

# CONSERVANTES BRONOPOL E AZIDIOL: INFLUÊNCIA DO BINÔMIO TEMPO/TEMPERATURA NA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL DO LEITE CRU

MÁRCIO EDUARDO PEREIRA MARTINS,<sup>1</sup> EDMAR SOARES NICOLAU,<sup>2</sup> ALBENONES JOSÉ MESQUITA,<sup>2</sup>  
RODRIGO BALDUINO SOARES NEVES<sup>3</sup> E JAISON PEREIRA OLIVEIRA<sup>3</sup>

1. Doutorando em Ciência Animal, UFG, Saúde Pública Veterinária. E-mail: marcioeduvet@gmail.com (autor correspondente)

2. Professor doutor, Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária, UFG.

3. EV/UFG

## RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar o efeito do conservante bronopol em contraste ao azidiol na contagem bacteriana total (CBT) em amostras de leite cru submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento. Avaliaram-se quatro faixas de temperatura de armazenamento de amostras: T1 – 1,8 a 4,2 °C; T2 – 6,4 a 8,3°C; T3 – 12,1 a 14,5°C; e T4 – 24 a 25,5°C, em três grupos: Grupo 1 – controle sem conservante; Grupo 2 – azidiol líquido + corante azul de bromofenol; Grupo 3 – bronopol<sup>®</sup>. As amostras foram analisadas durante dez dias consecutivos, iniciando 24 horas após colhidas. Após análise por citometria de fluxo pelo equipamento BactoScan FC, consideraram-se amostras de leite cru de quatorze tanques de expansão divididas em dois níveis de contaminação do leite: <10<sup>5</sup> e >10<sup>6</sup> UFC/mL. Houve efeito do conservante bronopol pelo nível de contaminação do leite cru. O bronopol possui efeito bacteriostático

em amostras de leite com CBT abaixo de 10<sup>5</sup> UFC/mL e bactericida em amostras com CBT superiores a 10<sup>6</sup> UFC/mL. A CBT obtida nas amostras de leite cru conservadas com bronopol foi inferior àquela obtida nas amostras com azidiol. Ocorreu efeito do bronopol sobre a CBT pela temperatura e pelo tempo de estocagem da amostra. O efeito bactericida do bronopol<sup>®</sup> torna inviável sua utilização em amostras de leite cru destinadas à CBT. A eficiência do azidiol na amostra de leite cru destinada à CBT como agente bacteriostático foi dependente da menor temperatura de armazenamento da amostra, independente do nível de contaminação inicial. A amostra de leite cru destinada à CBT pode ser analisada em até uma semana depois de colhida, se for adicionada de azidiol e mantida sob refrigeração em temperatura entre 1°C e 4 °C.

PALAVRAS-CHAVES: Azidiol, bronopol, contagem bacteriana, leite cru, tempo, temperatura.

## ABSTRACT

### BRONOPOL AND AZIDIOL CHEMICALS: TIME AND TEMPERATURE INFLUENCE IN THE TOTAL BACTERIAL COUNT OF RAW MILK

The objective of this study was to evaluate the effect of bronopol chemical in contrast to azidiol in the total bacterial counting (TBC) in raw milk samples submitted the different temperatures of storage. Four bands of samples storage temperature had been evaluated: T1 – 1.8 the 4.2 °C; T2 – 6.4 the 8.3°C; T3 – 12.1 the 14.5°C; and T4 – 24 the 25.5°C in three groups: Group 1 – control without chemical; Group 2 – liquid azidiol added of bromofenol

blue; Group 3 – Bronopol<sup>®</sup>. The samples were analyzed during ten consecutive days, starting 24h after sampling. After analyzes by the flow citometry, have been considered raw milk samples of 14 expansion tanks that were divided in two levels of milk contamination: <10<sup>5</sup> and >10<sup>6</sup> CFU/mL. The bronopol effect was influenced by the raw milk contamination level. The Bronopol has bacteriostatic effect in milk samples with TBC below of 10<sup>5</sup> CFU/mL

and bactericidal in samples with TBC above of  $10^6$  CFU/mL. The TBC gotten in raw milk samples conserved with bronopol was lower to that one gotten in the samples with azidiol. The bronopol effect on the TBC was influenced by the temperature and by the storage time of the sample. The Bronopol® bactericidal effect becomes impracticable its use in raw milk samples destined the TBC. The azidiol efficiency

in the raw milk sample destined the CBT as bacteriostatic agent was dependent of the lesser storage temperature of the sample, independent of the initial contamination level. The raw milk sample destined the CBT can be analyzed in up to one week after harvested if the same one will be added of azidiol and kept under refrigeration in temperature between  $1^{\circ}\text{C}$  and  $4^{\circ}\text{C}$ .

