

Comunicado Técnico 111

ISSN 1676-7675
Sobral, Ce
Setembro, 2010

On line

Procedimentos de Coleta e Transporte de Amostras de Leite de Cabra Cru para Determinação dos Componentes e das Contagens Totais de Bactérias (CTB) e Células Somáticas (CCS) em Laboratório

Lea Chapaval¹

Valdania Mara Pereira Aguiar²

Alan Martins Mororó²

Geysa Almeida Viana²

Daniele Crsitina Timbó Magalhães²

Keslley Pereira de Miranda²

Ana Paula Brandão de Souza²

Introdução

O leite de cabra é, por definição, o produto da ordenha completa e ininterrupta em condições de higiene, de animais da espécie caprinos sadios, bem alimentados e descansados, com aspecto líquido ou, quando for o caso, congelado, cor branca, odor e sabor característicos (BRASIL, 2000).

A ordenha deve ser realizada com padrões de higiene, como a lavagem dos tetos. Logo após, enxugá-los com papel toalha; desprezar os três primeiros jatos de cada teto para fazer o teste da caneca telada, e depois da retirada do leite realizar a pós desinfecção. O leite deverá ser filtrado, e todo o material utilizado, após a ordenha, terá que ser lavado e sanitizado.

No caso específico da análise da contagem de células somáticas (CCS), pode-se também inferir sobre informações inerentes ao leite como teor de gordura, proteína, lactose e sólidos totais.

A CCS do leite abrange os leucócitos e as células epiteliais. O número dessas células aumenta no leite proveniente de cabras com mastite, em virtude, sobretudo, do aumento no número de leucócitos infiltrados (CHAPAVAL; PIEKARSKI, 2000).

O controle de qualidade do leite pode ser reconhecido através do conhecimento do conteúdo bacteriano, uma vez que o número elevado de bactérias pode ser índice de: a) leite velho; b) refrigeração inadequada; c) métodos não-higiênicos na produção, manuseio e processamento.

Essa avaliação da contaminação do leite é realizada pela Contagem Bacteriana Total (CBT), expressa por unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL). As bactérias se agrupam em colônias e vem daí a expressão UFC, que define a quantidade total de bactérias presentes em cada ml de leite.

No caso do leite de cabra, a Contagem Padrão em Placas (CPP) deve ser de, no máximo, 500.000 UFC/mL.

¹ Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/ Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145, CEP- 62010-970, Sobral/CE. E-mail: lea@cnpq.embrapa.br

² Bolsista de Iniciação Científica, Embrapa Caprinos e Ovinos.

Uma população bacteriana elevada pode significar contaminação com bactérias oriundas de diversas fontes e, portanto, presença de microrganismos causadores de infecções ou intoxicações ao homem e que, às vezes, não são eliminados pelos métodos normais de conservação e tratamento do leite (CHAPAVAL; PIEKARSKI, 2000).

A técnica utilizada para a CCS e componentes do leite é a citometria de fluxo, assim como para a CTB, que consiste num feixe de luz de um único comprimento de onda que é direcionada a um meio líquido em fluxo.

A adoção de parâmetros indicadores de qualidade do leite de cabra visa garantir a melhoria sanitária e nutricional, identidade e a constância do produto destinado ao mercado consumidor, possibilitar a permanência dos produtores na cadeia produtiva, bem como identificar possíveis falhas nos processo de produção, armazenamento e transporte do leite.

Este trabalho tem por objetivo fornecer informações necessárias para a correta realização de coletas de amostras de leite de cabra para análise laboratorial de CCS e CTB, visando assegurar a confiabilidade dos resultados requeridos.

Recomendações para Encarregados pela Coleta e Transporte das Amostras

É necessário haver um treinamento prévio com os responsáveis pela coleta do leite, para que a utilização dos tubos, conservantes e as condições de armazenamento e tempo de transporte das amostras sejam padronizadas, a fim de garantir que:

- A descrição dos procedimentos seja disponibilizada no ambiente da coleta em local estratégico de fácil acesso e visualização. Os encarregados recebam orientações sobre os riscos inerentes ao manuseio de conservantes e produtos tóxicos utilizados, procedendo às atividades por meio de adoção de medidas higiênicas para proteger e prevenir perigos que possam afetar a saúde de todos os envolvidos e possa prejudicar o meio ambiente. Possa se cumprir com responsabilidade as instruções recebidas, homogeneizando o leite antes da coleta e utilizados os tubos e conservantes de maneira correta.

