

Déborah Teixeira Evangelista

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE REFERÊNCIA E ELETRÔNICO POR
CITOMETRIA DE FLUXO NA CONTAGEM BACTERIANA TOTAL (CBT) E
DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS) EM LEITE SUBMETIDO A DIFERENTES
TRATAMENTOS TÉRMICOS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Prof^ª. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2008**

E92c Evangelista, Déborah Teixeira, 1973-

Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos / Déborah Teixeira Evangelista. – 2008.

65 p.: il.

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Qualidade – Teses. 3. Leite – Bacteriologia – Teses.
4. Citometria de fluxo – Teses. I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela direção dada à minha vida. Sem Ele, nada seria possível.

À minha família pelo incentivo e compreensão em mais essa etapa de minha vida. Especialmente à minha mãe Marly e ao meu pai Francisco, minha eterna gratidão e amor pelo apoio e suporte que ofereceram durante toda a minha vida.

À minha irmã Júnia Teixeira Evangelista, pelo apoio incondicional em vários momentos, inclusive por ter me auxiliado com as imagens fotográficas.

À Professora Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira por viabilizar a execução deste trabalho. Agradeço, ainda, pela credibilidade depositada em minha pessoa assim como pela orientação, dedicação e amizade.

Aos Professores Leorges Moraes da Fonseca e Ronon Rodrigues pela oportunidade de realização desse projeto de pesquisa no LabUFMG e pelos valiosos conselhos e orientações.

Aos professores do DTIPOA-EV, em especial aos Professores Marcelo Resende de Souza, Cláudia Freire de Andrade Moraes Penna e Mônica Oliveira Leite pela orientação, auxílio, convivência e amizade.

À Professora Maria do Carmo Pimentel Batitucci pela disponibilidade, contribuição e amizade.

Aos Professores Ângela Maria Quintão Lana e Marcus Xavier, pelos ensinamentos estatísticos e sugestões.

Aos funcionários do DTIPOA-EV Maura, Miltinho, Fatinha, Valéria e Marco Antônio, pelo apoio, atenção, paciência e presteza em me ajudar.

Aos funcionários do laboratório da Itambé de Sete Lagoas/MG, em especial ao Olavo Silva, pela disponibilidade e ajuda na etapa de coleta das amostras de leite.

Ao amigo Danilo, que pacientemente me auxiliou na análise estatística dos resultados.

Aos amigos da graduação e Mestrado da Escola de Veterinária, Roane, Maria de Fátima Resende, Diogo Clinquart, Bruna, Elisa, Tadeu, Denise, Joana e Lucas pelas experiências, auxílio e companheirismo.

Em especial aos colegas da Escola de Veterinária Pedro Bueno Salgado, Andréia Kelly e Eduardo Bastianetto pela disposição em me ajudar, independente de dia, hora e lugar.

À Professora Marília Martins Melo, coordenadora do Colegiado de Pós-graduação. Às secretárias Nilda e Débora pela presteza, educação e paciência com que me receberam no Colegiado de pós-graduação da Escola de Veterinária.

Aos bibliotecários e funcionários da Biblioteca da Escola de Veterinária, Ana Lúcia Anchieta Ramirez, Eliane de Moraes, Ivonete Lima Monteiro, Leila Gusmão, Márcio Santos, Marlene

Moreira, Renata Leite, Rosilney Durães, Rosilene Figueiredo Almeida, Walkíria Oliveira, pela paciência, presteza e profissionalismo.

Aos membros componentes da Banca, Professores Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira, Leorges Moraes da Fonseca, Marcelo Resende de Souza, Maria do Carmo Pimentel Batitucci e Maria José Sena, pelas sugestões que culminaram na melhoria do trabalho.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Nelmon Oliveira da Costa, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pelos conselhos, incentivo e apoio. Muito obrigada e considere-se parte importante na realização dessa etapa de minha vida profissional.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, aqui está o fruto de um trabalho coletivo, que foi realizado com muita dedicação e carinho.

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos; é escudo para os que caminham na sinceridade,...”(Provérbios 2:6, 7).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1.INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Qualidade do leite	15
2.1.1. Composição.....	16
2.1.2. Contagem de Células Somáticas	17
2.1.3. Contagem Bacteriana Total.....	18
2.2. Tratamento térmico do leite como medida de segurança alimentar	20
2.2.1. Pasteurização.....	20
2.2.2. Esterilização	21
2.3. Viabilidade celular.....	21
2.3.1. Aspectos fisiológicos relacionados à célula bacteriana	21
2.3.2. Aspectos moleculares relacionados à célula bacteriana	24
2.3.3. Fluorocromos em estudos de viabilidade celular.....	25
2.4. Métodos de referência para contagem bacteriana total do leite.....	27
2.5. Citometria de fluxo para contagem bacteriana total do leite	28
2.6. Citometria de fluxo para contagem de células somáticas do leite.....	32
2.7. Método analítico eletrônico para determinação da composição centesimal do leite	34
2.8 Aspectos legais quanto à Contagem Bacteriana Total (CBT), Contagem de Células Somáticas (CCS) e Composição Centesimal em leite sob diferentes tratamentos térmicos....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Amostragem	37
3.2. Tratamento térmico	38
3.3. Análises realizadas	39
3.3.1. Contagem padrão em placas.....	39
3.3.2. Microscopia direta.....	39
3.3.3. Contagem bacteriana total em equipamento eletrônico.....	40
3.3.4. Contagem de células somáticas em equipamento eletrônico	40
3.3.5. Composição centesimal em equipamento eletrônico	41
3.4. Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Contagem bacteriana total	42
4.1.1. Comparação entre os métodos de referência e rápido	42
4.1.2. Efeito do tratamento térmico na contagem bacteriana total de leite cru, pasteurizado e esterilizado.....	45
4.2. Contagem de células somáticas	49
4.2.1. Comparação entre os métodos de referência e rápido	49
4.2.2. Efeito do tratamento térmico na contagem de células somáticas de leite cru, pasteurizado e esterilizado.....	51
4.3. Composição centesimal.....	52
4.4. Perspectivas de trabalho futuro	54

5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
7. ANEXOS.....	65
Anexo 1. Efeito do tratamento térmico na contagem bacteriana total de leite cru, pasteurizado e esterilizado.....	65
Anexo 2. Efeito do tratamento térmico na contagem de células somáticas de leite cru, pasteurizado e esterilizado.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aquisição alimentar domiciliar per capita anual (kg) de produtos de origem animal em Grandes Regiões do Brasil - Pesquisa de orçamentos familiares no período de 2002 e 2003.....	16
Tabela 2. Valores médios e desvios padrões dos métodos de referência (contagem padrão em placas e microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo) utilizados na contagem bacteriana de leite.....	42
Tabela 3. Valores médios e desvios padrões da contagem bacteriana de leite cru, pasteurizado e esterilizado, realizada por métodos de referência (contagem padrão em placas e microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo).....	46
Tabela 4. Valores médios e desvios padrões dos métodos de referência (microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo), utilizados na contagem de células somáticas de leite cru, pasteurizado e pasteurizado.....	50
Tabela 5. Valores médios e desvios padrões da contagem de células somáticas de leite cru, pasteurizado e esterilizado, realizada por métodos de referência (microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo).....	52
Tabela 6. Valores médios e desvios padrões dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais de leite cru, pasteurizado e esterilizado, analisados em equipamento eletrônico (espectrômetro de infravermelho).....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Geração de uma “força motiva próton”.....	22
Figura 2. Desenho esquemático da estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA)	24
Figura 3. Ação do corante brometo de etídio na fita dupla do DNA bacteriano.....	26
Figura 4. Foto do equipamento eletrônico IBC Bactocount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem bacteriana total em amostras de leite	30

Figura 5. Foto do equipamento eletrônico Somacount 300 da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem de células somáticas em amostras de leite.....33

Figura 6. Desenho esquemático do procedimento de amostragem do leite para realização dos procedimentos analíticos.....38

Figura 7. Imagem de fotografia de microscopia direta de células bacterianas coradas por azul de metileno 0,6% (ampliação microscópica de 100 X).....44

Figura 8. Imagem de fotografia de microscopia direta de células somáticas coradas por azul de metileno 0,6% (ampliação microscópica de 100 X).....51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação da funcionalidade celular baseada na atividade metabólica da célula.....23

Quadro 2. Requisitos microbiológicos, físicos, químicos, de CCS, de resíduos químicos a serem avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite.....36

Quadro 3. Características físicas, químicas e microbiológicas do leite pasteurizado..... 37

Quadro 4. Características físicas, químicas e microbiológicas do leite UAT (UHT).....37

LISTA DE ABREVIações

APHA – American Public Health Association
ATP – adenosina tri-fosfato
BE – brometo de etídeo
BOX ou BIS-OXONOL – ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico)
CBI – Contagem Bacteriana Individual
CBT – Contagem Bacteriana Total
CCS – Contagem de Células Somáticas
CPP – Contagem Padrão em Placas
DIO – corante do grupo das carbocianinas
DIOC6 (3) – “3,3 – dihexyloxacarbocyanine iodide”
DNA – ácido desoxirribonucléico
ESD – Extrato Seco Desengordurado
EST – Extrato Seco Total
FIR – “Far infra-red”
FM – Fator Microscópico
GFP – “green fluorescent protein”
HTST – “High Temperature Long Time”
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF – International Dairy Federation
IP – iodeto de propídio
IPTG – tiogalactopiranosídeo de isopropila
LabUFMG – Laboratório de Análise de Qualidade do Leite da Universidade Federal de Minas Gerais
LTLT – “Low Temperature Long Time”
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIR – “Mid infra-red”
NIR – “Near infra-red”
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PNMQL – Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
POF – Pesquisa de Orçamento Familiar
RBS – fluido carreador usado em citometria de fluxo
RBQL – Rede Brasileira de Laboratórios de Análise de Qualidade do Leite
RNA – Ácido ribonucléico
RTIQ – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SYTO-BC – Corante usado em citometria de fluxo para diferenciação de bactérias
SYTO 9 - Corante usado em citometria de fluxo para diferenciação de bactérias
UAT – Ultra Alta Temperatura
UFC/mL – Unidades formadoras de colônias por mililitro
UHT – “Ultra High Temperature”

RESUMO

Atualmente, o setor laticinista brasileiro passa por um período de intensas transformações em sua estrutura, e a qualidade do leite é uma das principais exigências. A rede laboratorial utiliza métodos analíticos de referência ou rápidos para a análise de parâmetros relacionados à qualidade: composição, contagem bacteriana, contagem de células somáticas, pesquisa de resíduos de antimicrobianos. No entanto, considerando-se a morosidade e as limitações de alguns dos métodos de referência e ainda, a crescente demanda por análises de grande número de amostras de leite, a rede laboratorial vem utilizando métodos alternativos que forneçam resultados rápidos e confiáveis. Para a contagem bacteriana total e contagem de células somáticas, o método analítico rápido baseia-se no princípio da citometria de fluxo. O objetivo desse trabalho foi aprofundar os conhecimentos sobre o princípio da citometria de fluxo assim como verificar a correlação entre os métodos analíticos de referência (contagem padrão em placas e microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo) para a contagem bacteriana total e de células somáticas em leite cru, pasteurizado e esterilizado. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso e os resultados foram comparados utilizando-se o teste de Tukey. Nas condições de trabalho, verificou-se que a técnica de microscopia direta apresentou alta correlação com a contagem padrão em placas, podendo ser uma técnica alternativa na calibração do equipamento IBC Bactocount para análise de amostras de leite cru por citometria de fluxo. A citometria de fluxo, comparada com as técnicas de referência, foi capaz de detectar maior contagem bacteriana em leite cru, pasteurizado e esterilizado. Os tratamentos térmicos exerceram diferentes efeitos nas contagens bacterianas de amostras de leite submetidas à pasteurização e esterilização quando as técnicas de contagem padrão em placas, microscopia direta e citometria de fluxo foram utilizadas. Em relação à contagem de células somáticas, verificou-se que a técnica de microscopia direta apresenta alta correlação com a técnica de citometria de fluxo. Os tratamentos térmicos não exerceram efeitos na contagem de células somáticas de leite submetido à pasteurização e esterilização, quando a citometria de fluxo foi utilizada.

Palavras-Chave: leite cru, leite pasteurizado, leite esterilizado, contagem bacteriana total, contagem de células somáticas, citometria de fluxo, contagem padrão em placas, microscopia direta, viabilidade celular.

ABSTRACT

Nowadays, Brazilian dairy sector is facing a period of significant changes in which milk quality is one the main requirements. The official lab net applies either reference or rapid analytical methods in order to research parameters related to milk quality, such as: composition, bacterial count, somatic cell count, and presence of antimicrobial residues. However, considering that some reference methods are long-lasting and show restrictions coupled with the demand to proceed the analysis of a great number of samples, the official lab net has applied alternative approaches, whose results are reliable and obtained in a shorter period of time. The rapid analytical method is based on flux citometry to determine the counts of total bacteria and somatic cells. The present work aimed to deeply study the flux citometry principle as well as verify the correlation between the reference methods (standard plate count and direct microscopy) and the rapid approach (flux citometry) applied to counts of bacteria and somatic cells in raw, pasteurized, and sterilized milks. Randomized blocks design was used and the results were compared according to the test of Tukey. In the work conditions, results from direct microscopy showed a high correlation with those from standard plate count, so that it may be an alternative mean to calibrate the IBC Bactocount equipment to the analysis of raw milk samples by flux citometry. Compared to the other reference methods, flux citometry was able to detect higher bacterial count in raw, pasteurized, and sterilized milks. Thermal treatments caused different influence on the bacterial counts when results of standard plate count, direct microscopy, and flux citometry were evaluated. Regarding the somatic cell count, direct microscopy showed a high correlation with flux citometry. The thermal treatments did not influence the somatic cell count of both pasteurized and sterilized milk samples, when flux citometry was applied.

Keywords: raw milk, pasteurized milk, sterilized milk, total bacterial count, somatic cell count, flux citometry, standard plate count, direct microscopy, cell viability.

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado o mais nobre dos alimentos, dada a sua composição peculiar, rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Ele constitui o alimento essencial dos recém-nascidos, para todas as espécies de mamíferos. O seu consumo está indicado para todas as idades para a espécie humana e as restrições ao seu uso são limitadas a casos específicos (Oliveira *et al.*, 1999).

Do ponto de vista de saúde pública, o leite ocupa lugar de destaque na nutrição humana. Contudo, ao lado de sua indiscutível qualidade intrínseca, há o permanente risco desse produto veicular microrganismos patogênicos ou ser “alvo” de fraudes durante o processamento. Em ambas as circunstâncias, o produto passa a ser prejudicial para a saúde do consumidor.

Para a obtenção de leite com composição normal e com menor risco de transmissão de doenças para o homem, é fundamental a realização de procedimentos como a produção higiênica, o controle sanitário, o correto manejo de ordenha, além da limpeza e desinfecção adequadas de equipamentos e utensílios e da refrigeração.

No caso específico do leite, um dos aspectos que desperta preocupação entre os diversos setores do país é a baixa qualidade microbiológica da matéria-prima. O leite, sob condições microbiológicas insatisfatórias, constitui prejuízos para o produtor, indústria e consumidor. Para a indústria, estes prejuízos são representados, principalmente, pelo menor rendimento e pela oferta de derivados de baixa qualidade e vida útil. Para o consumidor, destacam-se a aquisição de produtos de baixa qualidade e durabilidade assim como a ocorrência de infecções e intoxicações associadas ao consumo do leite.

Segundo Gonçalo (2002), dependendo do grau de contaminação, os microrganismos podem acarretar sérios riscos à saúde dos consumidores, caso os fatores que constituem as etapas de processo de fabricação não sejam controlados.

Portanto, a qualidade microbiológica do leite cru constitui um critério importante no processamento de leite e derivados. Alguns problemas tecnológicos observados em leite fluido e em derivados lácteos fabricados com leite tratado termicamente relacionam-se à baixa qualidade microbiológica da matéria-prima captada pelas indústrias (Rombaut *et al.*, 2002).

Ressalta-se que o crescimento microbiano depende de vários fatores, tais como: nutrientes, atividade de água, pH, presença de conservantes, microrganismos competidores, gás atmosférico, potencial redox, temperatura e tempo de armazenamento. O controle dessas condições pode ser usado para limitar, reduzir ou prevenir o crescimento microbiano, conforme Heggum (2001).

Há de se enfatizar que a realização de análises laboratoriais por empresas do setor laticinista, destacando-se as provas físico-químicas e microbiológicas, possibilitam a identificação de amostras de leite que não estão em conformidade com a legislação nacional vigente.

Considerando-se as intensas transformações na estrutura da indústria laticinista mundial, identificam-se, como principais tendências, a diferenciação do pagamento ao produtor e o aumento nas exigências de qualidade do leite por parte das indústrias. Parâmetros físico-químicos, microbiológicos e higiênico-sanitários são utilizados pelas indústrias para verificação da qualidade do leite, como por exemplo, a contagem de células somáticas, a contagem bacteriana e a pesquisa de resíduos de antimicrobianos, que estão sendo cada vez mais exigidos

como parâmetros de qualidade (Guerreiro *et al.*, 2005).

No aspecto de segurança alimentar, há de se destacar que vários países têm desenvolvido e introduzido novas legislações para garantia dessa segurança em diferentes elos da cadeia produtiva de alimentos. A maioria dessas legislações estabelece que, para alcançar a segurança alimentar, deve ser focado não apenas a produção de um alimento num único elo, mas assegurar que outros elos da cadeia produtiva relacionados com esse sejam contemplados (Valeeva *et al.*, 2005).

No tocante ao Brasil, enfatizam-se as ações desenvolvidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que, por meio da publicação da Instrução Normativa nº 51, aperfeiçoou e modernizou os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade dos Leites tipos A, B e C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel (Brasil, 2002).

Assim, um dos fatos mais importantes para o setor laticinista nos últimos anos foi a publicação da Instrução Normativa nº 51/02, que determina novas variáveis de avaliação da qualidade do leite cru refrigerado. De acordo com essa legislação, análises de composição (teores de gordura, proteína e sólidos totais), contagem bacteriana total (CBT), contagem de células somáticas (CCS) e resíduos de drogas veterinárias de todo leite cru produzido no país e processado em estabelecimentos sob fiscalização federal, deverão ser realizadas mensalmente em um dos laboratórios credenciados pelo MAPA.

Visando atender à demanda por essas análises, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento criou a Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL), composta atualmente por oito laboratórios

centralizados que possuem equipamentos automatizados de última geração e de alto rendimento analítico.

Ressalta-se, no entanto, que para a realização das análises previstas na Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002), vários métodos analíticos podem ser utilizados em cada uma das determinações exigidas. Atualmente, esses métodos são comumente divididos em métodos “convencionais” ou “de referência” e métodos “rápidos”, sendo vários destes regulamentados por legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003).

Os métodos de referência recebem essa denominação porque foram desenvolvidos há muitos anos e, desde então, vêm sendo empregados como métodos oficiais na maioria dos laboratórios do país e também em outros países. Esses métodos estão descritos em publicações consideradas de referência, aceitas internacionalmente. Os métodos rápidos surgiram a partir do século XX, como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos e melhorar a produtividade laboratorial. Além desses objetivos, esses métodos também visam a simplificação de trabalho e a redução de custos (Cimiano, 1974; Franco e Landgraf, 1996).

Em relação aos métodos de referência, salienta-se que, para a determinação da contagem bacteriana total em leite, publicações de referência preconizam a adoção do método de contagem padrão em placas (International..., 1991a; Marshall, 1992). Alternativamente, pode-se adotar a técnica da microscopia direta, uma versão adaptada de Prescott e Breed pela International Dairy Federation (International..., 1991b). No caso da contagem de células somáticas em leite, a microscopia direta é o método padrão (International..., 1991c; Marshall, 1992). Para a análise de composição do leite, os métodos

de referência estão descritos em International... (1987a); International... (1987b); International... (1993); International... (1996); Harvey (1988), conforme Silveira (2002).

Os métodos analíticos rápidos para contagem bacteriana total e de células somáticas em leite baseiam-se no princípio da citometria de fluxo em equipamentos eletrônicos. Esta técnica consiste na adição de corante fluorescente ao leite, para que o DNA e o RNA de células sejam corados. Ao receber um feixe de *laser*, cada célula emite fluorescência, a qual é captada pelo sistema óptico e, com isso, o número de células é determinado (Suhren e Walte, 2000; Barrientos *et al.*, 2000; Broutin, 2004; Cassoli *et al.*, 2007).