KEY WORDS: Azidiol, bronopol, bacterial counting, raw milk, time, temperature.

## INTRODUÇÃO

Protocolos para contagem bacteriana por citometria de fluxo preconizavam que as amostras de leite deviam ser refrigeradas e conservadas com bacteriostáticos. Todavia, não havia um consenso sobre a melhor opção de preservar essas amostras. Amostras de leite cru destinadas à contagem celular somática e à determinação de componentes podem ser analisadas em até dez dias, se utilizados conservantes e se foram mantidas sob refrigeração (MEYER et al., 2002). Dos conservantes, o mais utilizado é o bronopol (BERTRAND et al., 1996), que possui efeito bactericida (CHEMICAL, 2004), mas cuja ação ainda não foi mensurada.

Informações referentes ao potencial de conservação do bronopol são escassas, sobretudo sob condições de refrigeração, em função do tempo e do tipo de análise, como a CBT. A metodologia de citometria de fluxo possibilitou a utilização de alguns conservantes para auxiliar na preservação da amostra, conservando-a e prolongando o tempo entre a colheita e a análise (SUHREN & WALTE, 1998).

O conservante bacteriostático mais utilizado é o azidiol (BUENO, 2004; CASSOLI et al., 2004; MARTINS, 2005). Trabalhando com contagem individual de bactérias (CIB) em amostras de leite, CASSOLI et al. (2004) constataram não haver diferença significativa entre a média da CIB do grupo-controle (sem conservante e analisado imediatamente após colheita) e a média da CIB de amostras de leite conservadas com azidiol submetidas à temperatura de  $7^{\circ}\text{C}$ , quando analisadas durante sete dias consecutivos. A média geral da CIB em amostras conservadas com azidiol e submetidas às temperaturas de  $0^{\circ}\text{C}$  e  $7^{\circ}\text{C}$  foi de  $1,13 \times$

$10^5$  bactérias/mL e  $1,53 \times 10^5$  bactérias/mL durante sete dias, respectivamente. Os autores verificaram, também, que amostras conservadas com azidiol à temperatura de  $22^{\circ}\text{C}$  tiveram CIB maior ( $P < 0,05$ ), sendo crescente ao longo do tempo.

Objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito do conservante bronopol em contraste ao azidiol na contagem bacteriana total de amostras de leite cru submetidas a diferentes temperaturas e períodos de armazenamento da amostra.

## MATERIAL E MÉTODOS

Colheram-se, em balões volumétricos esterilizados, amostras de 1.000mL de leite cru de vinte tanques de expansão, oriundas de propriedades rurais pertencentes à bacia leiteira de São Luiz dos Montes Belos, GO. Para isso, seguiram-se recomendações do Laboratório de Qualidade do Leite (LQL, 2007) da Escola de Veterinária da UFG, onde foram realizadas as análises.

Colocaram-se as amostras em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, sendo transportadas ao laboratório, onde foram fracionadas. Procedeu-se à retirada de alíquotas de 40 mL da amostra de um litro de leite, as quais foram distribuídas em frascos esterilizados. Utilizaram-se os resultados de CBT desses frascos (subamostras) na formação de grupos. Para a seleção realizada após o término geral do experimento, foram considerados os dados gerados pelas análises de CBT das amostras de leite cru de sete tanques com CBT  $< 10^5$  UFC/mL e sete tanques com CBT  $> 10^6$  UFC/mL.

