

Juiz de Fora, MG
Novembro, 2007

Autores

José Renaldi Feitosa Brito, Médico-veterinário, Ph.D. – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite
jrfbrito@cnpqgl.embrapa.br

Guilherme Nunes de Souza – Médico-veterinário, D.Sc. – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite
gnsouza@cnpqgl.embrapa.br

Cristiano Gomes de Faria – Químico, M.Sc. Analista da Embrapa Gado de Leite
cgomes@cnpqgl.embrapa.br

Luciano Castro Dutra de Moraes – Técnico Agropecuário da Embrapa Gado de Leite
luciano@cnpqgl.embrapa.br

Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias

Introdução

As análises laboratoriais para determinação dos teores de gordura, lactose, proteína e sólidos totais, e para a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem total de bactérias (CTB) no leite são realizadas em pequenos volumes (amostras), em geral de aproximadamente 50 ml. As amostras de leite devem ser representativas do volume total de leite que se pretende avaliar. Esse volume pode ser de até 5.000 litros ou mais, e uma única amostra é utilizada para o exame. Por isso, alguns cuidados devem ser observados quando se pretende coletar e encaminhar amostras de leite para análise laboratorial.

Além da representatividade da amostra, mencionada acima, outros fatores podem interferir com os resultados das análises e devem ser levados em consideração. Um desses fatores é a facilidade de contaminação do leite, seguida da multiplicação dos microrganismos em número suficiente para causar sua deterioração em algumas horas. A contaminação do leite ocorre facilmente em condições inadequadas de obtenção, armazenamento, coleta e transporte. Outro fator é a riqueza nutricional do leite, que o torna um meio ideal para a multiplicação microbiana.

As amostras de leite devem ser coletadas em recipientes apropriados, limpos ou esterilizados, conforme o tipo de exame a ser realizado, e devem ser enviadas ao laboratório sob refrigeração (máximo 7 °C; idealmente, em torno de 4 °C). Os procedimentos de coleta e transporte de amostras devem ser padronizados, de acordo com normas aceitas internacionalmente, de modo que os resultados obtidos por diferentes laboratórios possam ser comparados entre si e utilizados pelos interessados (produtores, indústria e serviço de fiscalização).

A Instrução Normativa 51/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) prevê a coleta mensal de pelo menos uma amostra de leite de cada rebanho, a qual será analisada pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade de Leite (RBQL). A confiabilidade dos resultados das análises depende, em grande parte, da adoção de procedimentos estabelecidos para a coleta e transporte das amostras, sendo importante observar:

- ◆ Capacitação do pessoal responsável pela coleta e transporte das amostras de leite;
- ◆ Padronização dos procedimentos;
- ◆ Escolha de materiais adequados para a coleta e transporte das amostras, observando-se, especialmente: o tipo de frasco, o tipo de conservante e as condições de armazenamento das amostras;
- ◆ Tempo decorrido entre a coleta e a realização das análises;
- ◆ Fornecimento de informações sobre as amostras e o rebanho de origem.

Recomendações gerais

Responsável pela coleta de amostras

A pessoa encarregada de coletar as amostras de leite deve:

- ◆ receber treinamento e seguir os procedimentos recomendados. A descrição dos procedimentos deve estar disponível, por escrito, de forma visível e de fácil acesso, no local da coleta;
- ◆ receber informação sobre os riscos inerentes ao manuseio dos conservantes usados ou de qualquer outro produto químico que possa apresentar risco à sua saúde, à saúde dos consumidores do leite e ao ambiente;
- ◆ ser orientada sobre os cuidados higiênicos e sobre os riscos de contaminação do leite em caso de má-condução de suas atividades;
- ◆ dispor de tempo suficiente para proceder à coleta conforme as instruções recebidas, especialmente quanto à homogeneização do leite antes da coleta e uso correto dos frascos e conservantes, mesmo que haja outras atividades a serem desempenhadas.

Em geral, a coleta de amostras de leite para análise laboratorial é realizada sem aviso prévio. Dessa forma, evitam-se, mudanças dos procedimentos de rotina da ordenha e do armazenamento do leite, o que poderia comprometer a representatividade da amostra, uma vez que as análises não são realizadas diariamente.

A coleta de amostras deverá ser feita na propriedade (fazenda) imediatamente antes do recolhimento do leite pelo transportador, seja o leite armazenado em tanque de expansão ou em latões.