Embora não seja objeto do presente trabalho, destaca-se o crescente uso de equipamentos eletrônicos para análise de componentes do leite. A análise do leite por meio de equipamentos de infravermelho é prática, possibilitando avaliar um grande número de amostras em curto tempo. O princípio fundamental de todos os analisadores de infravermelho baseia-se na capacidade de absorção de radiação infravermelha, em diferentes comprimentos de ondas, dos grupos químicos específicos de alguns componentes do leite como gordura, proteína e lactose (Wolfschoon, 1977; Biggs *et al.*, 1987; Ginn e Packard, 1989).

Para a realização das análises laboratoriais, vale destacar a necessidade de uso de conservantes para preservar amostras de leite cru no Brasil, em razão das grandes distâncias existentes entre as fazendas produtoras e os laboratórios de análise. A adição do conservante bronopol às amostras destinadas à contagem de células somáticas e análise de composição do leite em equipamento eletrônico Bentley Comb System 2300® é recomendada desde a coleta. O bronopol é constituído de bromo-

2-nitro-1,3-propanodiol, natamicina e indicador de pH (Kroger, 1985; Bertrand, 1996). Nas amostras destinadas à contagem bacteriana total, o azidiol tem sido usado com sucesso na conservação de amostras de leite cru refrigerado. O azidiol é composto de azida sódica, cloranfenicol, etanol, citrato de sódio e azul de bromofenol. A adição do conservante é feita, em geral, no momento da coleta das amostras na propriedade rural, sendo recomendada 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).

Considerando a crescente exigência das indústrias por uma matéria-prima de melhor qualidade e preocupação dos consumidores pela aquisição de produtos seguros, os objetivos deste trabalho foram: aprofundar os conhecimentos sobre o princípio da citometria de fluxo, comparar os métodos analíticos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total e de células somáticas em leite cru, pasteurizado e esterilizado e verificar os efeitos dos tratamentos térmicos de pasteurização lenta e esterilização sobre a contagem bacteriana total e de células somáticas em amostras de leite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Qualidade do leite

A melhoria no setor leiteiro envolve a qualidade do leite e caracteriza-se pela obtenção de uma matéria-prima de qualidade e de um produto processado seguro e saudável na mesa do consumidor (Gigante, 2004; Fonseca, 2005; Guerreiro *et al.*, 2005).

Os principais elementos que definem a qualidade do leite são: a composição (gordura, proteína, lactose), a contagem de células somáticas, a contagem bacteriana, a

ausência de adulterantes (água, resíduos de antimicrobianos, substâncias químicas e outros), a qualidade sensorial (odor, sabor, aspecto) e a temperatura (Monardes, 1998; Brasil, 2002).

A qualidade do leite cru é influenciada por múltiplos fatores, entre os quais se destacam os zootécnicos, os associados ao manejo, saúde da glândula mamária, alimentação e potencial genético dos rebanhos, e outros relacionados à obtenção e armazenamento do leite recém-ordenhado (Guerreiro *et al.*, 2005).

Segundo Oliveira *et al.* (1999), os fatores zootécnicos, os associados ao manejo, à saúde da glândula mamária, à alimentação e ao potencial genético dos rebanhos são responsáveis pelas características de composição do leite e, também, pela produtividade do rebanho. A obtenção e o armazenamento do leite *in natura*, por outro lado, relacionam-se com a qualidade microbiológica do produto, inclusive determinando o seu prazo de vida útil.

2.1.1. Composição

O leite é uma emulsão estável de glóbulos de gordura e uma suspensão coloidal de micelas de caseína (Monardes, 1998). A lactose, as proteínas do soro, a maior parte dos minerais e vitaminas hidrossolúveis encontram-se dissolvidos na água formando uma solução (Brito e Brito, 1998; Monardes, 1998). O leite contém aproximadamente 87,4% de água e 12,6% de sólidos totais. Do total de sólidos, 3,9% correspondem à gordura, 3,2% à proteína, 4,6% à lactose e 0,90% aos minerais e vitaminas (Harding, 1995). Assim, o leite é um produto complexo e completo, sendo considerado como uma das fontes melhores de nutrientes para os seres humanos (Silveira, 2002).

No que se refere ao consumo de alimentos *per capita*/ano no Brasil, o leite aparece como o produto de origem animal mais consumido, dada a sua composição peculiar rica em nutrientes. O relatório de Pesquisa de Orçamento Familiar (IBGE/POF, 2002/2003) relaciona a participação dos principais produtos de origem animal na dieta da população brasileira nos anos 2002 e 2003, conforme mencionado na Tabela 1 (Instituto..., 2003).

Tabela 1. Aquisição alimentar domiciliar per capita anual (kg) de produtos de origem animal em Grandes Regiões do Brasil - Pesquisa de orçamentos familiares no período de 2002 e 2003

Produtos	Aquisição alimentar domiciliar per capita anual (kg)					
	Brasil	Grandes Regiões				
		Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste
Carnes	25,237	30,277	21,637	23,653	34,754	23,628
Aves e ovos	15,577	19,383	14,419	13,571	22,086	14,487
Laticínios	49,906	24,388	29,092	59,784	70,870	57,078

Fonte: Instituto... (2003).

O leite apresenta uma variação normal de composição, que pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles: genéticos (variação individual, diferenças entre espécies e dentro da mesma espécie, raça), fisiológicos (idade, estágio e número de

lactações) e ambientais (clima, estação do ano, número e intervalo entre ordenhas, porção da ordenha, manejo nutricional) (Biggs *et al.*, 1987; Auldist *et al.*, 1998; Lindmark-Mansson *et al.*, 2003; Fonseca, 2005).

O componente do leite que apresenta maior variabilidade é a gordura. Esta variação pode ser observada, inclusive, entre vacas da mesma raça que recebem alimentação distinta. Neste particular, o fator que mais interfere no percentual de gordura do leite é o teor de fibra da dieta ou a relação volumoso/concentrado. Assim, quanto maior o teor de fibra da dieta, maior o teor de gordura do leite. O percentual de extrato seco desengordurado (ESD) também pode variar em função do tipo de alimentação fornecida aos animais; porém, o nível de variação é muito menor do que o observado em relação ao teor de gordura (Oliveira *et al.*, 1999). Segundo Burchard e Block (1998), a porcentagem de gordura do leite é fortemente influenciada por fatores genéticos e ambientais, dentre eles, destaca-se o manejo nutricional.

Segundo Reis *et al.* (2004), embora a composição do leite esteja ligada ao genótipo e ao fenótipo do animal, esta pode ser manipulada por meio do balanceamento de dietas de vacas leiteiras, chegando a influenciar no teor de gordura e de proteínas.

O conteúdo de lactose no leite normal é relativamente constante, entre 4,8 e 5,2% de lactose monohidratada. O leite proveniente de vacas infectadas por microrganismos causadores de mastite e o colostro apresentam baixos teores de lactose para compensar os elevados níveis de minerais e manter o balanço osmótico (Kitchen, 1981; Goff e Hill, 1993).

O leite também é uma excelente fonte de vitaminas e sais minerais. Entre os sais minerais destacam-se: os bicarbonatos, os cloretos e os citratos de cálcio, magnésio, potássio e sódio. Entre as vitaminas, enfatizam-se as lipossolúveis (A, D, E e K) e as hidrossolúveis (vitaminas do complexo B, C e biotina) (Varnam e Sutherland, 1994).

No entanto, a disponibilidade de nutrientes no leite, sua alta atividade de água e seu pH próximo da neutralidade o tornam um meio extremamente favorável ao crescimento microbiano (Souza *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2006).

2.1.2. Contagem de Células Somáticas

As células somáticas compreendem células brancas ou leucócitos, presentes no leite em resposta a danos do tecido, além de células epiteliais de descamação, resultado de um processo natural de reposição de células velhas dentro da glândula mamária, ou ainda, de lesão física (Harmon, 1998; Fonseca e Santos, 2000; Machado *et al.*, 2000a; Machado *et al.*, 2000b; Prada e Silva *et al.*, 2000; Bascunán, 2004; Fonseca, 2005; Leite, 2006; Noro *et al.*, 2006). A contagem de células somáticas (CCS) tem sido considerada como um dos indicadores mais importantes do estado sanitário da glândula mamária em rebanhos leiteiros (Harmon, 1998; Philpot, 1998; Machado *et al.*, 2000b; Tsenkova *et al.*, 2001; Gigante, 2004; Paula *et al.*, 2004).

A mastite, inflamação da glândula mamária, caracteriza-se por causar alterações significativas na composição do leite, aumento na concentração de células somáticas e redução na produção (Harmon, 1998; Philpot, 1998; Oliveira *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2000a; Bascunán, 2004; Gigante, 2004; Paula *et al.*, 2004; Fonseca, 2005; Leite, 2006). Para os produtores, essa redução na produção significa menor retorno financeiro. Para as indústrias, a ocorrência de tais alterações significa numerosos problemas no processamento, diminuição do rendimento, da qualidade e da estabilidade dos produtos lácteos (Philpot, 1998; Oliveira *et al.*, 1999; Tsenkova *et al.*, 2001; Hamann, 2002; Philpot e Nickerson, 2002; Paula *et al.*, 2004; Gigante, 2004). Além de causar prejuízos econômicos para produtores de leite e indústrias de laticínios, os

microrganismos envolvidos na etiologia da mastite podem estar associados à ocorrência de doenças no homem, como intoxicação estafilocócica, listeriose, campilobacteriose, dentre outras (Philpot e Nickerson, 2002).

Assim, como resultado de uma resposta inflamatória da glândula mamária proveniente de trauma ou lesão do úbere, irritação química ou, sobretudo, infecção causada por microrganismos, especialmente os de origem bacteriana (Philpot e Nickerson, 2002), mudanças intensas são observadas nas concentrações tanto dos principais componentes do leite como proteína, gordura e lactose, quanto dos componentes encontrados em menores concentrações, como minerais (Kitchen, 1981; Pereira *et al.*, 1999; Gigante, 2004). Pesquisas demonstram que os animais acometidos de mastite clínica, ou mesmo subclínica, apresentam uma diminuição nos percentuais de gordura e de extrato seco desengordurado (ESD), redução nos teores de lactose e, em alguns casos, de proteína. O leite apresenta menor teor de caseína, que é a proteína presente em maior quantidade, acompanhado do aumento dos níveis de proteínas séricas, como soroalbuminas e imunoglobulinas (Oliveira *et al.*, 1999; Tsenkova *et al.*, 2001; Gigante, 2004; Fonseca, 2005). A diminuição nas concentrações de lactose e caseína pode ser resultado da redução de síntese da célula secretora (Pereira *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2000b; Prada e Silva *et al.*, 2000). Outras pesquisas relatam que o aumento da contagem de células somáticas no leite pode refletir em aumento nos teores de proteína e gordura e redução nos de lactose e sólidos totais (Pereira *et al.*, 1999; Prada e Silva *et al.*, 2000; Silveira, 2002). Machado *et al.* (2000b), Lamaita (2003) e Bueno *et al.* (2004b) observaram que as amostras de leite de conjunto com altas CCS apresentaram teores mais elevados de gordura e redução nos teores de proteína e lactose, permanecendo inalterados os teores de sólidos totais. O aumento na

concentração de gordura, provavelmente, pode ser explicado pelo fato de a redução da produção de leite, devido à ocorrência de infecção da glândula mamária, ter sido mais acentuada que a produção de gordura.

A ocorrência de mastite pode afetar, também, a qualidade microbiológica do leite. *Streptococcus agalactiae*, importante patógeno causador de mastite contagiosa, pode levar ao aumento na contagem bacteriana total do leite do tanque. Além disso, outras bactérias causadoras de mastite, tais como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, podem produzir toxinas termooestáveis, o que representa um risco considerável à saúde humana (Harmon, 1998; Philpot, 1998; Oliveira *et al.*, 1999).

Principais patógenos causadores da mastite, tais como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, causam alterações no processo de síntese do leite dentro da glândula mamária, podendo afetar a sua qualidade (Fonseca e Santos, 2000). Como sua disseminação no rebanho ocorre, principalmente, durante a ordenha, pelas mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha, a adoção de procedimentos higiênicos nessa fase é essencial para o controle efetivo da mastite e para reduzir o número de microrganismos no leite (Souza *et al.*, 2005; Leite, 2006).

2.1.3. Contagem Bacteriana Total

Em condições normais, o leite é estéril ao ser secretado nos alvéolos do úbere (International..., 1980). Contudo, ao ser ordenhado, o leite pode se contaminar por um pequeno e bem definido número de microrganismos, provenientes dos canais lactíferos, da cisterna da glândula e canal do teto (Fonseca e Santos, 2000). No caso de ordenha higiênica e de animais sadios, a contagem bacteriana é baixa, podendo variar de 500 a 1000 UFC/mL (Frazier e Westhoff, 1978). Entretanto, em condições inadequadas da saúde da glândula mamária,

do sistema de manejo e das condições de higiene adotadas na fazenda, este número pode se elevar até vários milhares (Fonseca e Santos, 2000; Murphy e Boor, 2000; Edmondson, 2002; Holm *et al.*, 2004).

Assim, depois de secretado no úbere, o leite pode ser contaminado por microrganismos na glândula mamária ou a partir da superfície do úbere e tetos, de equipamentos e utensílios de ordenha mal higienizados. Quando o leite é coletado e armazenado em tanques de expansão, a temperatura, o tempo de armazenamento e o transporte são fatores importantes para a qualidade, uma vez que estão diretamente relacionados com a multiplicação dos microrganismos presentes, afetando, conseqüentemente, a contagem bacteriana total (Lamaita, 2003; Bueno *et al.*, 2004b; Gigante, 2004; Holm *et al.*, 2004; Guerreiro *et al.*, 2005).

Dos microrganismos que, geralmente, ocorrem em leite proveniente de tanques de expansão, *Bacillus* spp., coliformes, corineformes, *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e leveduras são, principalmente, relacionados com limpeza inadequada do úbere, do equipamento de ordenha e dos tanques de armazenamento. Entre os microrganismos associados, principalmente, com higiene inadequada, destacam-se as bactérias que crescem em baixas temperaturas (*Pseudomonas fluorescences*) (Silva *et al.*, 2000; Holm *et al.*, 2004; Pinto *et al.*, 2006). No caso de leite proveniente de vacas com mastite, é freqüente a ocorrência de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Harmon, 1998; Lamaita, 2003; Holm *et al.*, 2004).

A qualidade microbiológica do leite influencia o processamento tecnológico e tem problema em relação à saúde pública. Tecnicamente, diversos prejuízos devido à alta carga microbiana têm sido enumerados. Entre eles, destacam-se os

problemas com acidificação e coagulação, geleificação, sabor amargo, coagulação sem acidificação, aumento de viscosidade, alteração de cor, produção de sabores e odores variados, entre outros. Estas alterações causam redução da vida de prateleira e diminuição do rendimento industrial (Gigante, 2004). Além dos problemas de qualidade nas indústrias, as condições inadequadas de manejo na ordenha, no armazenamento e no transporte do leite podem acarretar risco à saúde pública, devido à ação de bactérias patogênicas, especialmente quando o leite é consumido cru. Entre as principais bactérias patogênicas que podem ser veiculadas pelo leite, citam-se: *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Brucella* spp., *Mycobacterium*, entre outras (Brito, 1999).

Assim, a presença de bactérias patogênicas no leite cru é uma preocupação de saúde pública, sendo um risco potencial para quem o consome diretamente ou na forma de seus derivados, e até para quem o manuseia. O leite cru contaminado pode ser ainda, fonte de contaminação cruzada para os produtos lácteos processados, pela contaminação do ambiente na indústria (Cerqueira *et al.*, 1994; Arcuri *et al.*, 2006).

Segundo Bueno *et al.* (2004a), pesquisas desenvolvidas no Brasil demonstram, de modo geral, que o leite vem sendo obtido em más condições higiênico-sanitárias, revelando altas contagens microbianas, constituindo-se em risco à saúde pública, principalmente quando consumido cru, sem o devido tratamento térmico. Elevado número de amostras fora dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação (Brasil, 2002) tem sido descrito (Souza *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2000; Lamaita, 2003; Picinin, 2003; Bueno *et al.*, 2004a; Fonseca, 2005; Nero *et al.*, 2005; Arcuri *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2006).

2.2. Tratamento térmico do leite como medida de segurança alimentar

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que influencia o crescimento e a sobrevivência de microrganismos. À medida que a temperatura aumenta, dentro de certa faixa, reações químicas e enzimáticas ocorrem na célula em níveis mais rápidos e, conseqüentemente, o crescimento torna-se mais rápido. No entanto, acima de certa temperatura, proteínas, ácidos nucléicos e outros componentes celulares podem ser irreversivelmente desnaturados e enzimas necessárias ao metabolismo microbiano podem ser inativadas. Dessa forma, o controle do crescimento microbiano pelo emprego de altas temperaturas pode resultar na destruição de microrganismos ou na inibição de seu crescimento (Brock *et al.*, 1994; Jay, 1994; Franco e Landgraf, 1996).

Segundo Brock *et al.* (1994) e Jay (1994), os efeitos da temperatura sobre a viabilidade celular são marcantes. Assim que a temperatura se eleva e ultrapassa a temperatura máxima de crescimento, efeitos letais tornam-se evidentes. A morte pelo calor é uma função exponencial ou de primeira-ordem e ocorre mais rapidamente assim que a temperatura é elevada. A relação de primeira-ordem significa que a faixa de morte é proporcional, em um dado momento, apenas à concentração de microrganismos naquele dado momento e o tempo necessário para uma fração definida de células serem mortas é independente da concentração inicial. Portanto, torna-se necessário selecionar o tempo e a temperatura para tratamento térmico, sob dadas condições.

O tratamento térmico necessário para destruir os microrganismos varia com o tipo de microrganismo, a forma em que o microrganismo se encontra e o ambiente durante o tratamento (Jay, 1994; Franco e Landgraf, 1996). Entre os tratamentos

térmicos mais empregados pelas indústrias de laticínios, destacam-se a pasteurização e a esterilização.

2.2.1. Pasteurização

A pasteurização é amplamente usada pela indústria de alimentos e de produtos lácteos para minimizar os riscos de veiculação de microrganismos patogênicos, assim como para prolongar a vida de prateleira dos produtos. Trata-se de um processo que utiliza um binômio tempo/temperatura adequado para reduzir populações microbianas no leite, assim como em outros alimentos que são, excepcionalmente, sensíveis ao calor. Mas, nesse processo, nem todos os microrganismos são eliminados (Brock *et al.*, 1994; Gunasekera *et al.*, 2002).

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1952), artigo 517, entende-se por pasteurização o emprego conveniente do calor, com o fim de destruir totalmente a microbiota patogênica, sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio do leite, sem prejuízo dos seus elementos bioquímicos, assim como de suas propriedades organolépticas normais. No Brasil, permitem-se os seguintes tipos de pasteurização: pasteurização lenta (em inglês - *low temperature long time* – LTLT), que consiste no aquecimento do leite a 62 – 65°C (sessenta e dois a sessenta e cinco graus Celsius) por 30 (trinta) minutos, mantendo-se o leite em grande volume sob agitação mecânica, lenta, em aparelhagem própria; e pasteurização de curta duração ou pasteurização rápida (em inglês - *high temperature short time* – HTST), que consiste no aquecimento do leite em camada laminar a 72 – 75°C (setenta e dois a setenta e cinco graus Celsius) por 15 a 20 (quinze a vinte) segundos, em aparelhagem própria. Imediatamente após o aquecimento, o leite

é refrigerado entre 2 - 5° C (dois a cinco graus Celsius) e, em seguida, envasado.

Segundo Brock *et al.* (1994) e Franco e Landgraf (1996), a pasteurização rápida ocasiona menos alteração no sabor, destrói mais eficientemente os microrganismos resistentes ao calor e pode ser conduzida sob fluxo contínuo, tornando-a adaptável para várias operações na indústria de laticínios.

Originalmente, a pasteurização do leite foi introduzida como medida de saúde pública a fim de destruir bactérias patogênicas, especialmente os microrganismos causadores de tuberculose, brucelose, febre Q e febre tifóide (Brock *et al.*, 1994), assim como para eliminar ou reduzir as atividades de microrganismos esporulados. *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. são os microrganismos mais resistentes à pasteurização como consequência de suas habilidades em formar esporos. Esse tratamento é suficiente para destruir, inclusive, os microrganismos de maior resistência térmica como *Mycobacterium* spp. e *Coxiella burnetti*, além de todas as leveduras, bolores, bactérias Gram-negativo e muitas Gram-positivo. Os microrganismos sobreviventes são os termófilos e os termodúricos (Franco e Landgraf, 1996).