Avaliaram-se quatro faixas de temperatura de armazenamento de amostras: Temp 1 – 1,8 a 4,2  $^{\circ}\text{C}$ ; Temp 2 – 6,4 a 8,3 $^{\circ}\text{C}$ ; Temp 3 – 12,1 a 14,5 $^{\circ}\text{C}$ ;

e Temp 4 – 24 a 25,5°C. em três grupos: Grupo 1 – controle sem conservante; Grupo 2 – azidiol líquido + corante azul de bromofenol; e Grupo 3 – bronopol® (Bronopol, D & F Control Systems, Dublin, USA), em dez dias consecutivos de avaliação da amostra de leite. Nos grupos de amostras adicionadas de conservantes, cada frasco recebeu um comprimido quando o agente químico foi o bronopol, e instiladas quatro gotas quando azidiol. Durante dez dias seguidos, analisou-se o leite dos 84 frascos, procedendo-se da seguinte forma: cada lote de 28 frascos representou um dos três grupos, com sete repetições cada, submetendo-os a uma das quatro faixas de temperatura. Durante dez dias consecutivos, analisou-se o mesmo frasco, que continha no primeiro dia de análise o volume de 40 mL de leite, sendo descartado após esse período, ou por motivo de coagulação da amostra.

A CBT foi realizada utilizando-se o BactoScan FC, cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo. Considerou-se um delineamento inteiramente ao acaso. Os dados obtidos foram submetidos ao Statistical Analysis System (SAS, 1990) e a comparação entre médias de tratamentos, realizada pelo teste *t* (student) para

múltiplas médias, ao nível de significância de 5% (PIMENTEL GOMES, 1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como observado na Tabela 1, para o nível de contaminação  $<10^5$  UFC/mL, houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre Grupos 1, 2 e 3. Nas amostras de leite conservadas com bronopol (Grupo 3), houve nítido efeito bacteriostático. A presença do bronopol tornou a CBT estável em relação ao grupo de amostras de leite conservadas com azidiol, durante os dez dias do experimento.

No grupo sem conservante químico (Grupo 1), houve crescimento bacteriano mesmo nas amostras de leite submetidas à temperatura de 5°C, sendo que algumas amostras coagularam, o que pode ser constatado pela redução do número de observações (Tabela 1). As amostras conservadas com bronopol não coagularam, resistindo os dez dias do experimento, independente da temperatura. Mas algumas poucas foram descartadas, pelo aumento excessivo de viscosidade.

**TABELA 1.** Efeito do tempo e da temperatura (T) sobre a CBT (em mil UFC/mL) dos grupos (G) de amostras de leite cru, com contagem bacteriana  $<10^5$ , conservadas com azidiol ou bronopol, colhidas em outubro e novembro de 2004 em Goiás.

CBT			DIA									
G	T	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	60	70a	170a	1880ab	16377b	35939c	54235d	69456de	76000e	76000e	76000e
1	2	33	108a	4840a	32332b	56420c	76000c	76000c	76000c	76000c	--	--
1	3	21	288a	21639b	66295c	76000c	--	--	--	--	--	--
1	4	7	35710	--	--	--	--	--	--	--	--	--
2	1	70	55a	57a	62a	72ab	92abc	95abc	137bcd	150cd	172d	190d
2	2	70	58	69	89	119	126	145	160	269	165	192
2	3	70	62	78	109	121	116	133	185	284	720	1236
2	4	63	121a	419a	1880a	18716b	32084c	44403d	48216d	48275d	40181cd	26182bcd
3	1	70	53	52	46	46	49	48	59	63	71	56
3	2	70	53ab	48ab	46ab	51ab	67ab	60ab	102a	95ab	38b	37b
3	3	70	50	48	53	60	47	45	51	51	47	60
3	4	67	51a	45a	80a	284b	339bc	338bc	424c	391c	394c	281b

N= 7 tanques. Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si ( $P>0,05$ ). Legenda: n = número de observações; T 1 corresponde a 1,86°C a 4,26°C; T 2 a 6,40°C a 8,33°C; T 3 a 12,10°C a 14,53°C; T 4 a 24,03°C a 25,50°C. G 1 = controle sem conservante; G 2 = conservado com azidiol; G 3 = conservado com bronopol.