Precauções

- Não trocar os tubos ou tampas no momento da coleta.
- As etiquetas de código de barras não devem ser rasuradas nem alteradas (Fig. 1).
- As etiquetas de identificação devem ser cola-

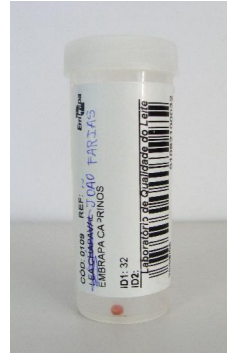


Figura 1. Etiqueta rasurada

das nos tubos na vertical para facilitar a leitura nos equipamentos de análises (Fig. 2 e 3).

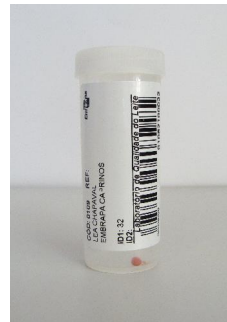


Figura 2. Etiqueta colada de maneira correta

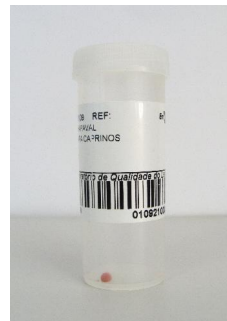


Figura 3. Etiqueta colada de maneira incorreta

- Usar gelo reciclado dentro das caixas isotérmicas para a manutenção da temperatura ideal durante o transporte das amostras. O uso de gelo comum ou gelo em saco plástico deve ser evitado para que a água resultante do degelo não prejudique a identificação das amostras.

- Manter a temperatura das amostras entre 4°C e 7°C.
- Respeitar o limite de quatro dias entre a coleta e entrega das amostras ao laboratório.

Materiais Utilizados para a Coleta

- Tubos-padrão para Contagem de Células Somáticas (CCS);
- Tubos-padrão para Contagem Total de Bactérias (CTB);
- Conservantes: BRONOPOL (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) para CCS e AZIDIOL (azida sódica e cloranfenicol) para CTB;
- Homogeneizador;
- Gelo reciclável;
- Caixa isotérmica;
- Coletadores;
- Álcool a 70%;
- Papel toalha.

Tubos e Conservantes

O laboratório responsável pelas análises, geralmente disponibiliza os tubos devidamente etiquetados, contendo os conservantes na forma líquida ou em comprimidos, de acordo com tamanho e formato adequado, a fim de facilitar o uso nos seus equipamentos (Fig. 4).



Figura 4. Tubos, etiquetas e conservantes na forma líquida (azidiol) e em comprimido (bronopol).

Os tubos são fabricados em material plástico com tampas rosqueáveis. As tampas devem garantir que o frasco seja vedado, de maneira que o conteúdo não seja perdido, ou que venha a ocorrer algum tipo de

contaminação do leite com resíduos de água, poeira ou outros produtos. É muito importante que os tubos sejam protegidos de contaminação, devendo ser abertos apenas na ocasião da coleta e fechados imediatamente.

Os conservantes têm por objetivo evitar alterações nas amostras de leite, para manter suas características e integridade desde o momento da coleta até a sua chegada ao laboratório para a realização das análises.

Devido a sua toxicidade, principalmente os conservantes líquidos, devem ser manuseados com auxílio de luvas látex e não devem entrar em contato com o leite destinado ao consumo.

A *International Dairy Federation* e o Mapa recomendam o uso dos conservantes Bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) para análise de composição e de CCS e Azidiol (azida sódica e cloranfenicol) para a CTB (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986).

Tubos utilizados para análise de CCS

Os tubos destinados à CCS geralmente possuem coloração transparente com a tampa da mesma cor, e são disponibilizados com uma pastilha de conservante (Bronopol®) de cor vermelha no seu interior (Fig. 5), podendo também ser disponibilizados na forma líquida. No entanto, a coloração e forma dos tubos e conservantes são dependentes do laboratório em que as análises serão realizadas.



Figura 5. Tubo destinado a CCS

Tubos utilizados para análise de CTB

Os tubos utilizados para a CTB são esterilizados e conservados em sacos plásticos. No geral possuem coloração transparente com a tampa vermelha (Fig. 6). Contém em seu interior uma pastilha de conservante Azidiol de cor azulada ou são disponibilizados na forma líquida.



Figura 6. Tubo utilizado para a CTB e conservante Azidiol

Conservantes

Bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1, 3-diol)

O Bronopol® é o conservante recomendado para análise de componentes do leite, como: gordura, proteína, lactose e sólidos totais e CCS. No Brasil, ele é fornecido na forma de comprimidos com 10 mg de ingrediente ativo cada um. Recomenda-se o uso de uma pastilha por tubo que é suficiente para, aproximadamente, 40 ml de leite. Quando na forma líquida, utiliza-se 0,05 ml de conservante que contém 20% do ingrediente ativo para cada 50 ml de leite.