2.2.2. Esterilização

A destruição de todas as células viáveis, que podem ser enumeradas pelos métodos usuais de cultivo, é conhecida como esterilização e obtida pelo uso do calor, radiação ou produtos químicos. A esterilização pelo calor requer, usualmente, tratamento térmico sob pressão de vapor de 1,1 kg/cm², o que resulta em uma temperatura de 121° C. O tratamento térmico, geralmente, pode ser feito em uma autoclave, um instrumento lacrado que permite a entrada de vapor sob pressão. À temperatura de 121°C, o tempo necessário

para a esterilização em autoclave geralmente é de 10 a 15 minutos (Brock *et al.*, 1994).

Na “esterilização comercial”, quando aplicada ao leite, utiliza-se a temperatura de 140 – 150° C por poucos segundos. Esse processo denomina-se UHT (em inglês, *Ultra High Temperature*), sendo o processo contínuo, necessitando de condições assépticas durante a etapa de envase (Franco e Landgraf, 1996).

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1952), artigo 519, entende-se por leite UHT ou UAT (ultra-alta temperatura), o leite homogeneizado submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130 – 150° C, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32° C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

Para entender o comportamento de uma célula bacteriana frente aos vários tratamentos térmicos, torna-se necessária a compreensão dos mecanismos fisiológicos e moleculares relacionados à viabilidade celular.

2.3. Viabilidade celular

2.3.1. Aspectos fisiológicos relacionados à célula bacteriana

Classicamente, a viabilidade bacteriana é definida pela capacidade das bactérias formarem colônias em meios de cultura sólidos ou de proliferarem em meios de cultura líquidos. No entanto, é possível diferenciar o estado fisiológico de uma célula individual, baseando-se no funcionamento de alguns sistemas de transporte ativo, ou na presença ou ausência de membrana citoplasmática intacta e

polarizada. Em síntese, a utilização de critérios de funcionamento celular, tais como o potencial de membrana citoplasmática e a integridade (permeabilidade) da mesma, permite caracterizar os estados metabólicos de uma célula bacteriana (Jepras *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2004).

As células bacterianas saudáveis são delimitadas por uma membrana citoplasmática que lhes permite comunicar seletivamente com o ambiente que as circunda. Os sistemas de transporte ativo geram um gradiente eletroquímico que é fundamental para o perfeito funcionamento de uma célula saudável (Brock *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2004).

No transporte ativo, processo dependente de energia, os nutrientes transportados se acumulam intracelularmente sem qualquer alteração química. No entanto, os nutrientes atravessam a membrana celular por meio da ação de uma “força motiva próton” ou de outra concentração iônica (Figura 1). A energia liberada pela quebra de componentes orgânicos ou inorgânicos ou a energia de luz é usada para separar prótons através da membrana, com uma maior concentração desses no lado externo da célula. Trata-se do potencial eletroquímico inerente à “força motiva próton” responsável pelo transporte de nutrientes para o interior da célula utilizando o sistema de transporte ativo (Brock *et al.*, 1994).

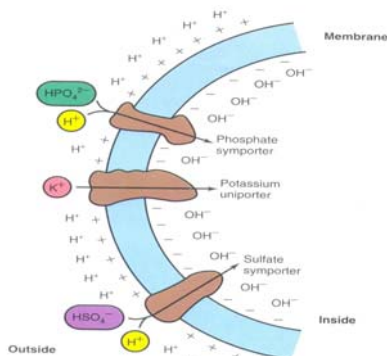


Figura 1. Geração de uma “força motiva próton”.
Fonte: Brock *et al.* (1994).

Segundo Brock *et al.* (1994), durante o processo de transporte através da membrana citoplasmática, esta se encontra em condições tais que ocorre uma separação entre prótons e elétrons. Átomos de hidrogênio, removidos de transportadores de hidrogênio tais como NADH, são separados em elétrons e prótons, sendo que os elétrons são direcionados para o interior da célula por transportadores específicos da membrana e os prótons são excluídos para o lado externo da célula. No final da cadeia transportadora de elétrons, os elétrons são transferidos para o receptor final de

elétrons, que é O_2 , no caso da respiração aeróbia, sendo então reduzido. O processo de redução de O_2 em H_2O requer H^+ do citoplasma para completar a reação, sendo esses prótons originados da dissociação da água em H^+ e OH^- . O uso do H^+ na redução da molécula de O_2 para H_2O e a expulsão de H^+ resultam na formação de OH^- no interior da membrana citoplasmática. Apesar de seu tamanho pequeno, H^+ ou OH^- não atravessam livremente a membrana, não podendo o equilíbrio ser espontaneamente restaurado. O resultado desse processo é a geração de um gradiente de pH e um

potencial eletroquímico através da membrana, com o interior da membrana eletricamente negativo e alcalino, e o exterior da membrana eletricamente positivo e ácido. Esse gradiente de pH e potencial eletroquímico resulta em uma membrana energizada, sendo esta energia elétrica utilizada nas funções vitais da célula (Figura 1).

Em bactérias metabolicamente ativas, com membranas citoplasmáticas intactas, a diferença de potencial de membrana ($\Delta\Psi$) situa-se geralmente entre -100 e -200 mV, encontrando-se o interior da membrana carregado negativamente. A despolarização da membrana ocorre quando o valor de $\Delta\Psi$ se desloca para valores menos negativos, portanto, mais próximos de zero e, a

hiperpolarização ocorre quando a alteração dos valores de $\Delta\Psi$ se dá na direção oposta, ou seja, para valores mais negativos. O valor de $\Delta\Psi$ é nulo quando a membrana apresenta danos estruturais tais que permitem a livre passagem de íons, o que pode suceder quando a célula é submetida, por exemplo, a um tratamento térmico. Segundo Jepras *et al.* (1995), o potencial de membrana reduz quando a mesma é alterada por agentes físicos ou químicos. Dessa forma, quando uma célula saudável está sob condições de estresse, alguns dos sistemas de transporte ativo são afetados (células “vitais”), seguindo-se a despolarização da membrana citoplasmática (células intactas) e, posteriormente, a sua permeabilização (células mortas), conforme Silva *et al.* (2004) (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação da funcionalidade celular baseada na atividade metabólica da célula

Estado Fisiológico	Propriedade observada	Fluorocromo
Células Saudáveis	a) Membranas citoplasmáticas intactas polarizadas b) Presença do sistema de transporte ativo	Carbocianinas (Corante lipofílico catiônico) DiO
Células “Vitais”	a) Ausência do sistema de transporte ativo que exclui o BE	Brometo de etídeo (BE)
Células Intactas	a) Ausência do sistema de transporte ativo que exclui o BE b) Membrana citoplasmática despolarizada	Brometo de etídeo (BE) Bis-Oxonol (BOX) DiO
Células Mortas	a) Ausência do sistema de transporte ativo que exclui o BE b) Membrana citoplasmática despolarizada permeabilizada	Brometo de etídeo (BE) Bis-Oxonol (BOX) Iodeto de Propídio

Fonte: Silva *et al.* (2004).

Conforme Silva *et al.* (2004), no que concerne à integridade (permeabilidade) de membrana, ressalta-se que células sem a membrana citoplasmática intacta não conseguem manter ou gerar um gradiente de potencial eletroquímico que origina o potencial de membrana. Além disso, a sua estrutura interna, não estando protegida por uma membrana citoplasmática intacta, encontra-se livremente exposta ao meio ambiente, pelo que estas células serão decompostas. Todas estas etapas conduzem

à morte celular (Hewitt e Nebe-Von-Caron, 2001). O termo permeabilidade refere-se à propriedade de membrana citoplasmática que permite o movimento de moléculas através da mesma. No entanto, muitas moléculas que se movem através da membrana não se movem passivamente; a membrana citoplasmática é seletivamente permeável. A própria célula desempenha um papel ativo no movimento de moléculas através da membrana. A membrana citoplasmática, além de seletivamente

permeável, contém carreadores protéicos específicos que participam no processo de transporte (Brock *et al.*, 1994).

2.3.2. Aspectos moleculares relacionados à célula bacteriana

Todas as células possuem membrana citoplasmática, uma importante barreira de separação entre o citoplasma e o meio ambiente. Internamente, a estrutura celular mais importante é representada pelo núcleo ou nucleóide, que é o sítio de informação genética, constituído pelo ácido desoxirribonucleico (DNA). Dependendo da organização dessa estrutura molecular, as células podem ser divididas em dois grandes grupos: o grupo das células procarióticas e o das células eucarióticas. A região nuclear procariótica de uma célula bacteriana, denominada nucleóide, não é

delimitada por membrana e consiste de uma molécula de DNA (Brock *et al.*, 1994).

Essa estrutura molecular, designada de ácido nucléico, é constituída de duas fitas, cada qual contendo milhões de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é constituído por um açúcar de cinco carbonos (pentose), um grupo fosfato (PO_4^{-3}) e uma base nitrogenada. Na molécula de DNA, a pentose é representada pela desoxirribose e as bases nitrogenadas são as seguintes: purinas (representadas por adenina e guanina) e pirimidinas (representadas por citosina e timina). Os nucleotídeos de cada fita são unidos entre si por ligação fosfodiéster, um tipo de ligação covalente em que um único grupo fosfato é conectado por ligação éster a dois açúcares separados (Brock *et al.*, 1994) (Figura 2).

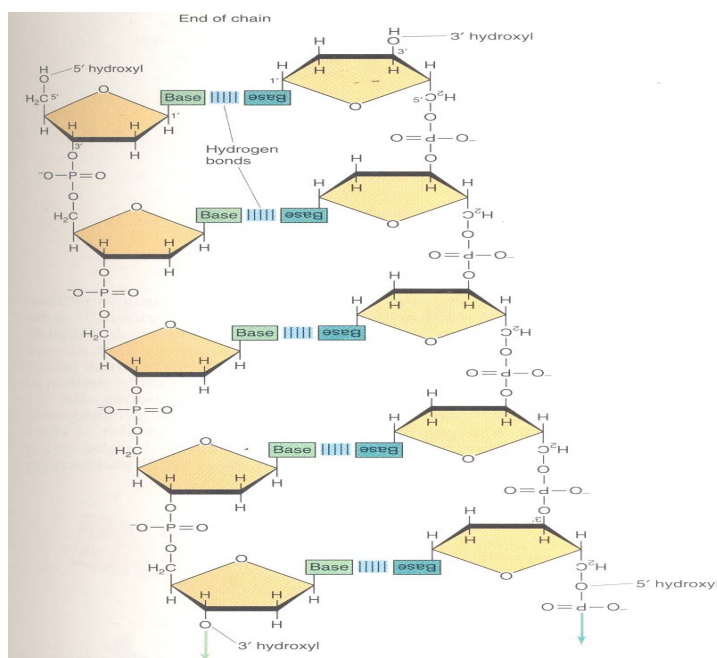


Figura 2. Desenho esquemático da estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA).

Fonte: Brock *et al.* (1994).

As fitas de DNA associam-se entre si por meio de pontes de hidrogênio que ocorrem entre os nucleotídeos de cada fita. Assim, quando posicionadas de forma adjacente, as

purinas e pirimidinas dos nucleotídeos de ambas as fitas são ligadas por pontes de hidrogênio. Esse pareamento por bases específicas, ou seja, adenina com timina e

guanina com citosina, revela que as duas fitas de DNA são complementares na sequência de bases. Esse tipo de ligação, embora individualmente fraca, coletivamente confere uma estabilidade às moléculas. Ambas as fitas de DNA encontram-se organizadas em dupla hélice, sob uma forma altamente espiralada (Brock *et al.*, 1994).

As moléculas de DNA em dupla hélice permanecem unidas por pontes de hidrogênio, em grande proporção. Mas, quando as moléculas de DNA são expostas a condições estressantes (como por exemplo, o tratamento térmico), tais ligações são rompidas, ocorrendo o processo conhecido como desnaturação. Quando as moléculas de DNA são desnaturadas, as ligações peptídicas covalentes em cada cadeia polipeptídica não são modificadas e a sequência de aminoácidos (estrutura primária) em cada uma das cadeias permanece inalterada. A desnaturação desencadeia o “desanelamento” da cadeia polipeptídica, por provocar a destruição da própria estrutura molecular, em particular das pontes de hidrogênio. Para que ocorra o processo de desnaturação das moléculas de DNA, geralmente temperaturas de aquecimento acima de 90° C são requeridas (Brock *et al.*, 1994). Outro artigo cita a ocorrência do processo de desnaturação das moléculas de DNA à temperatura de 100° C por 5 minutos (Lepecq e Paoletti, 1967).

2.3.3. Fluorocromos em estudos de viabilidade celular

Várias provas de fluorescência podem ser utilizadas no monitoramento de fatores biológicos relacionados à viabilidade celular: mudanças no potencial de membrana e alterações na integridade de membrana. Mudanças no potencial de membrana podem ser monitoradas pelo uso de fluorescentes lipofílicos catiônicos e aniônicos sensíveis a provas de potencial de

membrana. Tais corantes, por possuírem caráter lipofílico, podem se acumular intracelularmente dependendo de sua carga (Jepras *et al.*, 1995; Gunasekera *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2004).

Alterações de integridade de membrana são baseadas na capacidade das células reterem ou excluírem componentes, tais como o corante fluorescente intercalante iodeto de propídeo (Jepras *et al.*, 1995; Gunasekera *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2004). Se a membrana citoplasmática for rompida, a integridade da célula é destruída, o conteúdo interno escoar para o meio ambiente e a célula morre (Brock *et al.*, 1994). Assim, um indicador de perda de integridade de membrana, usado frequentemente como parâmetro de viabilidade celular, pode ser estabelecido quando um tipo de corante fluorescente se difunde passivamente através da membrana de uma bactéria (Jepras *et al.*, 1995). O brometo de etídeo também é um corante fluorescente intercalante e, assim como o iodeto de propídeo, atravessa membranas citoplasmáticas permeabilizadas e se liga ao DNA (Gunasekera *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2004).

Quando os ácidos nucleicos são tratados com corantes fluorescentes intercalantes, ocorre prontamente a emissão de fluorescência. O brometo de etídeo (BE) é um corante fluorescente amplamente empregado na marcação de DNA celular, uma vez que ele interage firmemente com a dupla hélice da molécula. Uma das evidências é a de que parece ocorrer o encontro eletrostático do corante catiônico a grupos fosfatos carregados negativamente (Lepecq e Paoletti, 1967; Brock *et al.*, 1994). Pesquisas revelam a evidência de que a formação de um complexo fluorescente entre o brometo de etídeo (2,7 – diamino, 9 – fenilfenantrídio 10 – etil brometo) e os polinucleotídeos helicoidais é específica para regiões de bases pareadas tanto em DNA, RNA e híbridos DNA-

RNA, sendo a base dessa especificidade a intercalação do corante entre os pares de base (Lepecq e Paoletti, 1967; Sambrook *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 2004), conforme demonstrado na figura 3. No entanto, ressalta-se que o corante fluorescente BE consegue atravessar uma membrana polarizada, ligando-se apenas às cadeias de DNA quando a célula não possui um sistema de transporte ativo não específico próton. Este sistema, quando ativo, expulsa o fluorocromo da célula (Midgley, 1987 citado por Silva *et al.*, 2004).

De acordo com Brock *et al.* (1994), quando ácidos nucleicos são tratados com corantes fluorescentes, ocorre prontamente a emissão de fluorescência sob uma fonte de luz ultravioleta. O DNA absorve fortemente a radiação ultravioleta sob comprimento de onda de 260 nm. A absorção ocorre devido às bases purinas e pirimidinas. O DNA em dupla hélice absorve menos fortemente do que o DNA em hélice simples. Tal fato ocorre porque a interação entre as bases nas fitas opostas do DNA em dupla hélice (pontes de hidrogênio) reduz a absorvância ultravioleta.

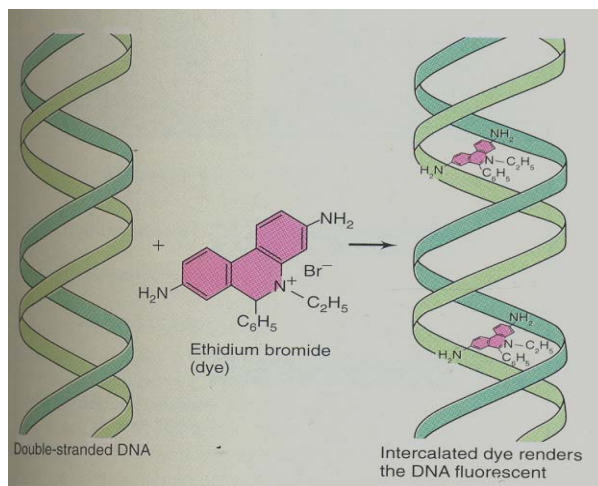


Figura 3. Ação do corante brometo de etídio na fita dupla do DNA bacteriano.
Fonte: Brock *et al.* (1994).

Ressalta-se que a combinação de vários corantes permite a diferenciação de estados metabólicos funcionais: células saudáveis (com capacidade para se dividirem), “vitais”, intactas e mortas (permeabilizadas) (Silva *et al.*, 2004) (Quadro 1). Com essas provas, células vivas e mortas dentro de uma população podem ser identificadas e contadas em até dez minutos após a amostragem (Jepras *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1995; Gunasekera *et al.*, 2002).

Análises diretas de células bacterianas baseadas em coloração vital e combinadas com outras técnicas como microscopia ou citometria de fluxo, podem ser métodos

alternativos para a determinação de contagens totais e viáveis de bactérias (Gunasekera *et al.*, 2000). Tais pesquisas diretas possuem as vantagens de que elas não dependem de cultivo de amostras e de que elas podem fornecer dados sobre as condições fisiológicas de células individuais em uma população em tempo real (Gunasekera *et al.*, 2002; Gunasekera *et al.*, 2003). No entanto, a interpretação de resultados obtidos a partir do uso de métodos diretos pode ser mais difícil quando comparada aos dos métodos baseados em cultivos (Gunasekera *et al.*, 2002). Uma das questões abordadas é a de que a escolha da prova de fluorescência

associada à citometria de fluxo dependerá largamente do microrganismo em questão, das condições experimentais, do tipo de informação requerida pelo analista (Jepras *et al.*, 1995).

2.4. Métodos de referência para contagem bacteriana total do leite

A avaliação da viabilidade bacteriana é uma necessidade inquestionável em várias áreas de microbiologia, incluindo saúde pública, biotecnologia, tecnologia alimentar, água industrial e indústria farmacêutica (Jepras *et al.*, 1995; Leite, 2006).

Considerando que, classicamente, a viabilidade bacteriana seja definida pela capacidade das bactérias formarem colônias em meios de cultura sólidos ou de proliferarem em meios de cultura líquidos, a enumeração de microrganismos viáveis está, portanto, bastante relacionada com a contagem de colônias visíveis após diluições seriadas de suspensões de bactérias e posterior distribuição em meio de cultura solidificado (Jepras *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2004).

Buscando-se a detecção de fontes de contaminação assim como o conhecimento da qualidade microbiológica do leite e derivados, um dos métodos de referência rotineiramente utilizado tem sido a Contagem Padrão em Placas (CPP). Trata-se de um método padrão para contagem de microrganismos aeróbios e facultativos viáveis, sendo referenciado por organizações internacionais como a International Dairy Federation (IDF) e American Public Health Association (APHA).

A contagem de microrganismos aeróbios estritos e facultativos viáveis consiste na enumeração de colônias bacterianas em placas após incubação a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 horas em meio ágar padrão para contagem. As amostras são diluídas em

água peptonada a 0,1% para se obter uma contagem final entre 25 e 250 colônias em placas de Petri individuais. Por ser difícil conhecer os números reais de microrganismos nas amostras, diluições seriadas são feitas para se obter um número antecipado. A amostra é pipetada no fundo de uma placa de Petri vazia e, em seguida, o meio de cultura é transferido para a placa, sendo, em seguida, cuidadosamente misturado para se obter uma distribuição regular de células bacterianas. O tempo entre a diluição da primeira amostra e a colocação do ágar na última placa não deve exceder a 20 minutos (International..., 1991a; Marshall, 1992; Christen, 1993; Bueno *et al.*, 2004a; Leite, 2006).

