

109

Circular
TécnicaJuiz de Fora, MG
Setembro, 2017

Autores

José Renaldi Feitosa de Brito
Médico Veterinário, Ph.D.
Membro da Nuvlac - Núcleo de
Valorização de Lácteos, UFJF
Juiz de Fora, MG

Guilherme Nunes de Souza
Médico Veterinário, D.Sc.
Pesquisador da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG

Cristiano Gomes de Faria
Químico, M.Sc.
Analista da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG

Luciano Dutra de Moraes
Técnico em Agropecuária
Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG

Mônica de Cássia Rodrigues
Administradora de Empresa
Supervisora do Sistema de Qualidade,
Fadep
Juiz de Fora, MG

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

Introdução

Essa Circular Técnica é uma atualização da publicada em junho de 2015 para contemplar as mudanças efetuadas na coloração da tampa dos frascos utilizados na coleta das amostras.

As análises laboratoriais para determinação dos teores de gordura, lactose, proteína extrato seco desengordurado, extrato seco total e uréia, e para a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem total de bactérias (CTB) em leite cru são realizadas em pequenos volumes (amostras), 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 a análise. 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 análise a ser realizado, e devem ser enviadas ao laboratório sob refrigeração (máximo 7 °C; idealmente, em torno de 4 °C) tendo-se o cuidado de não congelar a amostra. 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.

A confiabilidade dos resultados das análises depende, em grande parte, da adoção de procedimentos estabelecidos para a coleta, transporte e armazenamento 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, armazenamento 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;
- Receber orientação 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 imediatamente antes do recolhimento do leite pelo transportador. No caso de tanques comunitários, amostras individualizadas de todos os produtores devem ser coletadas juntamente com a amostra do tanque, as quais devem ser colhidas antes da transferência do leite dos latões para o tanque.

Material e procedimentos recomendados para coleta de amostras de leite

Frascos

Os frascos utilizados são de material plástico, com tampas de pressão. 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 agente. 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 vermelha e são disponibilizados com uma pastilha de conservante (Bronopol®) no seu interior (Figura 1). Os frascos utilizados para a CTB possuem tampa azul, são previamente esterilizados e disponibilizados com uma pastilha de conservante azidiol no seu interior (Figura 1). São conservados em invólucros plásticos individuais, para evitar contaminação. Esses frascos devem ser abertos no momento da coleta para a adição da amostra de leite (Figura 1).



Figura 1. Frasco com tampa de pressão vermelha 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 estéril com tampa de pressão azul no interior pastilha de azidiol utilizado para coleta de amostras de leite para a contagem total de bactérias (CTB).

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. Os conservantes são tóxicos não devem entrar em contato com o leite destinado ao consumo.

Os conservantes usados no laboratório são os recomendados pela *International Dairy Federation* (Federação Internacional de Laticínios – IDF/FIL) e pelo MAPA e a quantidade de conservantes utilizada,

foi previamente dimensionada para os volumes dos frascos padrão utilizados na amostragem.

- 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%. Este conservante possui um corante que confere uma coloração pêssego às amostras de leite.
- 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).

Além do cloranfenicol e da azida sódica, esse conservante contém um corante, que confere às amostras de leite uma coloração azulada

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 resfriadas de 0 °C a 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 recepção de amostras no laboratório (máximo de 96 horas).

O laboratório cadastra as informações dos clientes e encaminha etiquetas adesivas com código de barras utilizadas para a identificação das amostras de leite.

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 antes e após serem utilizados.

O coletador de amostra (concha, ou outro modelo) deve ser mantido limpo e seco, evitando-se seu contato com materiais ou superfícies contaminadas por sujidades (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. Todo o cuidado deve ser tomado para não contaminar indevidamente o leite que está sendo amostrado.

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;
- 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 mil 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;
- Não manter o frasco com conservante sobre o leite contido no tanque;
- Usar um coletador para transferir o leite para o frasco;
- Não ultrapassar 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;
- Colocar a amostra de leite em caixa isotérmica (tipo isopor ou outra) com gelo reciclável (Figura 2), imediatamente após a coleta.



Figura 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. Para dimensionar a quantidade de gelo reciclável a ser utilizado no resfriamento utilize a proporção em peso de 1:1 entre os gelos recicláveis e o peso total das amostras a serem enviadas para análise;
- Limpar cuidadosamente o coletador de amostra;
- Aguardar cinco minutos e após homogeneizar o leite, para que o conservante se dissolva. O leite deverá adquirir a coloração característica do conservante (pêssego, no caso do Bronopol® e azulado, no caso do Azidiol) (Figura 3).



Figura 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) (Figura 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) (Figura 5).



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



Figura 4b. Detalhe do homogeneizador e do coletador de amostras.

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 (Figura 6). Deste recipiente, retira-se o volume necessário para o frasco (Figura 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 Figura 5.



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



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

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.



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

Encaminhamento das amostras para o laboratório

Todas as amostras encaminhadas ao laboratório devem ser acompanhadas de um formulário no qual é registrado, dentre outras, as seguintes informações:

- 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 considerada para o lote de amostras;
- Quantidade de amostras, caixas isotérmicas, gelos recicláveis e racks enviadas;
- Data, hora e forma de envio;
- Contato e o responsável pelo envio.
- Os frascos devem conter as etiquetas de identificação da amostra por meio de código de barras coladas verticalmente (Figura 8).



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

Referências

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, 109

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco
Fone: (32)3311-7400
Fax: (32)3311-7401
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Embrapa

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

2ª edição rev. web



Comitê de publicações

Presidente *Marcelo Henrique Otenio*
Secretária-Executiva *Inês Maria Rodrigues*
Membros *Jackson Silva e Oliveira, Leônidas Paixão Passos, Alexander Machado Auad, Fernando Cesar Ferraz Lopes, Francisco José da Silva Lédo, Pérsio Sandir D'Oliveira, Denis Teixeira da Rocha, Frank Ângelo Tomita Bruneli, Nívea Maria Vicentini, Letícia Caldas Mendonça, Rosângela Zoccal*

Expediente

Supervisão editorial *Cristiano Gomes de Farias*
Tratamento das ilustrações e editoração eletrônica
Carlos Alberto Medeiros de Moura