Azidiol (azida sódica e cloranfenicol)

Conservante recomendado para a CTB, geralmente é disponibilizado na forma líquida, transferindo-se duas gotas para cada tubo (Fig. 7), quantidade suficiente para 30 a 40 ml de leite.



Figura 7. Adição azidiol na amostra

Coleta de Amostras de Leite

Antes de se coletar uma amostra, deve-se agitar o leite o suficiente para promover a homogeneização adequada dos componentes (gordura, proteína e lactose), pois a gordura é o componente mais influenciado se não houver essa homogeneização correta. Esse procedimento evita alterações na leitura, devido ao acúmulo de glóbulos de gordura na superfície no leite

no latão. Esses glóbulos carregam células somáticas e bactérias e, se a coleta for feita somente da superfície, os resultados podem se mostrar alterados.

A coleta deve ser feita em frascos padronizados, evitando o máximo de contaminação para não interferir no resultado final.

Coleta de Amostras de Leite dos Latões

O leite de cada latão deve ser homogeneizado com movimentos verticais repetitivos (para cima e para baixo) durante dez segundos no mínimo (Fig. 8), observando se existe alguma anormalidade, caso exista, interromper a coleta para não alterar no resultado.



Figura 8. Homogeneização do leite no latão

- Os tubos com conservantes devem estar distantes da abertura do latão.
- Utilizar o coletador para transferir o leite para os frascos (Fig.9).



Figura 9. Uso do coletador

- Não deve preencher todo o frasco
- Verificar e anotar a temperatura.

Se houver dois latões, sendo um cheio e outro pela metade, retira-se um litro do primeiro e meio litro do segundo latão. Desse volume de 1,5 litros, retira-se a amostra para análise, depois de se misturar bem o leite.

O frasco deve ser identificado com a etiqueta de código de barras correspondente ao produtor, ou com número que identifique o produtor no formulário de identificação de amostras (Fig. 10).

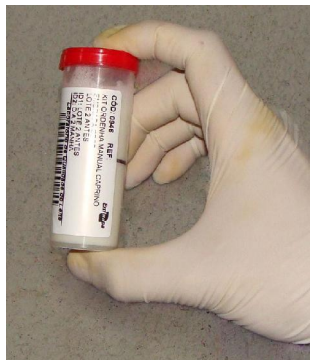


Figura 10. Identificação da amostra

As amostras devem ser colocadas imediatamente em uma caixa isotérmica (tipo isopor ou outra), com gelo reciclável (Fig. 11).



Figura 11. Caixa isotérmica com gelo reciclável

- Colocar gelo reciclável suficiente para manter uma temperatura de no máximo 7°C dentro da caixa isotérmica;
- O coletador deve ser limpo com cautela;
- Após o preenchimento dos frascos destinados ao teste de CCS, eles devem ser colocados em repouso durante cinco minutos e, em seguida, homogeneizar o leite para que o conservante Bronopol® se dissolva completamente. Essas amostras terão coloração rosada. Nas amostras destinadas à CTB, logo após colocar o conservante Azidiol, misturar imediatamente, sendo observada uma coloração azulada (Fig. 12).

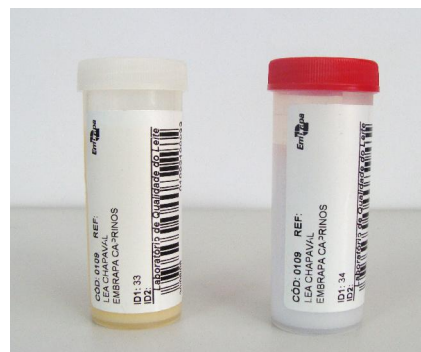


Figura 12. Aspectos das amostras para CCS e CTB

Coleta de Amostras de Leite do Tanque de Refrigeração

Antes de coletar as amostras em estabelecimentos com tanque de expansão direta para resfriamento do leite, recomenda-se:

- Sempre observar se há qualquer anormalidade no leite. Em caso de anormalidade, registrar a ocorrência e interromper a coleta;
- Realizar a medição do volume de leite. Quando a régua permanece no interior do tanque, deve-se secá-la com toalha de papel descartável, até o nível do leite. Se a régua é mantida fora do tanque, deve-se lavá-la cuidadosamente antes de introduzi-la no tanque. Depois disso, deve-se secá-la com toalha de papel descartável ao nível do leite. Fazer a anotação do volume de leite em ficha própria após a medição;
- Ligar o sistema de agitação do tanque por, no mínimo, cinco minutos imediatamente antes da coleta da amostra. Quando a capacidade do tanque for maior que 5.700 litros, o tempo de agitação deve ser aumentado para dez minutos, ou de acordo com a recomendação do fabricante. Deve-se sempre coletar a amostra logo após o desligamento do agitador em qualquer dos dois casos;
- Os procedimentos seguintes são os mesmos realizados para coleta de amostras em latão.