Na indústria de laticínios, o método padrão de contagem em placas é amplamente empregado como método de referência. O número de unidades formadoras de colônias contadas com o método padrão de contagem em placas depende de parâmetros tais como espécies de bactérias, condições de cultura, agregados, o estado fisiológico da bactéria e injúrias subletais (Suhren e Reichmuth, 2000; Holm *et al.*, 2004).

Segundo Maxcy e Liewen (1989) e Christen (1993), o método padrão de contagem em placas não é condição ideal para o crescimento de microrganismos que causam deterioração no leite submetido às práticas atuais. Trata-se de ensaios morosos, principalmente se o microrganismo em estudo apresenta uma baixa taxa de crescimento, refletindo-se em longos períodos de incubação (horas ou dias). Por outro lado, esses sistemas de detecção da viabilidade celular são dependentes do crescimento de bactérias em ambientes artificiais. Este fato limita a interpretação dos resultados obtidos por estes métodos, uma vez que a escolha de um meio de cultura inadequado pode resultar em uma contagem de colônias imprecisa. Além disso, algumas células crescem apenas em anaerobiose, outras em

aerobiose e, outras em ambas as condições (Jepras *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2004).

De acordo com Gunasekera *et al.* (2000), Gunasekera *et al.* (2002) e Brountin (2004), técnicas baseadas em cultivos são limitadas por serem incapazes de enumerar microrganismos viáveis, mas não cultiváveis. Assim, apenas as bactérias que são capazes de crescer rapidamente nas condições do método de placas formarão colônias e serão detectadas. Devido à utilização de um meio de cultura simples, ocorre competição entre as espécies presentes, sobressaindo-se as bactérias que encontram condições mais favoráveis de crescimento. No entanto, alguns tipos de bactérias que são metabolicamente ativas, mas não formam colônias sob essas condições, não serão detectadas. O mais importante é que o método contará apenas colônias e, dessa forma, não refletirá o número de bactérias individuais presentes no leite, uma vez que uma colônia pode ser formada a partir de uma célula ou de um agregado de células bacterianas. Assim, esse método de referência pode subestimar a verdadeira população bacteriana, sendo a precisão do método de referência descrita como insuficiente.

Por se tratar de um método de alto custo e com grande consumo de tempo, outras técnicas, disponíveis comercialmente, vêm sendo utilizadas. Apesar de serem inicialmente mais caras, tornam-se competitivas quando mão-de-obra e laboratório são considerados. Mas, uma vez que a CPP permanece como o método padrão usado pela indústria, todos os métodos introduzidos para reduzir custo e tempo devem ser correlacionados com ela (Marshall, 1992; Christen, 1993; Bueno *et al.*, 2004a).

Um método também empregado na verificação da qualidade microbiológica do leite, que fornece uma estimativa da contagem bacteriana, é o da microscopia

direta. A contagem do número de bactérias em leite cru pela técnica da microscopia direta baseia-se na técnica desenvolvida por Breed. Para tanto, uma alíquota de 0,01 ml de leite é espalhada sobre uma área definida de uma lâmina para microscópio (1 cm²). Após secagem da lâmina, seguida de tratamento para remoção de gordura e coloração, as células individuais ou aglomerados bacterianos são contados em vários campos utilizando um microscópio. Os resultados, a partir dessa técnica, podem ser obtidos em 10 a 15 minutos do início do teste, dependendo dos procedimentos de coloração adotados assim como do número de campos necessários para a contagem (International..., 1991b).

No entanto, tal como os métodos baseados em diluições seriadas de amostra e posterior inoculação em meios de cultura não seletivos, as técnicas de colorações utilizadas na microscopia direta também apresentam limitações associadas, sobretudo, à contagem manual de bactérias (Silva *et al.*, 2004).

2.5. Citometria de fluxo para contagem bacteriana total do leite

A limitação dos métodos de referência para atender as exigências legais fez com que nos últimos anos, houvesse uma intensa investigação para desenvolvimento de outros métodos analíticos mais rápidos e automatizados (Cimiano, 1974; Gunasekera *et al.*, 2000). A análise automatizada da contagem de células em leite para programas de qualidade tem sido realizada em equipamentos que adotam o princípio da citometria de fluxo (Gunasekera *et al.*, 2000; Silveira, 2002; Cassoli, 2005; Fonseca, 2005; Leite, 2006; Cassoli *et al.*, 2007).

O parâmetro de viabilidade celular mais utilizado em citometria de fluxo aplicada a microrganismos é o potencial de membrana (Silva *et al.*, 2004). Ele é gerado pela diferença de concentração de íons no

interior e no exterior da membrana citoplasmática e, como componente do gradiente eletroquímico, está intimamente relacionado com a formação de ATP na célula (Shapiro, 2000). A medida de diferença de potencial de membrana através da técnica de citometria de fluxo, normalmente, é realizada utilizando-se corantes lipofílicos de distribuição/partição que, devido à sua natureza lipofílica, conseguem atravessar facilmente a membrana e ali se acumulam de acordo com a sua carga. Assim, o gradiente de concentração de um cátion lipofílico através de uma membrana citoplasmática intacta é determinado pela diferença de potencial “transmembranar”. Uma vez atingido o equilíbrio entre as células e o cátion do corante, este irá se acumular no interior da membrana se esta estiver polarizada ou hiperpolarizada, pois nessa situação, o interior daquela encontra-se carregado negativamente, favorecendo a interação eletrostática entre essas cargas negativas e as cargas positivas do corante. Quando a célula se encontra despolarizada, ocorre precisamente o mecanismo inverso: o potencial de membrana diminui (deslocando-se para valores menos negativos), resultando em uma menor distribuição de cargas negativas no interior da membrana e, nestas condições, o corante terá tendência para se acumular no exterior da membrana, onde haverá uma menor distribuição de cargas positivas. Todo esse processo ocorre de forma inversa quando há interação entre um corante lipofílico aniônico e a membrana, devido às interações eletrostáticas que se estabelecem entre o ânion e a distribuição de cargas no interior da membrana. A emissão de fluorescência só ocorre significativamente quando o corante se encontra acumulado no interior da membrana (Silva *et al.*, 2004).

Em relação à integridade de membrana, outro parâmetro relacionado à viabilidade celular, sua detecção ocorre pela retenção ou exclusão de corantes pela célula. No

método de retenção de corante, as células são incubadas com um substrato não fluorescente, o qual é clivado por enzimas intracelulares, resultando em um produto fluorescente, retido nas células apenas quando a membrana citoplasmática está intacta (Jepras *et al.*, 1995). Esse método poderá não ser rigoroso devido a uma eventual perda de atividade enzimática, ao transporte ineficiente do substrato não fluorescente e à expulsão do corante através do sistema de bombas de efluxo (Silva *et al.*, 2004). O método de exclusão do corante, o qual pode ser empregado pelo uso de corantes fluorescentes tais como o iodeto de propídio e ou brometo de etídio, é recomendado na detecção da integridade da membrana, pois evita problemas associados à atividade enzimática do corante (Gunasekera *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2004).

Baseando-se na compreensão dos parâmetros relacionados à viabilidade celular, destaca-se que o método de citometria de fluxo possibilita a realização de uma mensuração rápida de células individuais em populações homogêneas ou heterogêneas. Essa técnica permite mensurações simultâneas de múltiplos parâmetros celulares, tanto estruturais quanto funcionais, sendo geralmente baseadas na dispersão de luz e fluorescência (Jepras *et al.*, 1995; Leite, 2006).

De acordo com Gunasekera *et al.* (2000) e Holm *et al.* (2004), técnicas envolvendo o princípio da citometria de fluxo têm sido desenvolvidas para a enumeração e diferenciação de microrganismos, mas poucas estão relacionadas à diferenciação de bactérias em leite. A aplicação da técnica de citometria de fluxo na diferenciação de espécies bacterianas comumente encontradas no leite poderia ser uma ferramenta importante na determinação das principais causas de contagens bacterianas elevadas (como, por

exemplo, bactérias principalmente associadas à deficiência de higiene, bactérias psicrotróficas associadas à higiene, bactérias principalmente relacionadas com a ocorrência de mastite). Tal diferenciação entre as espécies de bactérias resultaria da combinação de diferentes corantes fluorescentes e substratos fluorogênicos.

Os equipamentos comumente empregados em laboratórios de controle da qualidade do leite e em indústrias de laticínios (Figura 4),

geralmente, se baseiam na mensuração de pulsos eletrônicos após a emissão de fluorescência a partir da incidência de uma fonte de radiação *laser* em um marcador intercalado no DNA (celular ou bacteriano, dependendo do objeto da análise). Silva *et al.* (2004) menciona a lâmpada de mercúrio como outra fonte de radiação. A intensidade e a altura dos pulsos de fluorescência são gravadas e usadas como parâmetros seletivos. Os pulsos selecionados são, então, traduzidos em contagens (Bentley..., 1997; Bentley..., 2002)

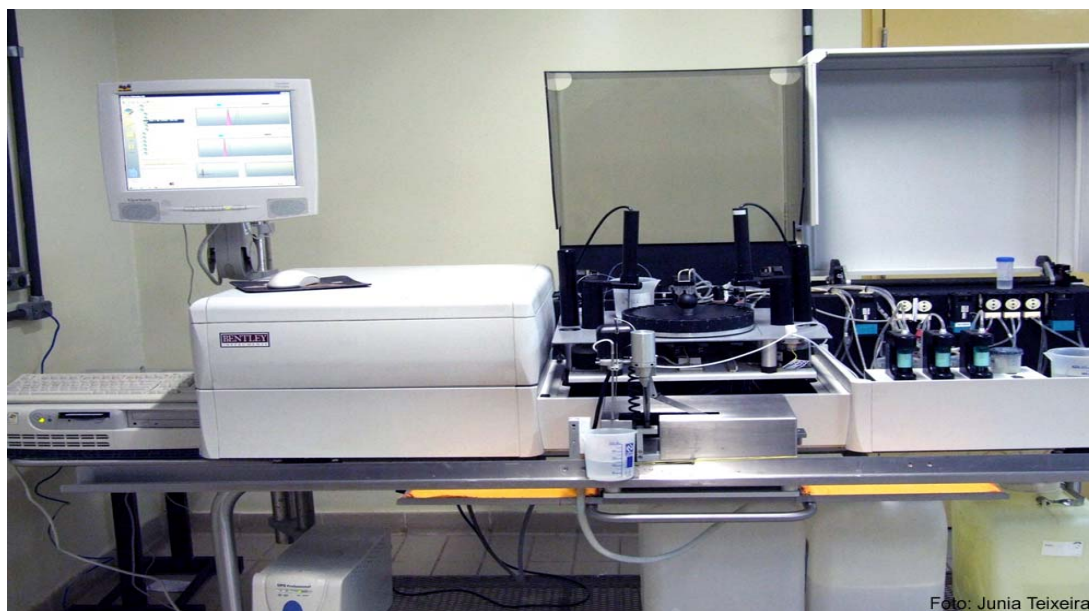


Figura 4. Foto do equipamento eletrônico IBC Bactocount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem bacteriana total em amostras de leite.

Dessa forma, para o funcionamento da análise eletrônica por citometria de fluxo, é necessário o uso de um corante, a exemplo do corante fluorescente brometo de etídio, para a coloração do DNA celular. Além do corante, é preciso um fluido carreador para levar as células coradas fluorescentes através do *flow cell*. Devido à presença do corante fluorescente, cada célula que passa pelo feixe de *laser* produz curta “emissão” de luz, a qual passa por uma série de filtros

e lentes que focalizam em comprimentos de onda apropriados. O pulso de luz é contabilizado, ampliado e filtrado eletronicamente por tamanho para a determinação das células. O computador acoplado ao instrumento reconhece os pulsos elétricos como células (Bentley..., 2002).

A legislação nacional (Brasil, 2002) estabelece o limite de contagem bacteriana

total em UFC/mL, medida que estima a contagem microbiana do leite a partir da enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos e não a contagem bacteriana individual (CBI). Por isto, é realizada uma transformação estatística dos resultados no próprio equipamento (Bentley..., 2002), convertendo os resultados de contagem bacteriana individual (CBI) em unidades formadoras de colônias (UFC) por meio de uma equação de regressão. Para tanto, o equipamento é previamente calibrado mediante o desenvolvimento de uma equação de correlação entre a técnica padrão para contagem bacteriana total e a técnica da citometria de fluxo para que os resultados em CBI sejam transformados e expressos em UFC/mL. A conversão consiste em uma regressão linear simples entre o Bactocount (Bentley Instruments®) e os resultados do método de referência após a transformação log (Suhren e Walte, 2000; Brountin, 2004; Cassoli, 2005; Leite, 2006; Cassoli *et al.*, 2007).

A transformação dos resultados obtidos por equipamentos de contagem eletrônica, baseados em citometria de fluxo, também é utilizada em outros países. No entanto, devido ao erro inerente a essa transformação, tal metodologia vem sendo questionada por pesquisadores da RBQL devido à falta de precisão dos resultados finais, o que ocorre em virtude da variabilidade da microbiota presente no leite cru (Cassoli *et al.*, 2007). Assim, a metodologia atualmente empregada no Brasil transforma um resultado preciso e mais abrangente (isto é, toda a população microbiana do leite) em um dado estimado, sujeito a erro (Cassoli, 2005; Leite, 2006; Cassoli *et al.*, 2007).

De acordo com Jepras *et al.* (1995), Gunasekera *et al.* (2000) e Brountin (2004), métodos baseados no princípio da citometria de fluxo para enumeração de populações bacterianas foram desenvolvidos para superar as limitações dos métodos oficiais de referência. Trata-se de métodos rápidos e

sensíveis, desenvolvidos para enumerar bactérias individuais no leite cru após a remoção de componentes interferentes, rompimento de colônias de bactérias e coloração de DNA e RNA das bactérias.

A vantagem da técnica da citometria de fluxo em analisar células individualmente consiste na detecção de uma variedade de estados fisiológicos celulares intermediários que realmente existem numa determinada população, revelando assim, uma real heterogeneidade (Nebe-Von-Caron e Badley, 1995 e Nebe-Von-Caron *et al.*, 2000). Como já mencionado, os dados obtidos por meio das técnicas de microbiologia clássica são relativos à cultura como um todo, ou seja, uma amostra representativa da cultura microbiana apresenta um único valor, referente à média dos valores de um determinado parâmetro, de todas as células. Contudo, numa população microbiana, as células não se encontram todas no mesmo estado metabólico e fisiológico, pelo que se torna necessário a detecção e descrição de várias subpopulações de forma diferenciada. A citometria de fluxo permite a avaliação da heterogeneidade de culturas microbianas, à escala da célula individual (Jepras *et al.*, 1995; Porter *et al.*, 1996). A combinação de vários fluorocromos em citometria de fluxo permite a diferenciação de subpopulações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade das células. Esta diferenciação levou à introdução do termo “viável, mas não cultivável” aplicado a células que, embora sejam metabolicamente ativas, não são reveladas por meio dos ensaios clássicos de viabilidade celular. A utilização de critérios de funcionamento celular, tais como o potencial de membrana citoplasmática e a integridade da mesma, permitem caracterizar as células viáveis, mas não cultiváveis (Jepras *et al.*, 1995; Nebe-Von-Caron *et al.*, 2000).

Sendo assim, o monitoramento da qualidade microbiológica do leite cru tem se tornado cada vez mais importante para a indústria

laticinista brasileira e um controle efetivo significa a obtenção de resultados rápidos e seguros a baixo custo e de forma mais prática possível. No entanto, é fundamental conhecer de que forma a diversidade da microbiota do leite, o tempo de conservação e a temperatura de armazenamento da amostra assim como os diferentes tratamentos térmicos podem interferir nos resultados obtidos quando as análises são realizadas em equipamentos eletrônicos de contagem bacteriana total (Holm *et al.*, 2004; Leite, 2006).

Em relação ao tempo de conservação e à temperatura de armazenamento de amostras de leite cru, pesquisas alternando conservantes bactericidas e bacteriostáticos em diferentes tempos de conservação e temperaturas de armazenamento, vêm demonstrando a possibilidade de uso apenas dos conservantes bacteriostáticos, como o azidiol, em amostras de leite armazenadas sob refrigeração a 7° C por até sete dias para a contagem bacteriana total (Cassoli, 2005; Cassoli *et al.*, 2007). Outra pesquisa, com o mesmo objetivo, indicou que para a contagem bacteriana total, resultados confiáveis podem ser obtidos a partir do uso do conservante azidiol na forma líquida ou mesmo em comprimidos, em amostras sob refrigeração (4, 7 e 10° C) por até dez dias de armazenamento (Leite, 2006).

A interferência de fatores como o tratamento térmico do leite e a presença de substâncias antimicrobianas na contagem bacteriana total, ainda não são bem conhecidos (Leite, 2006). Resultados demonstram que uma porção substancial de bactérias incapazes de formar colônias após o tratamento térmico (pasteurização) é, todavia, metabolicamente ativa e capaz de transcrever e traduzir genes. A observação de uma alta proporção de células que mantém sua barreira de permeabilidade sem formar colônias sugere que a atividade metabólica das bactérias pode persistir após o tratamento térmico. Futuros estudos, incluindo análises de leite tratado

termicamente, são necessários para determinar se células “viáveis, mas não cultiváveis” podem ter um efeito sobre a qualidade e segurança do leite (Gunasekera *et al.*, 2002).

2.6. Citometria de fluxo para contagem de células somáticas do leite

A contagem de células somáticas é aceita internacionalmente como uma das medidas para a determinação da qualidade do leite. Elevadas contagens de células somáticas estão diretamente relacionadas com a ocorrência de mastite, o que ocasiona redução na produção de leite e alterações em sua composição (Harmon, 1998; Philpot, 1998; Silveira, 2002; Gigante, 2004; Paula *et al.*, 2004).

Embora a infecção na glândula mamária seja o fator mais importante que ocasiona o aumento da quantidade de células somáticas no leite, outros fatores como diferenças entre rebanhos e raças, ordem de parto, estações do ano, estresse térmico e estágio de lactação, também podem alterar a contagem de células somáticas (Harmon, 1998; Ribas, 2001).

A microscopia direta é o método de referência para a determinação da contagem de células somáticas em leite cru. Uma alíquota de leite (0,01 mL) é distribuída homogeneamente em uma área delimitada (1 cm²) na superfície de uma lâmina com o auxílio de uma pipeta automática calibrada. Após a secagem, as lâminas devem ser coradas com uma solução de azul de metileno 0,6% (corante de Newman-Lampert modificado por Lebowitz-Weber) e, em seguida, as células coradas são contadas por meio da observação em um microscópio óptico (Marshall, 1992). O número de células contadas na área delimitada é multiplicado pelo fator de trabalho do microscópio e expresso em

número de células por mililitro (International..., 1991c).

Embora a análise por esse método forneça informações essenciais sobre a condição da matéria-prima, trata-se de um procedimento que requer um trabalho intenso, com ampla variabilidade de interpretação entre diferentes observadores. Métodos clássicos de análises, como é o caso dessa técnica que durante muitos anos é referência na determinação do parâmetro exigido, são limitados por não terem sido concebidos para a análise em série de um grande número de amostras, necessitando de mão-

de-obra excessiva que, devido ao seu custo cada vez maior, impede sua aplicação rentável (Cimiano, 1974; Leite, 2006).

Diante dessas limitações, a contagem de células somáticas pode ser realizada em equipamentos eletrônicos, a exemplo do Somacount (Bentley Instruments Incorporated®) e Fossomatic® (Foss Electric®, Hillerød, Dinamarca). Esses equipamentos são, inclusive, utilizados pela RBQL como alternativa para aperfeiçoar o controle leiteiro e a qualidade do leite (Silveira, 2002; Paula *et al.*, 2004; Fonseca, 2005; Leite, 2006).



Figura 5. Foto do equipamento eletrônico Somacount 300 da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem de células somáticas em amostras de leite.

O equipamento Somacount, utilizado pelo Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da UFMG (LabUFMG), baseia-se no princípio da citometria de fluxo (Figura 5). Na análise, uma alíquota da amostra é coletada pelo instrumento, aquecida a 67°C e levada a uma seringa contendo o corante tampão (brometo de etídeo). Em seguida,

50 µL da amostra é carregada até o *cell* por um líquido carreador (RBS), onde ocorre a incidência de raio *laser* sobre a amostra. Os núcleos corados emitem fluorescência, a qual passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de ondas apropriados e é captada como pulso elétrico. Este pulso é ampliado, filtrado

eletronicamente e convertido em contagem de células somáticas (Bentley..., 1997; Silveira, 2002; Fonseca, 2005; Leite, 2006).