O bronopol® possui largo espectro bactericida e é efetivo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esse conservante é estável em meio ácido, possui propriedades bacteriostáticas e bactericidas e tem atividade contra fungos (CHEMICAL, 2004). Amostras conservadas a 25°C, de contagem bacteriana total  $<10^5$ , apresentaram acentuado crescimento bacteriano, mas inferior ao observado nas amostras conservadas com azidiol à mesma temperatura. Fato semelhante foi observado por LEITE (2006), quando submeteu amostras de leite cru, conservadas com bronopol e armazenadas sob refrigeração durante dez dias, à contagem bacteriana em placas.

Nas amostras de leite armazenadas em temperaturas de 1,86°C a 14,53°C, o efeito do bronopol foi de bacteriostático, pois a CBT ficou estável durante dez dias, com valores muito próxi-

mos ao resultado da CBT do primeiro dia de análise (Tabela 1). CASSOLI (2005) verificou efeito semelhante nas amostras de leite cru adicionadas de bronopol e submetidas à temperatura de 0°C, 7°C e 24°C armazenadas até sete dias.

No nível de contaminação  $>10^6$  UFC/mL, a aparente ação bactericida do bronopol ocorreu desde o primeiro dia de análise e foi aumentando em função do tempo e do aumento da temperatura de armazenamento da amostra. Esse efeito do bronopol sobre a contagem bacteriana total nas amostras de leite cru, diante do tempo e da temperatura de conservação, pode ser verificado na Tabela 2. Essa redução na CBT em amostras de leite cru contendo bronopol, armazenadas sob refrigeração e analisadas por equipamento eletrônico, foi igualmente constatada por LEITE (2006).

**TABELA 2.** Efeito do tempo e da temperatura (T) sobre a CBT (em mil UFC/mL) dos grupos (G) de amostras de leite cru, com contagem bacteriana  $>10^6$ , conservadas com azidiol ou bronopol, colhidas em outubro e novembro de 2004 em Goiás

CBT			DIA									
G	T	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	46	15.304a	30034b	49153c	67084d	76000d	76000d	76000d	76000d	76000d	76000d
1	2	29	19.629a	44344b	69276c	69560c	65612cb	76000cb	--	--	--	--
1	3	17	27.252a	69850b	65827b	--	--	--	--	--	--	--
1	4	5	57.377	--	--	--	--	--	--	--	--	--
2	1	70	10.626	11351	11430	10956	10954	10693	10424	10271	9883	10626
2	2	70	11.272	11759	12388	11767	11667	11648	11950	12164	11929	12341
2	3	70	11.681	12136	12844	13290	14008	15272	16178	16538	16681	18133
2	4	58	12.721a	17118a	27829ab	37703bc	44312bcd	55659d	47908cd	47678cd	44674bcd	48922bcd
3	1	70	8.820a	7336ab	6804abc	5755abc	4809abc	4352abc	3801bc	3400bc	3169bc	2639c
3	2	70	8.654a	6912ab	6140abc	4558bcd	3804bcd	3430bcd	3158bcd	2847bcd	2552cd	1993d
3	3	70	8.158a	6700ab	5747abc	4106bcd	3376bcd	3116bcd	2748cd	2393cd	1930cd	1825d
3	4	70	6.991a	4500ab	3280bc	2741bc	2488bc	2436bc	2099bc	1709c	1466c	1485c

N= 7 tanques. Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si ( $P>0,05$ ). Legenda: n = número de observações; T 1 corresponde a 1,86°C a 4,26°C; T 2 a 6,40°C a 8,33°C; T 3 a 12,10°C a 14,53°C; T 4 corresponde a 24,03°C a 25,50°C. G 1 = controle sem conservante; G 2 = conservado com azidiol; G 3 = conservado com bronopol.

Quando da presença do bronopol no menor nível de contaminação inicial da amostra de leite (Tabela 1), a CBT ficou estável, comparativamente às amostras com azidiol, em função do tempo nas três menores faixas de temperatura. Já em temperatura ambiente, houve crescimento contínuo da

população bacteriana. Todavia, ainda na presença do bronopol, no maior nível de contaminação inicial da amostra (Tabela 2) desde o primeiro dia de análise foi observada redução da CBT em relação às mesmas amostras, e sob mesmas circunstâncias, submetidas ao azidiol. A diferença entre ação

bacteriostática e bactericida do agente químico bronopol sobre a CBT, tratando-se de crescentes níveis de contaminação inicial na amostra de leite cru, talvez possa ser explicada pelo maior desafio imposto ao agente químico em grandes populações bacterianas e/ou pela vulnerabilidade dessas bactérias diante da competição por substrato na presença desse agente químico.