Envio das Amostras para o Laboratório

As amostras de leite devem estar em recipientes apropriados, limpos ou esterilizados e mantidas sob refrigeração igual ou inferior a 4 °C, desde a coleta até a entrega no laboratório.

Deve-se ter o cuidado de não congelar as amostras para evitar alterações nos resultados.

As amostras de leite devem ser acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e a temperatura não deve ultrapassar os 7°C no período compreendido entre a coleta de amostras e a realização das análises no laboratório (máximo de 96 horas).

Algumas precauções a serem tomadas:

- Os frascos e equipamentos ou utensílios (conchas, copos coletores e baldes) usados para a coleta de amostras devem ser protegidos de contaminação antes e durante o uso. Estes utensílios devem ser higienizados com detergente alcalino clorado (130 ppmde cloro), ou álcool etílico 70 °GL após o uso;
- O coletor de amostra (concha, ou outro modelo) deve ser mantido limpo e seco. Ele deve ter superfície lisa e cantos arredondados para facilitar sua limpeza, e ser, de preferência, de aço inoxidável (Fig. 13).



Figura 13. Coletadores

- O frasco de amostra deve ser manuseado com cuidado, evitando-se derrubar a tampa no chão ou o contato dela ou do interior do frasco com outros materiais ou possíveis contaminantes;
- Quanto ao envio das amostras ao laboratório, todas devem ser acompanhadas de uma ficha com identificação da propriedade e endereço para envio dos resultados, data e horário da coleta, no caso de a coleta ter sido realizada em mais de um dia, a data do primeiro dia de coleta deve ser considerado para o lote

de amostras. Identificar o tipo de amostra enviada (se de latão ou do tanque de refrigeração), temperatura da amostra no momento da coleta, local da amostragem e identificação do responsável pela coleta (em anexo);

- Os frascos devem conter as etiquetas de identificação da amostra por meio de código de barras coladas verticalmente ou numerados sequencialmente, usando-se caneta com tinta permanente (do tipo recomendado para uso em laboratório), devendo-se evitar as do tipo nanquim.

Considerações Finais

A credibilidade e a confiança nos resultados das análises pretendidas dependem da adoção dos procedimentos corretos durante a coleta, armazenamento e transporte das amostras para o laboratório. Levando em consideração que nos laboratórios brasileiros de análise de leite existem programas específicos para utilização e controle dos equipamentos, torna-se necessária a padronização das ações tomadas, bem como a adoção correta dos procedimentos.

Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regulamento Técnico de produção, identidade e qualidade de leite de cabra. Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 8 nov. 2000. Seção 1. p. 23.

CHAPAVAL, L. PIEKARSKI, P. R. **Leite de qualidade:** manejos reprodutivos, nutricionais e sanitários. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2000. Cap. 8. p.115 – 175.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Whole milk:** determination of milkfat, protein and lactose content; guide for the operation of mid-infra-red instruments. Bruxelas, 1996. 12 p. (IDF. Standard 141 B).

Anexo

Exemplo de Formulário de Identificação de Amostras de Leite

Solicitante:		Data da coleta:	
Propriedade:		Data da análise:	
Endereço:			
Código do rebanho/indústria:		Telefone/fax:	
E-mail:		Temperatura do leite: °C	

Nº do frasco	Identificação da amostra*	Nº do frasco	Identificação da amostra

* A identificação da amostra pode ser o código/nome de produtor (para cooperativas) ou o número/nome do animal (para fazendas).

Comunicado Técnico, 111 On line

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Caprinos e Ovinos
Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE
Fone: (0xx88) 3112-7400
Fax: (0xx88) 3112-7455
Home page: www.cnpc.embrapa.br
SAC: http://www.cnpc.embrapa.br/sac.htm

1ª edição
 On line (Setembro/2010)

Fotos e Ilustrações: Lea Chapaval

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

UM PAÍS DE TODOS GOVERNO FEDERAL

Comitê de publicações

Presidente: Marco Aurélio Deolmondes Bomfim
Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho
Membros: Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campelo, Luciana Cristine Vasques Villela, Antônio César Rocha Cavalcante, Sérgio Cobel da Silva, Adriana Brandão Nascimento Machado, Manoel Everardo Pereira Mendes e Geny Rodrigues Cunha de Queiroz (suplente)

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho.
Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos.
Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo.
Editoração eletrônica: Alexandre César Silva Marinho.