2.7. Método analítico eletrônico para determinação da composição centesimal do leite

Conforme Leite (2006), a análise de componentes do leite por meio de equipamentos de infravermelho é prática, possibilitando analisar um grande número de amostras em curto tempo. A região de infravermelho é a faixa que varia de 0,78 μm a 300 μm do espectro infravermelho. Essa faixa é dividida em três regiões, de acordo com o comprimento de onda ou o número de ondas de radiação: o NIR (*near infra-red*), que abrange a faixa de 0,7 μm a 2,5 μm , o MIR (*mid infra-red*), que compreende a região de 2,5 μm a 25 μm e o FIR (*far infra-red*) que varia de 25 μm a 100 μm (Silveira, 2002) e ainda, segundo Wolfschoon (1977), Ginn e Packard (1989) e Tsenkova *et al.* (2001).

O princípio fundamental de todos os analisadores de infravermelho baseia-se na capacidade de absorção de radiação infravermelha, em diferentes comprimentos de ondas, dos grupos químicos específicos de alguns componentes do leite como gordura, proteína e lactose (Biggs *et al.*, 1987). Os grupos carbonilas (C=O) das ligações éster dos triglicérides absorvem radiação no comprimento de onda de 5,76 μm , os grupos carbono-hidrogênio (C-H) em 3,5 μm , os grupos amida (CONH) das ligações peptídicas das proteínas em 6,46 μm e os grupos hidroxila (OH) da lactose em 9,53 μm (International..., 1996). A quantidade de sólidos totais presentes em uma amostra pode ser determinada pelo somatório do conteúdo de gordura, proteína e lactose, acrescidos de uma constante de minerais ou pela absorção de radiação em

um comprimento de onda de 4,3 μm dos grupos hidroxila das moléculas de água (Biggs *et al.*, 1987). A porcentagem de cada constituinte é relacionada com a quantidade de energia absorvida, de acordo com a lei de Beer-Lambert, que estabelece que a absorvância da luz por uma solução, numa determinada espessura, é diretamente proporcional à concentração de um componente (Biggs *et al.*, 1987).

Na análise, a amostra de leite, pré-aquecida a 40°C, é bombeada para o homogeneizador, que reduz o diâmetro dos glóbulos de gordura e, em seguida, para uma cubeta, que será irradiada pelo feixe de luz infravermelho. As moléculas de gordura, proteína e lactose absorvem radiação infravermelha em comprimentos de ondas específicos. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho, quantificada e transformada em porcentagem por meio da curva armazenada no computador após o processo de calibração (Bentley..., 1998). Após o preparo das amostras, uma *rack* contendo as mesmas, é colocada no equipamento, posicionando a pipeta dentro da primeira amostra. Cerca de 9 mL de leite são pipetados automaticamente e bombeados para um homogeneizador dentro do aparelho, onde os glóbulos de gordura são homogeneizados para glóbulos menores com tamanho similar. Em seguida, o leite é transportado até uma cubeta, na qual o feixe de luz infravermelho incide para determinação da quantidade de gordura, proteína e lactose por absorção de luz infravermelha em comprimentos de onda específicos. Os resultados obtidos de cada componente analisado, em g/100 g de leite, são automaticamente impressos (Silveira, 2002; Fonseca, 2005; Leite, 2006).

2.8 Aspectos legais quanto à Contagem Bacteriana Total (CBT), Contagem de Células Somáticas (CCS) e Composição Centesimal em leite sob diferentes tratamentos térmicos

No Brasil, a Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002) preconiza os limites legais de CCS para o leite cru, estipulando diferentes prazos para as diversas regiões do país. O valor máximo permitido, nas Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, é de 1.000.000 céls./mL. A partir de julho de 2008, este valor será reduzido para 750.000 céls./mL e, a partir de julho de 2011, será de 400.000 céls./mL (Quadro 2) (Gigante, 2004; Cassoli, 2005; Nero et al., 2005; Arcuri et al., 2006; Leite, 2006; Cassoli et al., 2007).

A contagem de células somáticas é reconhecida, internacionalmente, como um dos parâmetros mais importantes para a determinação da qualidade do leite. A União Européia e a Austrália estabelecem um limite de 400.000 céls./mL para amostras de rebanho. No Canadá e nos Estados Unidos, os padrões são de 500.000 céls./mL e 750.000 céls./mL, respectivamente (Philpot, 1998; Ribas, 1999).

Os valores máximos permitidos para a contagem bacteriana total, nas mesmas regiões, também passarão por alterações no decorrer dos anos: 1.000.000 desde julho de 2005; 750.000 a partir de julho de 2008 e 100.000 (individual) ou 300.000 (leite de conjunto) a partir de julho de 2011 (Brasil, 2002). Estes padrões (Quadro 2) visam compatibilizar a qualidade do leite e derivados produzidos no Brasil com os padrões estabelecidos mundialmente (Cassoli, 2005; Nero et al., 2005; Arcuri et al., 2006; Leite, 2006; Cassoli et al., 2007).

Enquanto em muitos países do primeiro mundo, o limite de CBT para o leite cru equivale a 100.000 UFC/mL (Hillerton, 2000), o limite brasileiro inicial

estabelecido pelo Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) é de 1.000.000 UFC/mL, e considera a média geométrica de três análises mensais consecutivas. Há que se ressaltar que o parâmetro “contagem bacteriana total”, dentre os demais estabelecidos no PNMQL é, sem dúvida, o mais susceptível às ações técnicas, proporcionando a obtenção de resultados favoráveis nas ordenhas subseqüentes. Basta para isso que o produtor receba assistência técnica especializada. Portanto, percebe-se a importância da capacitação de recursos humanos como programa institucionalizado (Philpot, 1998; Bueno et al., 2004a).

Apesar do limite proposto pela legislação nacional, para contagem bacteriana total, ser muito superior ao limite internacional, que é de 100.000 UFC/mL, a obrigatoriedade dessa análise já é um grande avanço para o setor e irá proporcionar o conhecimento da qualidade microbiológica do leite brasileiro (Cassoli, 2005; Cassoli et al., 2007).

Quanto à composição centesimal, a Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002) estabelece que o leite cru refrigerado deve conter no mínimo 2,9% de proteína, 3,0% de gordura e 8,4% de extrato seco desengordurado (ESD) (Cassoli, 2005; Cassoli et al., 2007).

Os Anexos I, II, III, IV e V da Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002) estabelecem, respectivamente, os métodos de referência para a avaliação da qualidade dos leites tipo A, B, C, Cru Refrigerado e Pasteurizado. Outros métodos de controle operacional podem ser utilizados, desde que conhecido os seus desvios e correlações em relação aos respectivos métodos de referência.

Quadro 2. Requisitos microbiológicos, físicos, químicos, de CCS, de resíduos químicos a serem avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite

Índice medido (por propriedade rural ou por tanque comunitário)	Até 01.07.2005 Regiões: S/SE/CO Até 01.07.2007 Regiões: N/NE	De 01.07.2005 até 01.07.2008 Regiões: S/SE/CO De 01.07.2007 até 01.07.2010 Regiões: N/NE	De 01.07.2008 até 01.07.2011 Regiões: S/SE/CO De 01.07.2010 até 01.07.2012 Regiões: N/NE	A partir de 01.07.2011 Regiões: S/SE/CO A partir de 01.07.2012 Regiões: N/NE
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre o período de 03 meses)	Máximo de $1,0 \times 10^6$, para estabelecimentos que se habilitarem antecipadamente aos termos do presente RTIQ	Máximo de $1,0 \times 10^6$, para todos os estabelecimentos, nos termos do presente RTIQ	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$ (individual) Máximo de $3,0 \times 10^5$ (leite de conjunto)
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CS/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre o período de 03 meses)	Máximo de $1,0 \times 10^6$, para estabelecimentos que se habilitarem antecipadamente aos termos do presente RTIQ	Máximo de $1,0 \times 10^6$, para todos os estabelecimentos, nos termos do presente RTIQ	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $4,0 \times 10^5$
Composição centesimal: Índices estabelecidos na Tabela 1 do presente RTIQ. Métodos Analíticos de Referência: Matéria Gorda, g/100 g (IDF 1 C: 1987); extrato seco desengordurado (ESD), g/100g (IDF 21 B: 1987; Índice Crioscópico (IDF 108 A: 1969); Proteínas, g/100 g (IDF 20 B: 1993).				

Fonte: Adaptado de Brasil (2002).

No caso do leite pasteurizado, o Anexo V da Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002) estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade. Os valores para microrganismos aeróbios mesófilos são estipulados nesse Regulamento Técnico (Quadro 3).

A Portaria nº 370 (Brasil, 1997), estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT (UHT). Os valores para microrganismos aeróbios mesófilos constam nesse Regulamento Técnico (Quadro 4).

Quadro 3. Características físicas, químicas e microbiológicas do leite pasteurizado

Requisitos	Leite Integral	Leite Padronizado	Leite Semi desnatado	Leite Desnatado	Método de Análise
Gordura, (g/100g)	Teor Original	3,0	0,6 a 2,9	Máx. 0,5	IDF 1C: 1987
Sólidos Não Gordurosos (g/100g)	Mín. 8,4				IDF 21 B: 1987
Proteína, g/100g	2,9				IDF 20 B:1993
Contagem Padrão em Placas (UFC/mL)	$n = 5$ $c = 2$ $m = 4,0 \times 10^4$ $M = 8,0 \times 10^4$				CLA/DDA/SDA/MA, 1993

Fonte: Adaptado de Brasil (2002).

Quadro 4. Características físicas, químicas e microbiológicas do leite UAT (UHT)

Requisitos	Leite Integral	Leite Semi ou parcialmente desnatado	Leite Desnatado	Método de Análise
Gordura, (g/100g)	Mín. 3,0	0,6 a 2,9	Máx. 0,5	IDF 1 C: 1987
Aeróbios mesófilos/mL	$n = 5$ $c = 0$ $m = 100$			IDF 100 B: 1991

Fonte: Adaptado de Brasil (1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Quarenta e três amostras de leite cru foram coletadas, aleatoriamente, na plataforma de recepção de uma indústria de laticínios de Minas Gerais, no período de julho a agosto de 2007. Cada amostra, composta por leite proveniente de tanques de refrigeração de dois produtores rurais (400 mL), foi coletada em frascos estéreis e transportada, sob condições isotérmicas, em caixas contendo gelo reciclável, até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, procedimento realizado de acordo com o International... (1995). Cada amostra era subdividida, assepticamente, em seis amostras de 40 mL e acondicionadas em frascos plásticos esterilizados com capacidade de 50 mL e submetidas a três tratamentos: tratamento 1

(T1) – amostra de leite cru (uma alíquota para análise de composição e contagem de células somáticas e uma alíquota para análise de contagem bacteriana total); tratamento 2 (T2) – amostra de leite pasteurizado (uma alíquota para análise de composição e contagem de células somáticas e uma alíquota para análise de contagem bacteriana total) e tratamento 3 (T3) - amostra de leite esterilizado (uma alíquota para análise de composição e contagem de células somáticas e uma alíquota para análise de contagem bacteriana total) (Figura 6). Das seis amostras, três foram adicionadas de quatro gotas de azidiol líquido (para garantia da concentração de 4,79 mg de azida sódica e 0,2 mg de cloranfenicol) e três foram adicionadas de um comprimido de bronopol. Após a adição dos conservantes, os frascos foram homogeneizados por inversão até completa dissolução dos mesmos.

As análises de composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As análises de microscopia

direta e de contagem padrão em placas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e as análises eletrônicas (composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total), no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG).

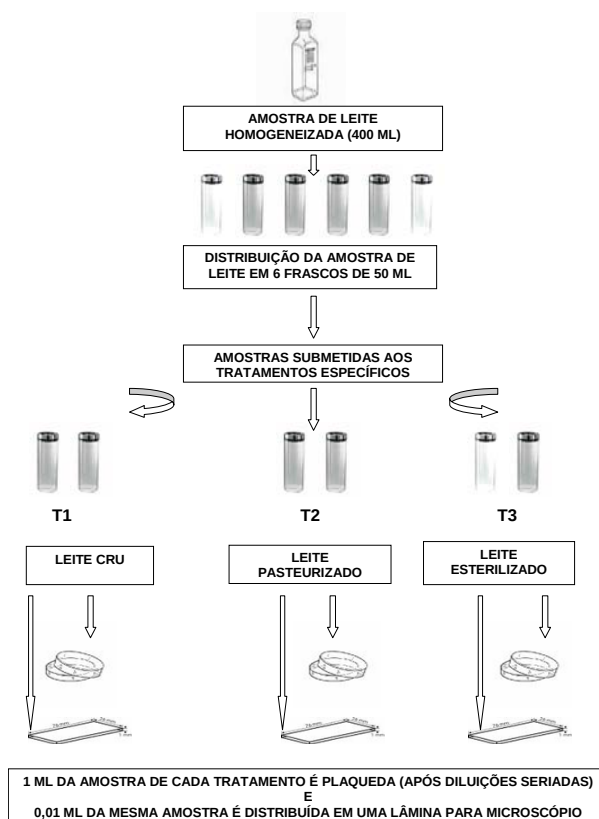


Figura 6. Desenho esquemático do procedimento de amostragem do leite para realização dos procedimentos analíticos.

3.2. Tratamento térmico

Das seis amostras obtidas a partir de cada amostra de leite cru, duas foram submetidas à pasteurização lenta (laboratorial) e as outras duas foram submetidas à esterilização. Para a pasteurização laboratorial, utilizou-se um banho-maria com agitador (Ética Equipamentos Científicos S.A., Brasil), sendo as amostras tratadas a 62 – 65° C por 30 minutos. Para verificar a eficiência da pasteurização,

realizaram-se os testes de atividade das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase (Brasil, 1981 e Brasil, 2006). Para a esterilização, utilizou-se uma autoclave (FANEM®, São Paulo, Brasil) a 111° C por 10 minutos. Para verificar a eficiência da esterilização, utilizaram-se placas controle contendo apenas o meio de cultura ágar padrão. Essas placas, após solidificação do meio de cultura, foram incubadas invertidas em estufa a 36 ± 1° C por 48 ± 3 horas. Após o período de incubação, ausência de crescimento microbiano foi o parâmetro

utilizado na verificação da eficiência da esterilização.

3.3. Análises realizadas

Todas as amostras de leite cru, pasteurizado e esterilizado foram submetidas à análise de contagem padrão de microrganismos aeróbios mesófilos em placas, e distribuição em lâmina para análise microscópica direta no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, conforme metodologia estabelecida pela legislação vigente (Brasil, 2003). Em seguida, os frascos contendo as amostras foram adicionados dos conservantes bronopol e azidiol, conforme descrito no item 3.1. e, imediatamente, encaminhados ao LabUFMG para realização da contagem bacteriana total pelo princípio da citometria de fluxo em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América (Bentley..., 2002). Posteriormente, efetuaram-se as análises de composição e contagem de células somáticas em equipamento eletrônico Bentley Combi System 2300® (Bentley..., 1997; Bentley..., 1998), calibrado com amostras padrão de leite cru de origem canadense.

3.3.1. Contagem padrão em placas

Para realização dessa análise, foram preparadas diluições decimais seriadas utilizando como diluente água peptonada 0,1%. Foi transferido, a partir de três diluições selecionadas (10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}), 1 mL da amostra diluída para placas de Petri. Em seguida, foi vertido nas placas, sobre o inóculo, o meio de cultura ágar padrão para contagem (Difco). Após a realização de movimentos circulares nas placas e solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas invertidas em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 3 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) (Brasil, 2003).

3.3.2. Microscopia direta

A contagem do número de bactérias em leite cru pela técnica da microscopia direta é baseada na técnica desenvolvida por Breed. Essa técnica também foi utilizada, nesse trabalho, para estimativa da contagem bacteriana em leite pasteurizado e esterilizado. Para tanto, uma alíquota de 0,01 mL de leite foi distribuída homogeneamente sobre uma área definida de uma lâmina para microscópio (1 cm^2) com o auxílio de uma pipeta automática calibrada. Após secagem, as lâminas foram tratadas com xilol 1% e etanol absoluto para remoção de gordura e em seguida, coradas com uma solução de azul de metileno 0,6 % (corante de Newman-Lampert modificado por Lebowitz-Weber). Posteriormente, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Marshall, 1992). Para cada amostra de leite, fez-se uma lâmina, com dois esfregaços. Em cada lâmina, no caso do leite cru e pasteurizado, 20 campos de um esfregaço foram contados e a média das contagens foi multiplicada pelo fator microscópico ($\text{FM} = 254.000$) e, no caso do leite esterilizado, 20 campos de dois esfregaços foram contados e a média das duas contagens foi multiplicada pelo mesmo fator microscópico.

A contagem de células somáticas em leite cru, pasteurizado e esterilizado também foi realizada por essa técnica. Para tanto, as mesmas lâminas preparadas para a contagem bacteriana total foram utilizadas para a contagem de células somáticas. Em cada lâmina, no caso do leite cru e do leite pasteurizado, 20 campos de um esfregaço foram contados e a média das contagens foi multiplicada pelo fator microscópico ($\text{FM} = 254.000$) e, no caso do leite esterilizado, 20 campos de dois esfregaços foram contados e a média das duas contagens foi multiplicada pelo mesmo fator microscópico.

Para determinação do fator microscópico, utiliza-se uma lâmina micrométrica de 0,1 mm, subdividida em 100 partes de 0,01 mm, para medir o tamanho do campo microscópico da objetiva de imersão. Em seguida, determina-se a área do campo em cm^2 . Como a amostra é espalhada na lâmina em uma área de 1 cm^2 , determina-se também quantos campos microscópicos existem em uma área de 1 cm^2 . Ao final dos cálculos, multiplica-se o resultado por 100 para se determinar o número de campos microscópicos por mL da amostra (Marshall, 1992).

3.3.3. Contagem bacteriana total em equipamento eletrônico

A contagem bacteriana total foi efetuada em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América (Bentley..., 2002), que tem por princípio a citometria de fluxo. A amostra de leite, contendo o conservante bacteriostático, é aspirada para a cavidade de um carrossel em rotação aquecido a 50° C. Uma solução de incubação constituída por um tampão para clarificação, enzimas proteolíticas e um marcador fluorescente de DNA (no presente estudo, o brometo de etídio) são adicionados com a finalidade de lisar células somáticas, solubilizar glóbulos de gordura e proteínas, permeabilizar bactérias e corar o DNA. Durante o período de incubação, a mistura é sonicada duas vezes por meio de duas sondas ultra-sônicas para auxiliar a degradação química das partículas interferentes, romper as colônias remanescentes de bactérias, o que melhora a detecção de bactérias individuais e para reduzir a fluorescência de segundo plano. Os debris celulares, com exceção dos ácidos nucleicos, são excluídos da análise. Após o período de incubação, uma porção dessa solução é transferida para o citômetro de fluxo, onde as bactérias são alinhadas dentro de um tubo capilar e expostas a um intenso feixe de *laser* quando ocorre a emissão de fluorescência a partir das

moléculas de brometo de etídio. Quando excitadas pelo *laser*, as células emitem radiação que é coletada pelo sistema óptico do equipamento. O sinal de fluorescência é coletado por lentes ópticas, filtrado e detectado por um foto multiplicador altamente sensível. A intensidade e a amplitude dos pulsos de fluorescência são registradas e utilizadas como parâmetros comparativos para os resultados. Os pulsos são classificados e traduzidos em contagem individual de bactérias (CBI) e, posteriormente, em UFC/mL, após calibração prévia do equipamento (Barrientos *et al.*, 2000; Bentley..., 2002; Broutin, 2004; Fonseca, 2005). Importante ressaltar que, no momento de organização das amostras em *racks*, as amostras de leite foram intercaladas com amostras de água purificada a fim de prevenir a ocorrência de *carry over*, ou seja, de transferência de resíduos entre amostras de leite, fator que poderia contribuir para a contaminação entre as amostras.