Material e procedimentos recomendados para coleta de amostras de leite

Frascos

Os frascos utilizados são, geralmente, de material plástico, com tampas rosqueáveis. As tampas devem vedar o frasco de maneira segura, para evitar tanto o vazamento do líquido, quanto a contaminação do leite com água, poeira ou qualquer outro produto. Normalmente, os frascos e os conservantes são fornecidos pelo laboratório responsável pelas análises. Isso facilita e agiliza a rotina do laboratório, pois são usados frascos de tamanho e formato adequados para o uso nos equipamentos. Os frascos devem ser mantidos fora do alcance de crianças, em ambiente seco, ao

abrigo da luz, e protegidos de qualquer contaminação (poeira, água, insetos, etc.). Só devem ser abertos no momento da coleta.

Os frascos utilizados para a coleta de amostras de leite destinadas à determinação dos componentes e CCS possuem a tampa translúcida (mesma cor do frasco), e são disponibilizados com uma pastilha de conservante (Bronopol®) no seu interior (Fig. 1).



Fig. 1. Frasco com tampa rosqueável translúcida com pastilha de Bronopol® no interior utilizado para coleta de amostras destinadas à determinação dos componentes e contagem de células somáticas em amostras de leite cru (direita). Frasco com tampa rosqueável vermelha no interior de invólucro de plástico utilizado para coleta de amostras de leite para a contagem total de bactérias (CTB) (centro). Frasco conta-gotas com conservante azidiol para ser adicionado às amostras de leite destinadas à CTB (esquerda).

Os frascos utilizados para a CTB possuem tampa vermelha, e são previamente esterilizados. São conservados em sacos plásticos individuais, para evitar contaminação. Esses frascos devem ser abertos no momento da coleta para a adição da amostra de leite e do conservante em seu interior (Fig. 1).

Conservantes

Os conservantes são usados para garantir que as amostras de leite mantenham sua integridade e características desde o momento da coleta até a realização da análise no laboratório. Há vários tipos de conservantes que podem ser usados. Os conservantes são tóxicos e devem ser manuseados com auxílio de luvas de látex (luvas cirúrgicas) e não devem entrar em contato com o leite destinado ao consumo. Os frascos usados para a coleta de amostras de leite devem ser

abertos somente no momento da coleta, devendo ser tampados imediatamente após.

Amostras de leite podem ser estocadas sem conservante por até 24 horas (tempo decorrido entre a ordenha e a análise no laboratório), desde que mantidas entre 2 e 6 °C. No caso de serem analisadas com mais de 24 horas após a ordenha, é necessário adicionar o conservante e deixá-lo atuar por, no mínimo, três horas antes da análise.

Os conservantes usados no laboratório são os recomendados pela *International Dairy Federation* (Federação Internacional de Laticínios – IDF/FIL) e pelo Mapa:

- ◆ **Bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol):** conservante recomendado para análises de composição e de CCS. A concentração final na amostra deve ser entre 0,02 e 0,05%.

O Bronopol® é usado normalmente na forma de comprimido com 10 mg de ingrediente ativo ou 0,05 ml (contendo 20% do ingrediente ativo) para cada 50 ml de leite. No Brasil, o Bronopol® tem sido fornecido na forma de pastilhas. Geralmente é colocada uma pastilha em cada frasco, que é suficiente para aproximadamente 40 ml de leite. No caso da análise de gordura, existe a recomendação de se proceder à análise no máximo cinco dias após a coleta.

- ◆ **Azidiol (azida sódica e cloranfenicol):** conservante recomendado para a CTB. As concentrações finais na amostra de leite devem ser entre 0,10 e 0,12% (azida sódica) e 0,004 e 0,005% (cloranfenicol). Geralmente o azidiol é usado na forma líquida, colocando-se duas gotas em cada frasco, para 30 a 40 ml de leite. Além do cloranfenicol e da azida sódica, esse conservante contém o corante azul de bromofenol, que confere às amostras de leite uma coloração azul clara.

Tempo e conservação da amostra entre a coleta e a análise no laboratório

As amostras de leite devem ser mantidas sob refrigeração desde a coleta até a entrega no laboratório. Apesar das restrições da FIL/IDF, para o tempo máximo decorrido entre a coleta de amostras e realização das análises (dois a cinco dias, dependendo da análise) foi observado que amostras de leite com os respectivos conservantes e mantidas até 7 °C não apresentaram diferenças significativas nos resultados obtidos para componentes, CCS e CTB ao longo de

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

De acordo com o Mapa, 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).

Normalmente o laboratório cadastra os clientes e encaminha etiquetas com código de barras para facilitar a identificação das amostras de leite. Nesses casos, as etiquetas devem ser colocadas nos frascos. Quando isso não é possível, ou quando é a primeira vez que são enviadas amostras de leite para análise, é necessário preencher um formulário (Anexo 1), com informações como nome e endereço do solicitante, data de coleta, data de envio e número de amostras a serem analisadas, listagem das amostras/produzidor, bem como o tipo de exames a serem realizados.