De acordo com ZAGO et al. (2006), para a avaliação do efeito do conservante bronopol sobre o pH de amostras de leite para estudo da proteína instável, ocorreu a necessidade de avaliar a influência do tempo e das condições de armazenamento. No referido estudo, foi avaliado o efeito de armazenamento de três dias, no qual somente foi encontrada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para os momentos de avaliação do pH entre o dia 0 e dia 3 nas amostras mantidas em estufa ( $38^{\circ}\text{C}$ ).

O conservante bronopol é utilizado em amostras de leite destinadas à contagem de células somáticas (CCS) e interfere na viabilidade das amostras no que tange ao longo período de estocagem. MEYER et al. (2002), trabalhando com CCS, constataram que amostras de leite com bronopol refrigeradas e congeladas tiveram redução linear, respectivamente, de 0,01 e 0,006 unidades logarítmicas da CCS por dia de estocagem; em amostras estocadas em temperatura controlada e temperatura variável (temperatura ambiente e aquecidas à  $40^{\circ}\text{C}$  durante 4h/dia), redução linear de 0,069 e 0,226, respectivamente, por dia de estocagem.

Segundo ZAGO et al. (2006), mencionando KROGER (1980), o meio ideal de conservação das amostras de leite por vários dias antes da análise é a refrigeração, com a temperatura a mais próxima possível do ponto de congelamento, sem que as amostras congelem, pois previne o crescimento de bactérias e todas as mudanças físicas e químicas consequentes desse crescimento.

No nível de contaminação  $< 10^5$  UFC/mL (Tabela 1), as amostras conservadas com azidiol (Grupo 2) mostraram-se viáveis para análise até o sexto dia de armazenagem, sem comprometimento ou alteração significativa na qualidade da amostra por efeito de estocagem, quando submetidas à temperatura entre  $1,8^{\circ}\text{C}$  e  $4,2^{\circ}\text{C}$ . CASSOLI et al.

(2004) registraram fato semelhante; entretanto, suas amostras foram submetidas a  $7^{\circ}\text{C}$ . A temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  revelou-se imprópria para armazenamento do leite, pois a CBT mais que dobrou em relação à temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ .

As amostras de leite cru com nível de contaminação  $> 10^6$  UFC/mL conservadas com azidiol resistiram em função do tempo, demonstrando que o conservante possui estabilidade de ação para essa variável (Tabela 2). Todavia, o efeito bacteriostático do azidiol foi influenciado pela temperatura de estocagem da amostra de leite cru, pois se verificou crescimento bacteriano em temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Esses resultados corroboram com os de MARTINS et al. (2005), considerando indispensável a presença do azidiol na conservação da amostra de leite cru destinada à CBT. No entanto, sua melhor atuação esteve ligada à menor temperatura de acondicionamento da amostra, fato também verificado no presente estudo. Adicionalmente, segundo CASSOLI (2005), deve-se ainda evitar o congelamento das amostras de leite destinadas à CBT, pois injúrias provocadas às células bacterianas pelo congelamento-descongelamento podem causar decréscimo na CBT em função do tempo de armazenamento das amostras de leite.

Os efeitos adversos do bronopol nas amostras em diferentes níveis de contaminação do leite cru refrigerado indicam que esse conservante químico não deve ser utilizado para CBT, dada a visível possibilidade de subestimar a população bacteriana da amostra de leite (Tabelas 1 e 2). Os resultados de CASSOLI (2005) indicaram a necessidade de duas amostras: uma destinada à determinação de CCS e composição, contendo bronopol e, outra, para CBT, contendo azidiol. O autor considera que a amostra para CBT pode ser analisada em até sete dias após a coleta, desde que mantida sob refrigeração a  $7^{\circ}\text{C}$ , devendo-se evitar o aquecimento ou o congelamento da amostra para CBT, bem como garantir a adição do azidiol. Os resultados obtidos no presente estudo são muito semelhantes aos de CASSOLI (2005), no que tange ao melhor desempenho do agente conservante azidiol na amostra de leite cru destinada à CBT.