3.3.4. Contagem de células somáticas em equipamento eletrônico

A contagem de células somáticas foi realizada no equipamento Bentley Combi System 2300®, que tem por princípio a citometria de fluxo. Uma alíquota da amostra, pré-aquecida a 40° C, é aspirada para o interior do equipamento e conduzida a uma seringa contendo o corante tampão. O instrumento requer o uso do corante fluorescente brometo de etídio (pastilhas de Glocount™ – Bentley..., 1997) para corar o DNA das células. Em seguida, 50 μL da amostra são conduzidos por um fluido carreador para o citômetro de fluxo, onde recebem incidência de raio *laser*. A luz emitida passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de onda adequados e é captada como pulso elétrico. Este pulso é ampliado, filtrado e convertido em contagem de células somáticas (Bentley..., 1997).

3.3.5. Composição centesimal em equipamento eletrônico

A análise composicional, tal como a contagem de células somáticas, foi realizada no equipamento Bentley Combi System 2300®, composto por uma unidade do equipamento Bentley 2000 e uma do equipamento Somacount 300, com capacidade para analisar até 300 amostras por hora.

O equipamento Bentley 2000 realiza análise por meio da mensuração da absorção de energia, utilizando quatro comprimentos de onda selecionados por quatro filtros, os quais passam por um feixe de raio *laser* durante cada ciclo de análise. Três destes comprimentos de onda são específicos para alguns macrocomponentes (5,73 μm para gordura, 6,46 μm para proteína e 9,53 μm para lactose) e o quarto trata-se de um comprimento de referência (Bentley..., 1998).

A amostra de leite, aquecida a 40° C, é agitada, aspirada e homogeneizada para reduzir o diâmetro dos glóbulos de gordura. Posteriormente, recebe irradiação pelo feixe de luz infravermelha em uma cubeta. A diferença de energia absorvida entre a amostra a ser analisada e a amostra de referência é captada por um detector de infravermelho e em seguida, quantificada e transformada automaticamente em teores de componentes, tendo como referência a curva de calibração (Bentley..., 1998).

3.4. Análise estatística

Para a realização deste trabalho, utilizou-se o delineamento estatístico blocos ao acaso. Os dados de contagem bacteriana total e de contagem de células somáticas apresentaram elevada variabilidade, com valores extremos e dispersão dos dados, não seguindo uma distribuição normal. Assim, para uma comparação e análise mais eficiente das contagens bacterianas e de

células somáticas das amostras de leite, procedeu-se à transformação dos dados, de forma a se obter uma distribuição normal e homocedástica, o que foi alcançado por meio da transformação logarítmica. Como foi encontrado resultado zerado, somou-se uma unidade a todos os valores das respostas medidas, ou seja, $\log X + 1$. Os resultados originais obtidos de contagem bacteriana total assim como os de contagem de células somáticas foram transformados para logaritmo na base 10 ($\log X + 1$) para análise estatística.

Os dados analíticos obtidos foram avaliados por meio de estatística descritiva e após transformações, realizou-se análise de variância (Sampaio, 2002). O modelo utilizado foi o de esquema fatorial 3 x 4 no caso da contagem bacteriana total e 3 x 2 no caso da contagem de células somáticas, levando-se em consideração a interação dos fatores fixos de tratamento térmico e técnica.

A diferença mínima significativa entre os fatores avaliados foi obtida por meio do teste de Tukey, com nível de 95% de significância. A correlação entre os fatores foi analisada por meio de correlação parcial controlando-se as interações de tratamento térmico e técnica. A análise estatística foi feita utilizando-se o pacote estatístico SAS.

As amostras apresentaram correlações lineares significativas entre os itens avaliados ($p < 0,05$). O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida de associação linear entre duas variáveis. Os valores deste coeficiente variam de -1 a 1. O sinal do coeficiente indica a direção da relação e seu valor absoluto, a intensidade desta relação. Valores absolutos maiores significam relação mais “forte” entre as variáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contagem bacteriana total

4.1.1. Comparação entre os métodos de referência e rápido

Os resultados das contagens microbiológicas dos diferentes tipos de leite (cru, pasteurizado e esterilizado) analisados pelos métodos de referência (contagem padrão em placas e microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo) foram variáveis. A Tabela 2 registra os valores médios e os respectivos desvios padrões para cada método utilizado na contagem bacteriana de leite cru, pasteurizado e esterilizado.

Considerando-se os resultados de contagem bacteriana pelos três tratamentos (leite cru,

pasteurizado e esterilizado), verificou-se diferença ($p \leq 0,05$) entre o método de referência de contagem padrão em placas (CPP) e o método de citometria de fluxo, com resultados expressos em CBI/mL e UFC/mL (Tabela 2). A maior contagem bacteriana observada na citometria de fluxo pode ser explicada pelo fato de que este método enumera a totalidade de bactérias viáveis, mas não cultiváveis assim como bactérias não viáveis; diferentemente da CPP, em que apenas bactérias viáveis que crescem em condições de cultivo em placas (nutrientes disponíveis no meio, tensão de oxigênio, temperatura e tempo de incubação) são contadas. Tais resultados estão de acordo com os descritos por Gunasekera *et al.* (2000) e Cassoli *et al.* (2007), que também observaram contagens mais elevadas em leite cru submetido ao método de citometria de fluxo.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrões dos métodos de referência (contagem padrão em placas e microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo) utilizados na contagem bacteriana de leite

Leite	Métodos			
	Contagens bacterianas (X 1.000)			
	CF (CBI/mL)	CF (UFC/mL)	CPP (UFC/mL)	MD (Bact./mL)
Cru	6.070 ^A ± 5.870	2.650 ^{AB} ± 2.620	2.070 ^C ± 5.420	2.570 ^{BC} ± 6.170
Pasteurizado	1.770 ^A ± 3.420	760 ^{AB} ± 1.520	30 ^C ± 70	640 ^B ± 2.010
Esterilizado	5.170 ^A ± 2.670	2.220 ^A ± 1.180	0 ^C ± 0	160 ^B ± 300

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

CPP= contagem padrão em placas; CF= contagem eletrônica por citometria de fluxo com resultados expressos em CBI/mL e UFC/mL; MD= microscopia direta.

Ainda, Holm *et al.* (2004) analisaram 72 amostras de leite de tanques de expansão na Dinamarca que excederam o nível de $3,0 \times 10^4$ UFC/mL pelos métodos de citometria de fluxo e por análise microbiológica convencional. Para 92% das amostras, o método de citometria de fluxo resultou em contagens maiores do que o de contagem padrão em placas. Em média, a contagem pelo método de citometria de fluxo foi 3,8 vezes maior do que pelo método padrão de contagem em placas. Observou-se diferença ($p \leq 0,05$) em todas as contagens entre os dois métodos e o coeficiente de correlação (r) entre os métodos de citometria de fluxo e de contagem padrão em placas foi de 0,71.

Segundo Gunasekera *et al.* (2000) e Cassoli *et al.* (2007), pela técnica de contagem padrão em placas (CPP), a quantidade de bactérias presentes no leite pode estar subestimada, pois apenas bactérias viáveis e que se multiplicam nas condições de cultivo em placas, desenvolvem colônias que são enumeradas, sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônias (UFC). Um aspecto negativo do método de referência é o de subestimar a quantidade total de bactérias no leite, uma vez que nem sempre uma colônia é originada de apenas uma única bactéria. Isso também é corroborado por outros pesquisadores, ao mencionarem que essa característica de agregação pode subestimar a contagem bacteriana, uma vez que uma colônia pode ter sido originada de várias bactérias (Hillerton, 2000; Brountin, 2004). Na citometria de fluxo, as bactérias são contadas de forma individualizada (Bentley..., 2002).

Apesar dessas limitações, a contagem padrão em placas foi o principal método estudado e utilizado nas últimas décadas para se determinar a contagem de bactérias presentes no leite, sendo considerado o método de referência para esse tipo de análise (International..., 1991a). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da publicação da Instrução Normativa nº 51, definiu o limite legal para contagem bacteriana total em unidades formadoras de colônias (Brasil, 2002).

Na comparação das contagens bacterianas obtidas pelo método de CPP com as contagens pela microscopia direta, os resultados foram similares ($p > 0,05$) para o leite cru. A observação destes resultados pode ser explicada pelo fato de que na microscopia direta, bactérias (visualizadas sob a forma de grumos, cocos e bastonetes, isolados ou em cadeia) são contadas como apenas uma unidade sem considerar a “forma de organização microbiana”. Assim, a técnica de microscopia direta, por limitações relacionadas, por exemplo, à falta de habilidade e prática do analista, pode originar contagens subestimadas, principalmente no caso de amostras de leite muito contaminadas. A figura 7 ilustra a imagem de um campo microscópico com visualização de células bacterianas isoladas e em aglomerados. Segundo o International... (1991b), a microscopia direta é um método de estimativa bacteriana que tem seu uso limitado para amostras de leite com altas contagens, como por exemplo, acima de 300.000 bactérias/mL, devido à baixa sensibilidade do método e ainda, à fadiga do analista.

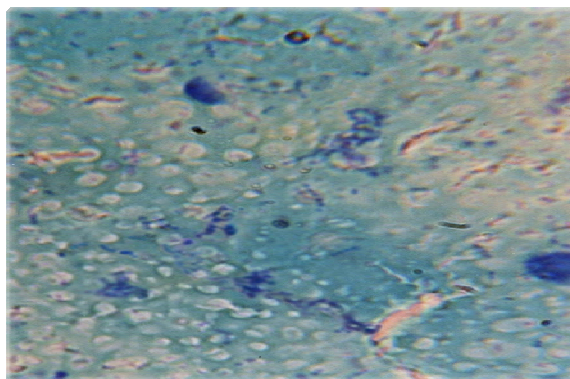


Figura 7. Imagem de fotografia de microscopia direta de células bacterianas coradas por azul de metileno 0,6% (ampliação microscópica de 100 X).

Na comparação das contagens bacterianas obtidas pelo método de CPP com as da microscopia direta, os resultados foram diferentes ($p \leq 0,05$) para o leite pasteurizado e esterilizado. Gunasekera *et al.* (2002), ao compararem as contagens de bactérias viáveis entre as técnicas de CPP e de microscopia por epifluorescência (técnica usada na exibição de estruturas e mensuração de eventos fisiológicos em células vivas), encontraram resultados estatisticamente diferentes em leite pasteurizado. A contagem obtida pela técnica de CPP foi menor ($p \leq 0,05$) do que a contagem de células viáveis obtida pela técnica de microscopia por epifluorescência. Quando uma amostra de *Escherichia coli* ($2,5 \times 10^6$ bactérias/mL) ou de *Pseudomonas putida* ($5,8 \times 10^5$ bactérias/mL), com marcação molecular baseada em *gfp* (“green fluorescent protein”), foi inoculada em leite UAT e, posteriormente, pasteurizada ($63,5^\circ\text{C}/30$ minutos), verificaram uma redução maior que 4 log na contagem bacteriana pelo método de CPP e uma redução menor que 2,5 log na contagem bacteriana pela microscopia por epifluorescência, sugerindo que uma subpopulação significativa de células em leite pasteurizado são viáveis, mas não cultiváveis.

Considerando-se as contagens bacterianas nos tratamentos (leite cru e pasteurizado), verificou-se que os resultados de microscopia direta foram similares aos observados pelo método de citometria de fluxo com resultados expressos em UFC/mL ($p > 0,05$), conforme Tabela 2. Na citometria de fluxo, a contagem bacteriana expressa em UFC é obtida a partir da conversão dos resultados de contagens em CBI, conforme Bentley... (2002). Considerando-se que os resultados obtidos pelo método de microscopia direta foram similares em relação aos obtidos pela citometria de fluxo com resultados expressos em UFC/mL, pode-se inferir que a utilização dos resultados de análise de leite por microscopia direta pode ter uma aplicação prática na conversão dos resultados gerados pelo equipamento eletrônico Bactocount IBC (Bentley Instruments®). Tal procedimento permite minimizar possíveis distorções entre as contagens por permitir a enumeração de células viáveis em seus diferentes estágios fisiológicos (Gunasekera *et al.*, 2002; Brountin, 2004) assim como de células não viáveis.

De acordo com Suhren e Reichmuth (2000), as diferenças entre os resultados obtidos por vários métodos podem ser menos pronunciadas no caso de métodos que

sejam baseados no mesmo princípio e mais pronunciadas no caso da comparação entre métodos com princípios metodológicos distintos. Para a avaliação da qualidade microbiológica do leite, existem métodos baseados no princípio de contagem de colônias (como é o caso da CPP), contagens microscópicas (como, por exemplo, microscopia direta e citometria de fluxo), medidas de atividade metabólica (como teste de redutase), entre outros métodos (determinação de ATP, PCR).

Segundo Holm *et al.* (2004), Cassoli (2005) e Cassoli *et al.* (2007), a qualidade microbiológica é um sistema multi-dimensional afetado por diferentes fatores. Quando se aplica um método como a contagem padrão em placas, este sistema é reduzido a uma única dimensão. Neste método, os resultados são expressos em unidades formadoras de colônia, e indicam parcialmente a qualidade microbiológica, uma vez que não se consideram fatores como agregação bacteriana, atividade metabólica da bactéria, condições de cultivo e microbiota predominante.

Suhren e Reichmuth (2000) e Holm *et al.* (2004) consideram que, em razão da influência de vários fatores sobre a contagem bacteriana total, os métodos de CPP e de citometria de fluxo fornecem apenas estimativas do número real de bactérias e, assim, uma completa conformidade entre ambos não é necessariamente uma exigência.

Neste trabalho, a correlação verificada entre o método de referência (CPP) e o de citometria de fluxo foi positiva, mas a força de correlação foi menor do que a observada com uso da microscopia direta, o que pode ser explicado pela variabilidade das contagens bacterianas das amostras analisadas.

Apesar de alguns trabalhos demonstrarem boa correlação entre o método de citometria

de fluxo e o de contagem padrão em placas ($r \geq 0,70$) (Gunasekera *et al.*, 2000; Gunasekera *et al.*, 2002; Broutin, 2004; Cassoli *et al.*, 2007), vários trabalhos também ressaltam a importância de se utilizar um grande número de amostras nos estudos de correlação entre os métodos, pois vários fatores podem interferir nessa correlação (Gunasekera *et al.*, 2000; Suhren e Reichmuth, 2000; Broutin, 2004). Os principais fatores que podem interferir nos resultados são o nível de contaminação microbiana, a atividade metabólica das células bacterianas assim como as características de agregação das células e microbiota predominante (Suhren e Reichmuth, 2000; Holm *et al.*, 2004). Suhren e Reichmuth (2000) observaram que, em amostras de leite com baixa contagem bacteriana, houve uma predominância de bactérias Gram positivo, enquanto que em amostras de leite com alta contagem bacteriana, predominaram bactérias Gram negativo, pela técnica de citometria de fluxo, demonstrando a interferência da microbiota do leite.

Ressalta-se, ainda, que as análises de todas as amostras de leite (cru, pasteurizado e esterilizado) foram realizadas em equipamento eletrônico, previamente calibrado com amostras de leite cru. Conforme Bentley... (2002), toda calibração consta na configuração do equipamento e depende de determinadas condições de trabalho e, quando ocorrem mudanças nessas condições, ela afetará a contagem individual de bactérias nas amostras de leite e por isso, também, a contagem final em UFC/mL.

4.1.2. Efeito do tratamento térmico na contagem bacteriana total de leite cru, pasteurizado e esterilizado

Os resultados das contagens microbiológicas dos diferentes tipos de leite

(cru, pasteurizado e esterilizado) realizadas pelos métodos de referência e rápido foram variáveis. A Tabela 3 registra os valores médios e respectivos desvios padrões para diferentes tipos de leite (cru, pasteurizado e esterilizado), analisados por métodos de referência (contagem padrão em placas e microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo) na contagem bacteriana.

De acordo com a Tabela 3, verificou-se diferença entre os resultados das contagens bacterianas do leite cru e pasteurizado ($p \leq 0,05$) e do leite cru e esterilizado ($p \leq 0,05$) a partir do uso da técnica de CPP. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que, com a adoção do tratamento térmico (pasteurização/esterilização), ocorre uma redução significativa na contagem bacteriana do leite. No método de CPP, a contagem obtida resulta apenas do número de células viáveis que crescem em condições de cultivo (International..., 1991a). De acordo com Suhren e

Reichmuth (2000), células bacterianas vegetativas são inativadas pelo tratamento térmico, dependendo das espécies e condições de tratamento térmico, de tal maneira que não são extensivamente detectadas por métodos de contagem de colônias. Assim, quanto mais drásticas forem as condições térmicas aplicadas à amostra de leite, menores serão os números de colônias visualizadas nos meios de contagem em placas. Esse resultado também foi corroborado por Gunasekera *et al.* (2002), que observaram uma redução significativa ($p < 0,01$) na contagem bacteriana pela técnica de CPP após o tratamento térmico (63,5°C/30 minutos). Da população de *Escherichia coli* ($2,5 \times 10^6$ bactérias/mL) ou de *Pseudomonas putida* ($5,8 \times 10^5$ bactérias/mL) inoculada em leite UAT e, posteriormente pasteurizada, apenas 1% e 6%, respectivamente, foram capazes de formar colônias em meio de cultivo após o tratamento térmico.

Tabela 3. Valores médios e desvios padrões da contagem bacteriana de leite cru, pasteurizado e esterilizado, realizada por métodos de referência (contagem padrão em placas e microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo)

Leite	Métodos			
	Contagens bacterianas (X 1.000)			
	CF (CBI/mL)	CF (UFC/mL)	CPP (UFC/mL)	MD (Bact./mL)
Cru	6.070 ^a ± 5.870	2.650 ^a ± 2.620	2.070 ^a ± 5.420	2.570 ^a ± 6.170
Pasteurizado	1.770 ^b ± 3.420	760 ^b ± 1.520	30 ^b ± 70	640 ^b ± 2.010
Esterilizado	5.170 ^a ± 2.670	2.220 ^a ± 1.180	0 ^c ± 0	160 ^b ± 300

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

CPP= Contagem Padrão em Placas; CF= contagem eletrônica por citometria de fluxo com resultados expressos em CBI/mL e UFC/mL; MD= microscopia direta.

Pelo método de microscopia direta, a média das contagens bacterianas das amostras foram 2.570.000 bactérias/mL para o leite cru, 640.000 bactérias/mL para o leite pasteurizado e 160.000 bactérias/mL para o leite esterilizado, respectivamente (Tabela 3). Considerando os resultados obtidos, verificou-se que, com a aplicação dos tratamentos térmicos (pasteurização e esterilização), ocorreu uma redução na contagem bacteriana do leite (Anexo 1). Semelhantemente à CPP, para esse método, ao comparar os leites submetidos aos diferentes tratamentos, verificou-se diferença entre o leite cru e o pasteurizado ($p \leq 0,05$) e entre o leite cru e o esterilizado ($p \leq 0,05$). Tal fato pode ser explicado pelo efeito do tratamento térmico que ocasionou a destruição de estruturas celulares em amostras de leite tratadas. Gunasekera *et al.* (2002) utilizaram a técnica de microscopia por epifluorescência na comparação da contagem de bactérias viáveis entre leite cru e pasteurizado (63,5°C/30 minutos). Verificaram, por meio do uso de marcadores moleculares baseados em *gfp*, que houve uma redução significativa ($p \leq 0,05$) na contagem de células viáveis do leite pasteurizado em relação ao leite cru.

Na análise por citometria de fluxo (resultados expressos em UFC/mL), a média das contagens bacterianas das amostras de leite cru (2.650.000 bactérias/mL) foi maior do que a das contagens do leite pasteurizado (760.000 bactérias/mL), representando uma redução significativa ($p \leq 0,05$). Verificou-se, também, uma redução estatisticamente significativa nas contagens bacterianas por citometria de fluxo (resultados expressos em CBI/mL) nas amostras de leite cru (6.070.000 bactérias/mL) em relação às amostras de leite pasteurizado (1.770.000 bactérias/mL). Gunasekera *et al.* (2002), também obtiveram resultado semelhante ao empregar a citometria de fluxo para enumeração de bactérias em leite. Para tanto, marcadores moleculares baseados em

gfp (proteína fluorescente verde) foram utilizados para a marcação de cepas de *Pseudomonas putida*, seguida por indução com IPTG (tiogalactopiranosídeo de isopropila), molécula glucídica não metabolizada, para melhor emissão de fluorescência. Ao analisarem amostras de leite UAT inoculadas com cepas de *P. putida* marcadas, verificaram por citometria de fluxo, que apenas 0,5 a 1,0% das células foram capazes de expressar *gfp*, após o tratamento térmico (63,5°C/30 minutos).