Precauções

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 ppm de cloro), ou álcool etílico 70 °GL após o uso.

O coletador de amostra (concha, ou outro modelo) deve ser mantido limpo e seco, evitando-se seu contato com materiais ou superfícies contaminadas por moscas, matéria orgânica, poeira, etc. Ele deve ter superfície lisa e cantos arredondados para facilitar sua limpeza, e ser, de preferência, de aço inoxidável.

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.

Coleta de amostras de leite do tanque de refrigeração

A coleta de amostra do leite do tanque requer agitação suficiente para promover a homogeneização adequada dos componentes do leite (gordura, proteína e lactose), evitando-se alterações das leituras, que se devem pela tendência de acúmulo dos glóbulos de gordura na superfície do tanque. Esses glóbulos carregam células somáticas e bactérias e caso o leite não seja bem

homogeneizado, e a coleta seja feita apenas da superfície do leite, os resultados ficarão alterados. Em estabelecimentos com tanque de expansão direta para resfriamento do leite recomenda-se, antes de coletar as amostras:

- ◆ Observar se há qualquer anormalidade no leite. Em caso de anormalidade, registrar a ocorrência e interromper a coleta.
- ◆ Medir o 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. Após a medição, faz-se a anotação do volume de leite em ficha própria.
- ◆ 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. Em qualquer caso, deve-se sempre coletar a amostra logo após o desligamento do agitador.
- ◆ Anotar a temperatura do leite.
- ◆ Não manter o frasco com conservante sobre o leite contido no tanque.
- ◆ Usar um coletador para transferir o leite para o frasco.
- ◆ Não ultrapassar $\frac{3}{4}$ (três quartos) do frasco com leite (medida feita considerando-se o frasco tampado). Isso é feito para permitir a mistura do leite com o conservante.
- ◆ Identificar cada frasco com a correspondente etiqueta de código de barras ou número correspondente ao nome do produtor indicado no formulário para identificação de amostras (Anexo 1).
- ◆ Colocar a amostra de leite em caixa isotérmica (tipo isopor ou outra) com gelo reciclável (Fig. 2), imediatamente após a coleta.



Fig. 2. Caixas isotérmicas (plástico e isopor), gelos recicláveis e estantes para armazenamento e transporte de amostras de leite.

- ◆ Garantir que a quantidade de gelo reciclável seja suficiente para manter a temperatura interna da caixa isotérmica em no máximo 7°C. Deve-se evitar o uso de gelo comum ou gelo em saco plástico, pois a água resultante do degelo pode prejudicar a identificação das amostras.
- ◆ Limpar cuidadosamente o coletador de amostra.
- ◆ Deixar o frasco em repouso durante cinco minutos e homogeneizar o leite, para que o conservante se distribua uniformemente. O leite deverá adquirir a coloração característica do conservante (rósea ou pêssego, no caso do Bronopol® e azulado, no caso do Azidiol) (Fig. 3).



Fig. 3. Amostras de leite com coloração azulada (esquerda) e de pêssego (direita) após adição do conservante azidiol e Bronopol®, respectivamente.

Coleta de amostras de leite de latões

Antes da coleta da amostra, deve-se:

- ◆ Agitar o leite de cada latão, usando um agitador manual (agitador de latão) (Fig. 4) por no mínimo dez segundos. Misturar o leite das camadas superiores com o das camadas inferiores, pelo menos dez vezes com movimentos suaves e contínuos. O movimento do agitador deve ser sempre na direção vertical (para cima e para baixo) (Fig. 5).



Fig. 4 a. Homogeneizador (esquerda) e coletador (direita) de aço inoxidável, utilizados para coleta de amostras de leite em latões.



Fig. 4 b. Detalhe do homogeneizador e do coletador (de amostras).



Fig. 5. Processo de homogeneização (movimentos suaves para cima e para baixo), para coleta de amostra de leite em latões.

- ◆ Observar se há qualquer anormalidade no leite. Em caso de anormalidade, registrar a ocorrência e interromper a coleta.
- ◆ Anotar a temperatura do leite, caso seja possível.
- ◆ Manter o frasco com conservante longe da abertura do latão.
- ◆ Usar coletador (ou recipiente adequado) para transferir o leite para o frasco (Fig. 4).
- ◆ Não ultrapassar $\frac{3}{4}$ do frasco com leite (medida feita considerando-se o frasco tampado), para misturar o leite com o conservante.

Quando houver necessidade de coletar leite de vários latões, deve-se obter uma amostra representativa do conjunto de latões. Homogeneizar o volume total de leite de cada latão e após este procedimento transferir quantidades de leite proporcionais de cada latão para outro recipiente (Fig. 6). Deste recipiente, retira-se o volume necessário para o frasco (Fig. 7). Por exemplo: 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, como mostrado na Fig. 5.