Na conservação da amostras de leite cru destinadas à CBT devem ser consideradas não

somente a refrigeração, mas também a presença do azidiol. MARTINS (2005) considera a adição do corante azul de bromofenol uma ferramenta importante para indicar a presença do azidiol na amostra de leite. Esse produto realmente facilitou a manipulação das amostras de leite e permitiu determinar com eficácia a presença do conservante químico.

## CONCLUSÕES

O efeito do conservante bronopol pode ser influenciado pelo nível de contaminação do leite cru. Trata-se de produto que possui efeito tanto bacteriostático em amostras de leite com CBT abaixo de  $10^5$  UFC/mL quanto bactericida em amostras com CBT superiores a  $10^6$  UFC/mL.

A CBT obtida nas amostras de leite cru conservadas com bronopol foi inferior àquela obtida nas amostras com azidiol. O efeito do bronopol sobre a CBT é influenciado pela temperatura e, também, pelo tempo de estocagem da amostra. O efeito bactericida do Bronopol<sup>®</sup> torna inviável sua utilização em amostras de leite cru destinadas à CBT.

A eficiência do azidiol na amostra de leite cru, destinada à CBT como agente bacteriostático, foi dependente da menor temperatura de armazenamento da amostra, independente do nível de contaminação inicial. A amostra de leite cru destinada à CBT pode ser analisada em até uma semana depois de colhida, se ela for adicionada de azidiol e mantida sob refrigeração em temperatura entre 1°C e 4°C.

## REFERÊNCIAS

- BERTRAND, J. A. Influence of shipping container, preservative and breed on analysis of milk components of shipped samples. *Journal of Dairy Science*, v. 79, n. 1, p. 145-148, 1996.
- BUENO, V. F. F. **Contagem celular somática e bacteriana total do leite cru refrigerado em tanques de expansão de uso individual no Estado de Goiás**. 2004. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2004.
- CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem individual de bactérias em amostras de leite conservadas com azidiol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1., 2004, Passo Fundo. **Anais eletrônicos...**[CD-ROM], Passo Fundo: UPF, 2004.
- CASSOLI, L. D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. 2005, 46 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- CHEMICAL LAND21. 2-BROMO-2-NITRO-1,3-PROPANEDIOL. Disponível em: <<http://www.chemicalland21.com/arokorhi/specialtychem/perchem/BRONOPOL.htm>>. Acesso em: 12 nov. 2004.
- LQL. Procedimentos de coleta de amostras para CCS, CBT e composição. Disponível em: <[http://www.cpa.vet.ufg.br/site/lql/canais/dicas.php?dica\\_id=8](http://www.cpa.vet.ufg.br/site/lql/canais/dicas.php?dica_id=8)> Acesso em: 29 nov. 2007.
- LEITE, M.O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. 2006. 62 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MARTINS, M. E. P. **Influência de diferentes conservantes e condições de armazenamento de amostras de leite cru na determinação da contagem bacteriana total**. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.
- MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A. N.; ARRUDA, M.L.T.; SANTOS, P. A.; NEVES, R. B. S. Conservação de amostras de leite cru para a determinação da contagem bacteriana por citometria de fluxo. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 22., 2005, Juiz de Fora, MG. **Anais eletrônicos...**[CD-ROM], Juiz de Fora, Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG, 2005.
- MEYER, P. M.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A.; CORASSIN, C. H.; CASSOLI, L. D.; OLIVEIRA, C. Methods of milk storage and age of sample in milk components percentage, somatic cells count and urea nitrogen. *Journal of Dairy Science*, Chapman, v. 85, suppl.1, p. 285, 2002.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990.

SAS Institute. **The SAS System for Windows**. [CD-ROM], North Carolina State University, 1990.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automation flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 50, p. 249- 275, 1998.

ZAGO, C. A.; MARTINS, T. T.; ROMA JÚNIOR, L. C.; KANASHIRO, C. Y.; RODRIGUES, A. C. O.; MACHADO, P. F. Estudo de proteína instável: efeito do conservante e do armazenamento sobre o pH de amostras de leite. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis, SC. **Anais eletrônicos ...** [CD-ROM], Florianópolis, SBPC/UFSC, 2006.

---

Protocolado em: 15 maio 2008. Aceito em: 20 nov. 2008.