Ainda, na análise por citometria de fluxo (resultados expressos em CBI/mL e UFC/mL), a diferença nas contagens bacterianas foi significativa entre o leite pasteurizado e o esterilizado ($p \leq 0,05$), porém com contagens elevadas no leite esterilizado (Anexo 1). Suhren e Walte (2000) também obtiveram resultado semelhante utilizando a citometria de fluxo na análise de leite UAT e pasteurizado. A análise de leite UAT revelou contagens bacterianas superiores (800 a 1700 bactérias/mL) em relação às contagens bacterianas do leite pasteurizado (20 a 180 bactérias/mL). Nesse estudo, foi empregado o equipamento Bactoscan FC, cujo princípio consiste na marcação de ácidos nucleicos com corante fluorescente brometo de etídeo (BE). Abordam, no entanto, que o método de citometria de fluxo com coloração de DNA/RNA por BE não possibilita a diferenciação de bactérias viáveis e mortas, sendo, portanto, necessários futuros experimentos para obtenção de informação sobre o modo como essas ligações devem ser interpretadas.

O corante fluorescente brometo de etídeo (BE), empregado no equipamento Bactocount (Bentley Instruments®), atravessa membranas polarizadas (desde que o sistema de transporte que exclui o corante não esteja ativo), despolarizadas e permeabilizadas, sendo, portanto, capaz de detectar e enumerar células “vitalis”,

intactas e mortas, conforme apontado no Quadro 1. Verifica-se que o método de citometria de fluxo, associado ao uso do corante fluorescente brometo de etídio, é altamente sensível na contagem bacteriana total em amostras de leite. No entanto, essa característica ampla de coloração vital impossibilitou, nas condições experimentais do presente trabalho, a diferenciação dos tipos celulares predominantes (células polarizadas, despolarizadas e permeabilizadas) em cada tipo de leite (cru, pasteurizado e esterilizado).

A combinação de vários fluorocromos em citometria de fluxo é uma opção que permite a diferenciação de subpopulações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade das células (Jepras *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 1995; Porter *et al.*, 1996; Hewitt *et al.*, 1998; Hewitt *et al.*, 1999; Holm *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004).

Como exemplo dessa associação de mistura de fluorocromos ao método de citometria de fluxo, um estudo foi desenvolvido para análise da viabilidade de células bacterianas em leite. Para tanto, misturas de células vivas e mortas de *Staphylococcus aureus* por tratamento térmico (80° C por 10 minutos) foram inoculadas em leite UAT. Após remoção de gordura e proteína, amostras deste leite receberam uma coloração dupla com corante SYTO 9 (Molecular Probes, Bioscientific, Sydney, Australia) que cora células vivas e mortas, e iodeto de propídio (IP, Sigma-Aldrich, Sydney, Australia) que penetra apenas em células com permeabilidade de membrana comprometida (células mortas). A análise por citometria de fluxo revelou duas subpopulações de células, ou seja, células vivas com fluorescência verde coradas pelo SYTO 9 e células mortas com fluorescência laranja-vermelho coradas pelo IP. Os números relativos de células detectadas dentro dessas subpopulações foram diretamente relacionados aos níveis de

células vivas e mortas por tratamento térmico inoculadas no leite UAT (Gunasekera *et al.*, 2003).

Em outro estudo, células de *Escherichia coli* W3110 (bactéria Gram negativo) foram coradas com uma mistura de corantes fluorescentes BOX+BE+IP. O ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico), BOX ou Bis-oxonol é utilizado para detecção de potencial de membrana, o brometo de etídio (BE) para detecção de células cujo sistema de transporte encontra-se afetado e o iodeto de propídio (IP) para detecção de integridade da membrana. Essa mistura foi utilizada em células de *Escherichia coli* W3110 em fase de crescimento exponencial que foram aquecidas a 60° C por 30 segundos. Tal tratamento térmico induz nesta bactéria não só a perda de potencial de membrana citoplasmática como também a permeabilização da mesma (Nebe-Von-Caron e Badley, 1995; Boswell *et al.*, 1998; Hewitt *et al.*, 1998 e Hewitt *et al.*, 1999). A fluorescência emitida pelas células de *Escherichia coli* coradas com essa mistura permitiu diferenciar quatro subpopulações: células saudáveis, não coradas; células “vitalis” sem o sistema de transporte ativo que exclui o BE e, que, portanto, são coradas por este corante; células intactas sem o sistema de transporte ativo que exclui o BE, mas com potencial de membrana, coradas por BE/BOX; e células mortas com as membranas citoplasmáticas permeabilizadas, coradas por BE+BOX+IP. Outros microrganismos testados (*Citrobacter* spp., *Actinobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp.) revelaram resultados semelhantes, conforme Silva *et al.* (2004).

Ainda, segundo Silva *et al.* (2004), células de *Bacillus licheniformis* CCM11034 foram submetidas a um tratamento térmico a 100° C por 10 minutos e, posteriormente, coradas com uma mistura de corantes contendo um corante do grupo de carbocianinas (“3,3 – 3,3 –

dihexyloxacarbocyanine iodide”, DiOC6(3)) e o corante iodeto de propídeo (IP). Foi possível diferenciar duas subpopulações: células com membranas polarizadas que não são coradas por nenhum dos corantes e outra subpopulação, composta por células coradas por ambos os fluorocromos. A interpretação desta última subpopulação, baseada na coloração dessas células por ambos os corantes, levaria à conclusão de que estas células possuem membranas polarizadas (coradas pelo DiOC6(3)), mas permeabilizadas (coradas pelo IP). Mason *et al.* (1995) observaram que células de *Escherichia coli*, quando submetidas ao mesmo tratamento térmico e coradas com DiOC6(3), apresentavam uma fluorescência superior às células saudáveis com membranas citoplasmáticas polarizadas. Teoricamente, células que são coradas por este composto possuem membranas polarizadas. Assim, esperava-se que, após o tratamento térmico, a fluorescência do DiOC6(3) emitida por células despolarizadas e permeabilizadas fosse baixa ou ausente. Os autores explicaram esta discrepância baseando-se no caráter lipofílico do DiOC6(3). A estrutura das cadeias dos fosfolipídeos das membranas citoplasmáticas das células colapsa quando expostas a elevadas temperaturas, ficando as regiões hidrofóbicas da membrana, expostas e acessíveis ao corante DiOC6(3) que se ligará a esses centros pela sua elevada

afinidade por aquelas regiões. Nesta situação, a emissão de fluorescência do DiOC6(3) detectada em células mortas não é dependente do potencial de membrana, mas sim da afinidade daquele composto pelas regiões hidrofóbicas das membranas expostas.

4.2. Contagem de células somáticas

4.2.1. Comparação entre os métodos de referência e rápido

Os resultados das contagens de células somáticas das amostras de diferentes tipos de leite (cru, pasteurizado e esterilizado) submetidas aos métodos de referência e rápido foram variáveis. A Tabela 4 indica os valores médios e respectivos desvios padrões dos métodos de referência (microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo) utilizados na contagem de células somáticas em leite.

Considerando-se os resultados obtidos para os três tratamentos (leite cru, pasteurizado e esterilizado), verificou-se diferença entre o método de referência de microscopia direta e o método de citometria de fluxo para o leite cru e o esterilizado ($p \leq 0,05$). Apenas, no caso do leite pasteurizado, os resultados obtidos entre os dois métodos não revelaram diferença ($p > 0,05$).

Tabela 4. Valores médios e desvios padrões dos métodos de referência (microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo) utilizados na contagem de células somáticas de leite cru, pasteurizado e esterilizado

Leite	Métodos					
	Contagens de células somáticas (X 1.000)					
	CF (CS/mL)			MD (CS/mL)		
Cru	626 ^B	±	592	1.593 ^A	±	2.821
Pasteurizado	589 ^A	±	582	865 ^A	±	1.377
Esterilizado	594 ^B	±	611	926 ^A	±	687

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

MD= microscopia direta; CF= método eletrônico por citometria de fluxo para contagem de células somáticas.

Babák e Rysánek (1999), ao analisarem amostras de leite com baixos níveis de células somáticas, observaram que as contagens de células somáticas realizadas por citometria de fluxo apresentaram valores mais baixos quando comparados com as contagens feitas por microscopia direta.

Silveira (2002), ao analisar amostras de leite de vacas individuais e de tanques de resfriamento, não verificou diferença ($p > 0,05$) nas contagens de células somáticas obtidas pelo método de microscopia direta com as contagens obtidas por analisador eletrônico (Somacount 500 - Bentley Instruments®).

De acordo com Marshall (1992) e Christen (1993), no método de microscopia direta, apenas células somáticas intactas são contadas. No entanto, este método tem revelado relativo desvio padrão intra e

interlaboratorial. Ampla variação em contagens feitas por diferentes analistas assim como pelo mesmo analista tem sido registrada por certos métodos de triagem ou confirmatórios. Apontam alguns fatores que podem ser responsáveis por tais variações: inacurácia na quantidade utilizada de amostra (0,01 mL), falha na preparação e coloração de lâminas, irregularidade na distribuição de células somáticas nas lâminas, erros em observação e cálculo, dentre outros. Resultados obtidos a partir do uso da microscopia direta devem ser considerados como estimativa apenas, tendo em vista as limitações relacionadas, por exemplo, à falta de habilidade e prática do analista. Neste trabalho, células somáticas que apresentavam forma aproximadamente circular, tamanho variável, mas normalmente grandes, com núcleo individualizado, foram contadas, conforme figura 8.

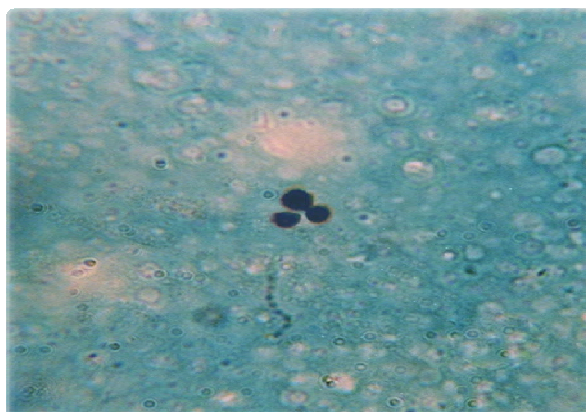


Figura 8. Imagem de fotografia de microscopia direta de células somáticas coradas por azul de metileno 0,6% (ampliação microscópica de 100 X).

Mesmo que a citometria de fluxo tenha subestimado a CCS em leite cru e esterilizado, observou-se correlação positiva e alta entre este método e o da microscopia direta ($r = 0,83$ em leite cru; $r = 0,89$ em leite pasteurizado e $r = 0,52$ em leite esterilizado). Gunasekera *et al.* (2003) observaram boa correlação ($r = 0,88$) entre os métodos de citometria de fluxo e de contagens microscópicas diretas na CCS em amostras de leite cru. Semelhantemente, Andrade *et al.* (2001), observaram correlação positiva e alta ($r = 0,76$) entre os métodos de microscopia direta e de citometria de fluxo na CCS em leite cru de cabra.

4.2.2. Efeito do tratamento térmico na contagem de células somáticas de leite cru, pasteurizado e esterilizado

Os resultados das contagens de células somáticas dos diferentes tipos de leite (cru, pasteurizado e esterilizado) analisados por métodos de referência e de citometria de fluxo foram variáveis. A Tabela 5 registra os valores médios e respectivos desvios padrões em relação à contagem de células somáticas para diferentes tipos de leite (cru,

pasteurizado e esterilizado) analisados por métodos de referência (microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo).

Pelo método da citometria de fluxo em equipamento Somacount 300 (Bentley Instruments®), não foi observada diferença entre as contagens de células somáticas para os leites cru, pasteurizado e esterilizado ($p > 0,05$). Os tratamentos térmicos (pasteurização e esterilização) não interferiram nas contagens celulares realizadas por citometria de fluxo (Anexo 2), uma vez que os resultados foram semelhantes em todos os processamentos ($p > 0,05$). Estes resultados foram similares aos obtidos por Andrade *et al.* (2001) que analisaram a CCS em amostras de leite cru e pasteurizado de cabra por citometria de fluxo. O DNA no núcleo celular reage especificamente com um corante (neste caso, o brometo de etídeo) que fluoresce quando excitado (Christen, 1993). Como o equipamento não conta diretamente as células, mas sim a quantidade de material nuclear, o rompimento delas não compromete a contagem, a não ser que os núcleos percam a capacidade de absorver o corante (Andrade *et al.*, 2001).

Tabela 5. Valores médios e desvios padrões da contagem de células somáticas de leite cru, pasteurizado e esterilizado, realizada por métodos de referência (microscopia direta) e rápido (citometria de fluxo)

Leite	Métodos					
	Contagens de células somáticas (X 1.000)					
	CF (CS/mL)			MD (CS/mL)		
Cru	626 ^a	±	592	1.593 ^a	±	2.821
Pasteurizado	589 ^a	±	582	865 ^b	±	1.377
Esterilizado	594 ^a	±	611	926 ^{ab}	±	687

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

MD= microscopia direta; CF= método eletrônico por citometria de fluxo para contagem de células somáticas.

Pelo método da microscopia direta, verificou-se diferença apenas entre a contagem de células somáticas do leite cru em relação à do leite pasteurizado ($p \leq 0,05$). Maiores contagens de células somáticas foram observadas em leite cru do que em leite pasteurizado (Tabela 5). Estes resultados podem ser atribuídos às limitações de contagem da técnica de microscopia direta. Segundo Marshall (1992), células somáticas em produtos tratados termicamente não coram bem pela coloração de Levowitz-Weber, o que, possivelmente, explica uma baixa contagem no leite pasteurizado.

Segundo Silveira (2002), a coleta de amostras de leite para a análise de células somáticas é muito importante, e pode influenciar na qualidade dos resultados, visto que a célula somática possui grande afinidade pela gordura. No presente trabalho, o teor de gordura parece não ter interferido nas contagens de células somáticas, uma vez que os resultados foram similares para os diferentes tipos de leite (Tabela 6).

4.3. Composição centesimal

Outro importante parâmetro usado na caracterização da qualidade do leite relaciona-se à composição centesimal de seus principais constituintes, como gordura, lactose e proteína. (Pereira *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2000b; Prada e Silva *et al.*, 2000; Bueno *et al.*, 2004b; Gigante, 2004; Leite, 2006).

A Tabela 6 indica os valores médios e desvios padrões dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais de leite cru, pasteurizado e esterilizado realizada pelo método rápido (espectrômetro de infravermelho).

Os componentes que apresentaram menor variação em relação à média foram a lactose e a proteína, enquanto a variação do teor de gordura foi elevada, fato este semelhante ao encontrado por outros autores (Covarrubias e Haverbeck, 1978; Santos *et al.*, 1981; Homan e Wattiaux, 1995; Auldist *et al.*, 1998; Hamann, 2002; Brito *et al.*, 2003; Lindmark-Mansson *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2003; Fonseca, 2005). A maior variabilidade verificada para o componente gordura influencia

diretamente os teores de sólidos totais, o que resulta em elevada correlação entre

estas duas variáveis.

Tabela 6. Valores médios e desvios padrões dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais de leite cru, pasteurizado e esterilizado, analisados em equipamento eletrônico (espectrômetro de infravermelho)

Leite	Gordura	Proteína	Lactose	Sólidos Totais
Cru	3,96 ^a ±0,81	3,18 ^a ±0,18	4,44 ^a ±0,14	12,46 ^a ±0,78
Pasteurizado	3,96 ^a ±0,74	3,20 ^a ±0,14	4,39 ^a ±0,12	12,41 ^a ±0,65
Esterilizado	3,92 ^a ±0,73	3,21 ^a ±0,15	4,41 ^a ±0,13	12,43 ^a ±0,68

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p>0,05).

Segundo Block (2000), Lindmark-Mansson *et al.* (2003) e Reis *et al.* (2004), essa maior variabilidade do teor de gordura deve-se ao fato de se tratar de um nutriente influenciado por fatores genéticos, ambientais e de manejo, especialmente pela nutrição, conforme mencionado por Fonseca (2005). Dados obtidos por Auldist *et al.* (1998) demonstraram que a gordura do leite é influenciada pelo estágio de lactação; assim, a maior variabilidade detectada para esse nutriente pode também estar associada a este fato, visto que neste trabalho as amostras de leite foram obtidas de diferentes rebanhos de diversos produtores sem levar em consideração os estágios de lactação dos animais.

Depois da gordura, o componente que apresentou maior amplitude de variação foi a proteína. Essa escala de variabilidade é corroborada por Sutton (1989) e Machado *et al.* (2000b).

A lactose, um dos componentes com maior constância no leite, pode estar relacionada à manutenção da osmolaridade na glândula mamária, juntamente com os sais minerais, além de estar associada ao próprio processo de produção e secreção do leite. É, portanto, um dos fatores determinantes do volume de leite produzido, pois regula a

entrada de água no lúmen alveolar (Walstra e Jenness, 1984; Homan e Wattiaux, 1995; Fennema, 1996; Davis *et al.*, 1999). Considerando esse fato, a determinação da lactose em amostras de leite individuais pode dar uma indicação grosseira da ocorrência de mastite, embora a contagem de células somáticas seja mais amplamente usada por ser um indicativo mais confiável da saúde do úbere (Harding, 1995; Fonseca, 2005).

O aumento da CCS pode alterar a composição do leite (Oliveira *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 1999; Prada e Silva *et al.*, 2000; Tsenkova *et al.*, 2001; Gigante, 2004; Fonseca, 2005). Esta mudança na composição do leite é causada pela alteração na permeabilidade dos capilares sanguíneos e pela redução na síntese das células secretoras. Conseqüentemente, há redução no teor de lactose, aumento da concentração de alguns íons e de proteínas do soro no leite (Philpot e Nickerson, 2002). Neste trabalho, os valores de correlação encontrados entre CCS (citometria de fluxo) e lactose, proteína, gordura e sólidos totais de leite cru foram de -0,46, -0,04, 0,33 e 0,21, respectivamente. Fonseca (2005) encontrou os seguintes valores de correlação entre CCS (citometria de fluxo) e lactose,

proteína, gordura e sólidos totais: -0,371, -0,046, 0,103 e -0,042. Semelhantemente, essa mudança na composição do leite, como consequência aos altos níveis de CCS, já foi comprovada por outros autores (Pereira *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2000b; Prada e Silva *et al.*, 2000).

Segundo Harding (1995), o leite tem uma composição média de 87,4 g de água e 12,6 g de sólidos totais por 100 g de leite, sendo 3,9 % de gordura; 3,2 % de proteína; 4,6 % de lactose e 0,90 % de minerais e outros sólidos. A Instrução Normativa 51 (Brasil, 2002) estabelece que o leite cru refrigerado deve conter, no mínimo, 2,9% de proteína, 3,0% de gordura e 8,4% de extrato seco desengordurado (ESD).

Considerando os valores atribuídos para um leite de composição normal, o que se pode inferir a partir dos resultados obtidos neste trabalho é que, com relação ao parâmetro de composição centesimal, as amostras, apesar da grande variabilidade encontrada para alguns nutrientes, estão de acordo com o que estabelece a legislação nacional vigente (Brasil, 2002), exceto para a lactose, cujos valores foram menores. No presente trabalho o equipamento eletrônico Bentley Combi System 2300® (Bentley..., 1997; Bentley..., 1998) foi calibrado com amostras padrão de leite cru de origem canadense. Os teores de lactose dessas amostras são baixos, podendo estar relacionados às diferenças genéticas e de manejo nutricional dos rebanhos leiteiros do Canadá, quando comparadas às condições do rebanho leiteiro brasileiro.