Fig. 6. Transferência do volume de leite amostrado do latão para recipiente por meio de coletador de aço inox.



Fig. 7. Transferência do volume de leite amostrado dos latões para o frasco coletor de plástico.

- ◆ Identificar o frasco com a etiqueta de código de barras (Fig. 8) correspondente ao produtor, ou com número que identifique o produtor no formulário de identificação de amostras (Anexo 1).



Fig. 8. Etiquetas de código de barras coladas verticalmente nos frascos para identificação das amostras de leite.

- ◆ Colocar a amostra de leite imediatamente em uma caixa isotérmica (tipo isopor ou outra), com gelo reciclável.
- ◆ Garantir que a quantidade de gelo reciclável seja suficiente para manter a temperatura interna da caixa isotérmica em no máximo 7°C.
- ◆ Limpar cuidadosamente o coletador.
- ◆ Deixar o frasco em repouso durante cinco minutos e homogeneizar o leite, para que o conservante Bronopol® se dissolva e se distribua uniformemente no caso das amostras destinadas para determinação dos componentes e CCS. Para as amostras destinadas a CTB, logo após colocar o conservante Azidiol, homogeneizar imediatamente. O leite deverá adquirir a coloração característica do conservante (rósea ou pêssego, no caso do Bronopol® e azulado, no caso do Azidiol).

Encaminhamento das amostras para o laboratório

Todas as amostras encaminhadas ao laboratório devem ser acompanhadas de uma ficha com os seguintes dados:

- ◆ 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.
- ◆ Tipo de amostra enviada (se de latão ou do tanque de refrigeração).
- ◆ Temperatura da amostra no momento da coleta.
- ◆ Local da amostragem.
- ◆ Identificação do responsável pela coleta.

Esses dados podem ser encaminhados em fichas, como o modelo anexo. Os frascos devem conter as etiquetas de identificação da amostra por meio de código de barras coladas verticalmente (Fig. 8) ou numerados seqüencialmente, usando-se uma tinta solúvel em álcool (do tipo recomendado para retroprojeter), devendo-se evitar as do tipo nanquim.

Além da numeração dos frascos, deve ser incluída a identificação por nome ou código do produtor. Os dados complementares (identificação, endereço, data da coleta, etc.) são importantes para a identificação da origem das amostras, bem como para garantir o retorno dos resultados de maneira rápida e confiável.

O que se deve evitar

- ◆ Trocar frascos ou tampas no momento da coleta.
- ◆ Rasurar ou alterar a identificação das etiquetas de código de barras.
- ◆ Colar horizontalmente as etiquetas de identificação por meio de código de barras.
- ◆ Usar cubos de gelo dentro das caixas isotérmicas.
- ◆ Enviar amostras com temperaturas acima de 7°C.
- ◆ Enviar amostras com mais de 96 horas após a coleta.

Referências bibliográficas

GOODRIDGE, L.; LENCKI, R. W. A review of international standards and the scientific literature on farm milk bulk-tank sampling protocols. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 3099-3104, 2004.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk:** enumeration of somatic cells. Bruxelas, 1995. 8 p. (IDF. Standard 148 A).

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).

MARSHALL, R. T. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 547 p.

SOUZA, G. N.; FARIA, C. G.; RIOS, R.; OLIVEIRA, V. C.; SANTOS, R. R. D.; ARCURI, E. F.; LANGE, C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem total de bactérias em amostras de leite cru conservadas com azidiol. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, n. 351, p. 358-361, 2006.

SOUZA, G. N.; SILVA, M. R.; SOUZA, F. S.; COELHO, R. O.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem de células somáticas no leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 830-834, 2005.

**Circular
Técnica, 92**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco
Fone: (32)3249-4700
Fax: (32)3249-4751
E-mail: sac@cnppl.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2007): 1.000 exemplares



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

Ministério do
Desenvolvimento
Agrário



**Comitê de
publicações**

Presidente: *Pedro Braga Arcuri*
Secretária-Executiva: *Inês Maria Rodrigues*
Membros: *Alexandre Magno Brighenti dos Santos,
Aloísio Torres de Campos, Carlos Eugênio Martins,
Carlos Renato Tavares de Castro, Edna Froeder Arcuri,
Francisco José da Silva Lédo, Jackson Silva e Oliveira,
Juliana de Almeida Leite, Luiz Sérgio de Almeida
Camargo, Marcelo Dias Müller, Marcelo Henrique
Otênio, Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto, Marlice
Teixeira Ribeiro, Wadson Sebastião Duarte da Rocha*

Expediente

**Supervisão editorial, tratamento das ilustrações e
editoração eletrônica:** *Angela de Fátima Araújo Oliveira*