos localizados na Região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, julho/2005 a junho/2006. In: MESQUITA, A. J.; DÜRR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. cap. 3, p.39-53.
61. SUHREN, G.; WALTE, H.G. First experiences with automation flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. **Milchwissenschaft**, v.50, v.3, p.249-275, 1999.
62. SUHREN, G.; REICHMUTH, J. Interpretation of quantitative microbiological results. **Milchwissenschaft**, v.55, v.1, p.18-22, 2000.
63. SUHREN, G.; WALTE, H.G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacteria count in raw milk. **Bulletin of the IDF**, n. 358, p.36-48, 2000.
64. SWANSON, K.M.J., PETRAN, R.L., HANLIN, J.H. Culture Methods for Enumeration of Microorganisms In APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, Washington, DC, APHA, 4 Ed., 2001. cap. 6, p.53-62.
65. TOMASKA, M.; SUHREN, G.; HOFERICOVA M.; CUPAKOVA M.; HLATKA T.; SLOTTOVA A. Experiences with the introduction of the BactoScan FC in Slovakia. **Danemark**, v.383, p.58-60, 2003.
66. TOMASKA, M.; SUHREN, G. Verification study on BactoScan FC counts conversion onto the scale of the reference method. **Milchwissenschaft**, v.59, v.5-6 p.261-262, 2004.
67. TROSSAT, P.H.; ROLLIER, P.; BROUTIN, P. Evaluation Of The Bactocount IBC. **La Lettre de Cevalait**, v. 30, n.40, p.34-43, 2002.
68. WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, J. K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, p.2085-2095, 2000.

ANEXOS

Tabela 3 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos psicotróficos.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	7,555290448	7,55529	104,38699	6,46737E-15
Resíduo	62	4,487417521	0,072378		
Total	63	12,04270797			

Tabela 4 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	87,93390205	87,9339	1598,609	3,0908E-135
Resíduo	364	20,02237107	0,055007		
Total	365	107,9562731			

Tabela 5 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos, no período das chuvas.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	59,44964862	59,44965	1150,780028	3,13316E-98
Resíduo	264	13,63832084	0,05166		
Total	265	73,08796945			

Tabela 6 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos, no período das secas.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	28,00187	28,00187	432,658	1,00631E-37
Resíduo	98	6,342616	0,064721		
Total	99	34,34449			

Tabela 7 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos, em amostras conservadas com azidiol na apresentação líquida.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	35,90975246	35,90975	696,9601591	8,23883E-60
Resíduo	158	8,140696156	0,051523		
Total	159	44,05044862			

Tabela 8 Análise de Variância para Regressão, em log UFC/mL, entre CBI e microrganismos mesófilos, em amostras conservadas com azidiol na apresentação de comprimido.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	28,77174293	28,77174	550,37888	2,51288E-29
Resíduo	52	2,718364883	0,052276		
Total	53	31,49010781			

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)