4.4. Perspectivas de trabalho futuro

O trabalho realizado suscitou várias questões que poderão ser estudadas em trabalhos futuros, sugerindo-se os seguintes aspectos:

- como foi demonstrado por diversos pesquisadores, a combinação de diferentes fluorocromos relacionados à viabilidade celular (corantes sensíveis a potencial e ou integridade de membrana) foi associada à técnica de citometria de fluxo para diferenciação de células bacterianas. Assim, informações mais precisas sobre a diferenciação celular (células viáveis e não viáveis) em cada tipo de leite (cru, pasteurizado e esterilizado) poderiam ser obtidas mediante a associação da combinação de fluorocromos com a citometria de fluxo;
- alguns pesquisadores demonstraram, ainda, o uso de técnicas de marcação gênica (provas de oligonucleotídeos fluorescentes, marcação com anticorpos fluorescentes) na diferenciação celular, tendo em vista a sua alta especificidade para seqüências de ácidos nucleicos homólogas. Segundo Gunasekera *et al.* (2002), o uso do marcador molecular *gfp* (proteína fluorescente verde) não interfere em crescimento de células, sendo, portanto, recomendado em estudos em que células se encontram sob condições estressantes. Assim, o uso de marcadores gênicos fluorescentes associados à técnica de citometria de fluxo, pode ser uma opção complementar na busca de informações mais precisas sobre o comportamento de células bacterianas frente aos distintos tratamentos térmicos;
- considerando-se que respostas de fluorescência podem variar em função do tipo e da concentração do corante empregado, método de coloração, espécie/amostra

bacteriana, tipo de tratamento a que a amostra de leite foi submetida (tratamento térmico, tratamento com antibióticos), pH e concentração salina do meio (Lepecq e Paoletti, 1967; Mason *et al.*, 1995), é importante que se tenha o controle desses parâmetros na enumeração e diferenciação de populações de células bacterianas em cada tipo de leite (cru, pasteurizado e esterilizado);

- o uso da técnica de microscopia por epifluorescência também possui grande aplicação em estudos de viabilidade celular, por permitir a diferenciação de bactérias baseadas em emissão de fluorescência. O uso dessa técnica, complementar à da microscopia direta, poderia acrescentar informações na contagem bacteriana em cada tipo de leite, pela diferenciação baseada na fluorescência das células.

5. CONCLUSÕES

- A técnica de microscopia direta apresentou alta correlação com a técnica de contagem padrão em placas, podendo ser usada para a calibração do equipamento IBC Bactocount para análise de amostras de leite cru por citometria de fluxo;
- a citometria de fluxo, comparada com as técnicas de microscopia direta e contagem padrão em placas, foi capaz de detectar maior contagem bacteriana em amostras

de leite cru, pasteurizado e esterilizado;

- os tratamentos térmicos exerceram diferentes efeitos nas contagens bacterianas de amostras de leite submetidas à pasteurização e esterilização, quando as técnicas de contagem padrão em placas, citometria de fluxo e microscopia direta foram utilizadas;
- a microscopia direta apresentou alta correlação com a técnica de citometria de fluxo, originando, no entanto, maiores contagens celulares em amostras de leite cru e esterilizado;
- os tratamentos térmicos não exerceram efeitos nas contagens de células somáticas de amostras de leite submetidas à pasteurização e esterilização, quando a técnica por citometria de fluxo foi utilizada;
- a pasteurização reduziu a CCS de amostras de leite submetidas à pasteurização e a esterilização não afetou esta contagem, quando a microscopia direta foi empregada;
- os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos não se alteraram após a pasteurização e esterilização, demonstrando que os tratamentos térmicos empregados não interferiram na composição do leite analisado pela técnica de absorção de comprimento de onda na região do infravermelho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I. *et al.* Contagem de células somáticas em leite de cabra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.3, p. 396-400, 2001.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. *et al.* Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.3, p. 440-446, 2006.

AULDIST, M.J.; WALSH, B.J.; THOMSON, N.A. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research*, v.65, n.3, p.401-411, 1998.

BABÁK, V.; RYSÁNEK, D. Inter-laboratory trials of milk somatic cell counters: a comparison of the fossomatic and somacount systems. *Milchwissenschaft*, v.54, n.3, p.126-128, 1999.

BARRIENTOS, A.A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R.; *et al.* Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v.13, n.2, p.167-195, 2000.

BASCUNÁN, C.C. Perspectivas da estimulação da resposta imune da glândula mamária bovina. In: O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2004. Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UPF, 2004. p.105-129.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Somacount 300 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997. 116 p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bentley 2000 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 79 p.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. *Bactocount 150 operator's manual*. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49 p.

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.

BIGGS, D.A.; JOHNSON, G.; SJAUNJA, L.O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infra-red absorption. *Bulletin of the IDF*, n. 208. Brussels: *International Dairy Federation*, p.21-29, 1987.

BLOCK, E. Nutrição de vacas leiteiras e composição do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., Curitiba. *Anais...* Curitiba: Centro Integrado dos Empresários e Trabalhadores das Indústrias do Paraná - CIETEP/FIEP, 2000, p.85-88.

BOSWELL, C.D.; HEWITT, C.J.; MACASKIE, L.E. An application of bacterial flow cytometry: evaluation of toxic effects of four heavy metals on *Acinetobacter* sp. with potential for bioremediation of contaminated wastewaters. *Biotechnology Letters*, v.20, n.9, p.857-863, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952*. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 07 jul. 1952. Seção 1, p. 10785.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Portaria nº 1, de 07 de outubro de 1981*. Aprova os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes, constituindo-se em métodos microbiológicos e métodos físicos e

químicos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 13 out. 1981. Seção 1, p. 19381.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 101, de 11 de agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - métodos microbiológicos (anexo) determinando seu emprego em todas as atividades desenvolvidas pela rede oficial do sistema coordenado pela Coordenação Geral de Laboratório Animal - CGLA do Departamento de Defesa Animal - DDA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 17 ago. 1993. Seção 1, p. 11937.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Aprova a inclusão do citrato de sódio no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite U.H.T. (U.A.T.). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19700.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o Regulamento Técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário*

Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. A composição e a qualidade do leite. In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. (Eds.). *A qualidade do leite*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1998, p.46-50.

BRITO, M.A.V.P. Conceitos básicos da qualidade. In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. (Eds.). *Sanidade do gado leiteiro*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999, p.59-66.

BRITO, J.R.F.; SOUZA, G.N.; BRITO, M.A.V.P.; *et al.* Panorama da qualidade do leite na Região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. (Eds.) *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p.47-61.

BROCK, T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; *et al.* *Biology of microorganisms*. 7 ed. New Jersey: Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1994. 909 p.

BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UPF, 2004. p. 317-331.

- BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; OLIVEIRA, J.P. *et al.* Influência da temperatura de armazenamento e do sistema de utilização do tanque de expansão sobre a qualidade microbiológica do leite cru. *Revista Higiene Alimentar*, v.18, n.121, p.62-67, 2004a.
- BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; *et al.* Variações na composição centesimal do leite em função das contagens celular somática e bacteriana total no estado de Goiás. In: O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UPF, 2004b. p. 301-306.
- BURCHARD, J.F.; BLOCK, E. Nutrição do gado leiteiro e composição do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE LEITE, 1., 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.16-19.
- CASSOLI, L.D. *Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru*. 2005. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP.
- CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F.; RODRIGUES, A.C.O.; *et al.* Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count. *International Journal of Dairy Technology*, v.60, n.1, p.44-48, 2007.
- CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; RODRIGUES, R. *et al.* Características microbiológicas de leite cru e beneficiado em Belo Horizonte (MG). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.46, n.6, p.713-721, 1994.
- CHRISTEN, G.L. Analyses. In: HUY, Y.H. *Dairy Science and Technology Handbook*. New York: VCH Publishers, 1993, v.1, p. 83-156.
- CIMIANO, P. C. Panorama geral dos métodos instrumentais para a análise dos constituintes do leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.29, n.176, p.16-22, 1974.
- COVARRUBIAS, M.P.; HAVERBECK, J. Variações na qualidade do leite cru fase estábulo-indústria leiteira. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.33, n.195, p.3-12, 1978.
- DAVIS, S.R.; FARR, V.C; STELWAGEN, K. Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review. *Livestock Production Science*, v.59, n.1, p.77-94, 1999.
- EDMONDSON, P.W. Estratégias para a produção de leite de alta qualidade. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DA MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. *Anais...* São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002. p.34-45.
- FENNEMA, O.R. *Food Chemistry*. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996, 1069 p.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle da mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.
- FONSECA, C.S.P. *Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais*. 2005. 62 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. 182 p.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. *Food Microbiology*. 3 ed. New York: Mc Graw-Hill, 1978. 540p.

GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: Dürr, J.W. *et al* (Eds.). O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UPF, 2004. p.235-254.

GINN, R.; PACKARD, V. A study of control of infra-red instruments used in analysis of various components of raw milk. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, v.9, n.1, p.8-13, 1989.

GOFF, H.D.; HILL, A.R. Chemistry and Physics. In: HUY, Y.H. *Dairy Science and Technology Handbook*. New York: VCH Publishers, 1993, v.1, p.1-82.

GONÇALO, E.B. Boas Práticas de Fabricação e o Sistema APPCC na fabricação de sorvetes. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 57, n.327, p.79-98, 2002.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; *et al*. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. *Ciência e Agrotecnologia*, v.29, n.1, p.216-222, 2005.

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.

GUNASEKERA, T.S.; ATTFIELD, P.V.; VEAL, D.A. *et al*. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.4, p.1988-1993, 2002.

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, n.3, p.269-279, 2003.

HAMANN, J. Relationships between somatic cell count and milk composition. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n. 372, p.56-59, 2002.

HARDING, F. *Milk quality*. New York: Blackie Academic & Professional, 1995. 165 p.

HARMON, R.J. Fatores que afetam as contagens de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE LEITE, 1., 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.7-15.

HARVEY, J. A high performance liquid chromatography method for lactose determination in milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v.43, n.1, p.19-20, 1988.

HEGGUM, C. Trends in hygiene management – the dairy sector example. *Food Control*, v.12, n. 4, p. 241-246, 2001.

HEWITT, C.J.; BOON, L.A.; MCFARLANE, C.M. *et al*. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v.59, n.5, p.612-620, 1998.

HEWITT, C.J.; NEBE-VON-CARON, G.; NIENOW, A.W.; *et al*. The use of multi-parameter flow cytometry to compare the physiological response of *Escherichia coli* W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture

cultivations. *Journal of Biotechnology*, v.75, n.2, p.251-264, 1999.

HEWITT, C.J.; NEBE-VON-CARON, G. An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Cytometry*, v.44, n.3, p.179-187, 2001.

HILLERTON, E. Contagem bacteriana no leite: importância para a indústria e medidas de controle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Curitiba. *Anais...* Curitiba: 2000. p.26-31.

HOLM, C.; MATHIASSEN, T.; JESPERSEN, L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *Journal of Applied Microbiology*, v.97, n.5, p.935-941, 2004.

HOMAN, E.J.; WATTIAUX, M.A. *Dairy technical guide: lactation and milking*. Madison: University of Wisconsin-Madison, 1995. 94 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002 – 2003. Aquisição alimentar domiciliar per capita. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002/pof2002.pdf>>. Acesso em: 14 de dezembro de 2007.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. *IDF Standard 120*. Brussels: International Dairy Federation, 1980. 4p.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk. Determination of fat content. *IDF Standard 1 C*. Brussels: International Dairy Federation, 1987a.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk. Determination of total solids content. *IDF Standard 21 B*. Brussels: International Dairy Federation, 1987b.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Methods for estimating colony forming units. *IDF Standard 256*. Brussels: International Dairy Federation, 1991a. 5 p.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Microscopic (or direct) methods for estimation of bacteria. *IDF Standard 256*. Brussels: International Dairy Federation, 1991b. 4 p.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk. Enumeration of somatic cells. *IDF Standard 148 A*. Brussels: International Dairy Federation, 1991c.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk. Determination of nitrogen content. *IDF Standard 20 B*. Brussels: International Dairy Federation, 1993.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk and milk products – Guidance on sampling. *IDF Standard 50 C*. Brussels: International Dairy Federation, 1995. 25p.

INTERNATIONAL Dairy Federation. Whole milk – determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. *IDF Standard 141 B*. Brussels: International Dairy Federation, 1996.

JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3 ed. Zaragoza: Editorial Acirbia, S.A., 1994. 804 p.

JEPRAS, R.I.; CARTER, J.; PEARSON, S.C. *et al.* Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.7, p.2696-2701, 1995.

- KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, v.48, n.1, p.167-188, 1981.
- KROGER, M. Milk sample preservation. *Journal of Dairy Science*, v.68, n.3, p.783-787, 1985.
- LAMAITA, H.C. *Frequência de espécies de Staphylococcus, de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de Minas Gerais*. 2003. 74f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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.
- LEPECQ, J.B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *Journal Molecular Biology*, v.27, n.1, p.87-106, 1967.
- LINDMARK-MANSSON, H.; FONDÉN, R.; PETTERSSON, H.E. Composition of swedish dairy milk. *International Dairy Journal*, v.13, n.6, p.409-425, 2003.
- MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; PRADA E SILVA, L.F.; *et al.* Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. *Scientia Agricola*, v.57, n.2, p.359-361, 2000a.
- MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n.6, p.1883-1886, 2000b.
- MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D.; COLDEBELLA, A.; *et al.* Panorama da qualidade do leite na região Sudeste - São Paulo. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. (Eds.) *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p.39-48.
- MARSHALL, R.T. *Standard methods for the examination of dairy products*. Baltimore: American Public Health Association, 1992. 546 p.
- MASON, D.J.; LOPÉZ-AMORÓS, R.; ALLMAN, R; *et al.* The ability of membrane potential dyes and calcafluor white to distinguish between viable and non-viable bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, v.78, n.7, p.309-315, 1995.
- MAXCY, R. B.; LIEWEN, M. B. Function of preliminary incubation of raw milk samples for quality control. *Journal of Dairy Science*, v.72, n.6, p.1443-1445, 1989.
- MIDGLEY, M. An efflux system for cationic dyes and related compounds in *E coli*. *Microbiology Science*, v.4, n.4, p.125-127, 1987.
- MONARDES, H. Programa de pagamento de leite por qualidade em Québec, Canadá. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.40-43.
- MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Troubleshooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, v.20, n.3, p.606-611, 2000.
- NEBE-VON-CARON, G.; BADLEY, R.A. Viability assessment of bacteria in mixed

populations using flow cytometry. *Journal of Microscopy*, v.179, n.1, p.55-66, 1995.

NEBE-VON-CARON, G.; STEPHENS, P.J.; HEWITT, C.J.; *et al.* Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal Microbiology Methods*, v.42, n.1, p.97-114, 2000.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; *et al.* Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.1, p.191-195, 2005.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R.; *et al.* Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.3 (supl.), p.1129-1135, 2006.

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, v.13, n.62, p.10-16, 1999.

PAULA, M.C.; RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G.; *et al.* Contagem de células somáticas em amostras de leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.5, p.1303-1308, 2004.

PEREIRA, A.R.; PRADA E SILVA, L.F.; MOLON, L.K. *et al.* Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I - gordura e proteína. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.36, n.3, p. 121-124, 1999.

PHILPOT, W.N. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE

QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998. p.28-35.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Vencendo a luta contra a mastite*. São Paulo: Ed. Milkbuzz, 2002. 188p.

PICININ, L.C.A. *Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais*. 2003. 89f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófilas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.3, p.645-651, 2006.

PORTER, J.; DEERE, D.; PICKUP, R.; *et al.* Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. *Cytometry*, v.23, n.1, p.91-96, 1996.

PRADA E SILVA, L.F.; PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; *et al.* Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II - lactose e sólidos totais. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.37, n.4, p.330-333, 2000.

REIS, R.B.; GLÓRIA, J.R.; VIEIRA, L.R.; *et al.* Manipulação da composição do leite pela nutrição da vaca. In: SIMPÓSIO DO AGRONEGÓCIO DO LEITE: PRODUÇÃO E QUALIDADE, 1., 2004, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2004 (CD-ROM).

RIBAS, N.P. Importância da contagem de células somáticas para a saúde da glândula mamária e qualidade do leite. In: INTERLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO

INTENSIVA DE LEITE, 4., 1999, Caxambu. *Anais...* São Paulo, 1999. p.77-87.

RIBAS, N.P. Valor e uso da contagem de células somáticas no manejo de rebanhos leiteiros. In: CONGRESSO HOLSTEIN DE LÂS AMERICAS, 6., 2001, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2001. p.47-61.

ROMBAUT, R.; DEWETTINCK, K.; MANGELAERE, G.; *et al.* Raw milk microbial quality and production scale of Belgian dairy farms. *Milchwissenschaft*, v.57, n.11/12, p.625-628, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning – a laboratory manual*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Paginação irregular.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.

SANTOS, E.C.; HAJDENWURCEL, J.R.; VILELA, M.A.P. Influência sazonal na composição de alguns constituintes do leite da bacia leiteira de Juiz de Fora. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 36, n.219, p.3-9, 1981.

SHAPIRO, H.M. Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods*, v.21, n.3, p.271-279, 2000.

SILVA, B.O.; ANDRADE FILHO, R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; *et al.* Avaliação microbiológica de leite submetido à coleta a granel e termização. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 17. 2000, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: EPAMIG/CT/ILCT, 2000. p.68-73.

SILVA, T.L.; REIS, A.; ROSEIRO, J.C.; *et al.* Citometria de fluxo – funcionalidade

celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*, n.78, p.32-40, 2004. Disponível em: <<http://dequim.ist.utl.pt/bbio/77/pdf/citometria2.pdf>>. Acesso em: 14 de dezembro de 2007.

SILVEIRA, T.M.L. *Comparação dos métodos de referência e de análise eletrônica na determinação da composição e da contagem de células somáticas do leite bovino*. 2002. 42 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SENA, M.J.; *et al.* Avaliação da qualidade do leite resfriado, estocado em propriedades rurais por 48 horas e recebido por uma indústria de laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, n.309, p.238-241, 1999.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; *et al.* Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n.2, p.251-260, 2005.

SUHREN, G.; REICHMUTH, J. Interpretation of quantitative microbiological results. *Milchwissenschaft*, v.55, n.1, p.18-22, 2000.

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.

SUTTON, J.D. Altering milk composition by feeding. *Journal of Dairy Science*, v.72, n.10, p.2801-2814, 1989.

TSENKOVA, R.; ATANASSOVA, S.; OZAKI, Y. *et al.* Near-infrared spectroscopy for biomonitoring: influence

of somatic cell count on cow's milk composition analysis. *International Dairy Journal*, v.11, n.10, p.779-783, 2001.

VALEEVA, N.I.; MEUWISSEN, M.P.M.; LANSINK, A.G.J.M.O.; *et al.* Improving food safety within the dairy chain: an application of conjoint analysis. *Journal of Dairy Science*, v.88, n.4, p.1601-1612, 2005.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. *Milk and milk products: technology,*

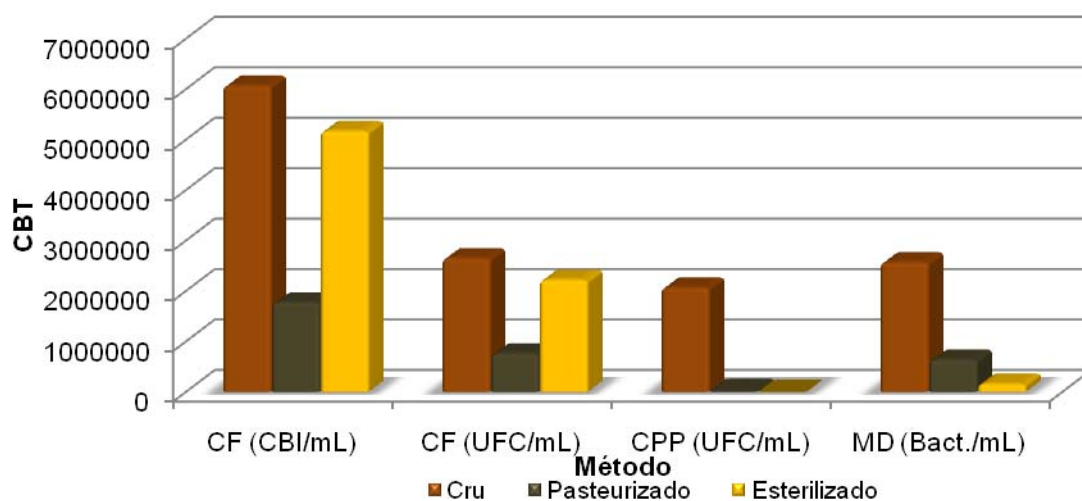
chemistry and microbiology. London: Chapman & Hall, 1994. 451 p.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Dairy chemistry and physics.* New York: John Wiley & Sons, 1984. 457 p.

WOLFSCHOON, A.F. Análise do leite por espectroscopia infravermelha – 2ª parte. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.32, n.191, p.3-10, 1977.

7. ANEXOS

Anexo 1. Efeito do tratamento térmico na contagem bacteriana total de leite cru, pasteurizado e esterilizado.



Anexo 2. Efeito do tratamento térmico na contagem de células somáticas de leite cru, pasteurizado e esterilizado

