

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE MICRO-ORGANISMOS NA
CONTAGEM BACTERIANA TOTAL E DE CÉLULAS SOMÁTICAS POR
CITOMETRIA DE FLUXO E NA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO LEITE
CRU**

VALÉRIA SAMPAIO COSTA SALOMÃO

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2012**

VALÉRIA SAMPAIO COSTA SALOMÃO

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE MICRO-ORGANISMOS NA
CONTAGEM BACTERIANA TOTAL E DE CÉLULAS SOMÁTICAS POR
CITOMETRIA DE FLUXO E NA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO LEITE
CRU**

**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. Dr^a. Mônica Maria Oliveira
Pinho Cerqueira**

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação defendida e aprovada em 27 de fevereiro de 2012

**Dr^a. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
(Orientadora)**

Dr^a. Cláudia Freire de Andrade Morais Penna

Dr. Luiz Simeão do Carmo

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, por todas as graças colocadas na minha vida.

Ao meu marido, Nélio, por seu incentivo, apoio e por ser meu companheiro incondicionalmente.

A minha amada família, especialmente a minha mãe, Rosângela, e minha irmã Fernanda, por terem me proporcionado condições para fazer esse mestrado.

A minha orientadora, Mônica Pinho, grande exemplo profissional, por depositar sua confiança em mim e ter me fortalecido nos momentos em que precisei.

Aos professores Marcelo Resende e Cláudia Penna, por serem pessoas tão bacanas, tanto como pessoas como quanto profissionais.

A Maura, por suas instruções e pela paciência.

A todos os doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica que me ajudaram durante o experimento: Fernando, Denise, Carolina, Renata, Gislaine, Flávia e Guilherme.

Aos funcionários do LabUFMG, especialmente a Fabíola e Luana, pela grande ajuda durante a realização do experimento.

Ao Danilo e ao Guilherme Rocha, pela colaboração nas análises estatísticas.

A todos que me ajudaram de alguma forma, seja na execução do trabalho, seja com uma palavra de apoio. Valeu à pena ter mais uma jornada vencida!

“Deus nos faz perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Qualidade do leite.....	13
2.1.1. Contagem de células somáticas.....	14
2.1.2. Composição centesimal.....	15
2.1.3. Contagem bacteriana total.....	17
2.2. Tipos de micro-organismos que contaminam o leite.....	19
2.2.1. Bactérias psicrotróficas.....	19
2.2.2. Bactérias mesófilas.....	21
2.2.3. Bactérias termófilas e termodúricas.....	22
2.3. Métodos de contagem bacteriana.....	22
2.3.1. Contagem padrão em placas.....	23
2.3.2. Citometria de fluxo.....	23
2.4. Métodos de contagem de células somáticas.....	26
2.5. Método analítico eletrônico para determinação da composição centesimal do leite.....	27
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Coleta e conservação das amostras.....	28
4.2. Análises laboratoriais.....	28
4.2.1. Contagem padrão em placas.....	28
4.2.2. Contagem bacteriana por citometria de fluxo.....	29
4.2.3. Contagem de células somáticas.....	29
4.2.4. Composição centesimal.....	29
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Contagem bacteriana total.....	30
5.1.1. Contagem padrão em placas de psicrotróficos, mesófilos, termófilos e termodúricos.....	31
5.1.2. Comparação entre os resultados de contagem bacteriana do leite obtidos por citometria de fluxo e por contagem padrão em placas.....	32
5.1.3. Correlação entre a contagem bacteriana total por citometria de fluxo e a contagem padrão em placas de psicrotróficos, mesófilos, termófilos e termodúricos....	33
5.1.4. Regressão linear entre as contagens bacterianas de mesófilos e psicrotróficos obtidas pelo método de referência e a contagem bacteriana total determinada por citometria de fluxo.....	34
5.2. Composição centesimal do leite.....	36
5.2.1. Correlação entre os teores dos constituintes do leite e a contagem de psicrotróficos.....	36

5.2.2. Correlação entre a composição centesimal e a contagem bacteriana total do leite.....	37
5.3. Contagem de células somáticas.....	38
5.3.1. Correlação entre a contagem de células somáticas e a composição centesimal do leite.....	38
5.3.2. Correlação entre a contagem de células somáticas e a contagem bacteriana total.....	40
6. CONCLUSÕES.....	40
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do crescimento de psicrotróficos no leite cru antes do tratamento térmico sobre a qualidade dos produtos lácteos.....	20
Tabela 2. Distribuição das amostras de leite cru refrigerado em classes de acordo com a contagem bacteriana total.....	30
Tabela 3. Médias e desvios padrão das contagens dos grupos de micro-organismos do leite pelo método de referência.....	31
Tabela 4. Médias e desvios padrão dos valores de contagem bacteriana total obtidos pelo método de referência e por citometria de fluxo.....	32
Tabela 5. Coeficientes de correlação entre a contagem bacteriana total obtida por citometria de fluxo e as contagens padrão em placas dos grupos de micro-organismos do leite.....	33
Tabela 6. Média e desvio padrão dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado.....	36
Tabela 7. Correlação entre o logaritmo da contagem de psicrotróficos e os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado.....	37
Tabela 8. Correlação entre o logaritmo da contagem bacteriana total e os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado.....	37
Tabela 9. Correlação entre o logaritmo da contagem de células somáticas (log de céls./mL) e os teores percentuais de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado.....	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. . Esquema de funcionamento do citômetro de fluxo (adaptado de Foss Electric®, Hillerod, Dinamarca).....26
- Figura 2 Foto do equipamento eletrônico IBC Bactocount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem bacteriana total em amostras de leite.....26
- Figura 3. Foto do equipamento eletrônico Somacount 300 da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem de células somáticas em amostras de leite.....27
- Figura 4. Representação gráfica da regressão linear estabelecida entre a contagem de mesófilos e a contagem bacteriana determinada por citometria de fluxo.....35
- Figura 5. Representação gráfica da regressão linear estabelecida entre a contagem de psicrotóxicos e a contagem bacteriana determinada por citometria de fluxo.....35

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Requisitos microbiológicos e de CCS a serem avaliados pela RBQL.....14

LISTA DE ABREVIACÕES

- APHA – American Public Health Association
- BE – Brometo de Etídeo
- CBI – Contagem Bacteriana Individual
- CBT – Contagem Bacteriana Total
- CCS – Contagem de Células Somáticas
- Céls/mL- Células por mililitro
- CPP – Contagem Padrão em Placas
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- ESD – Extrato Seco Desengordurado
- EST – Extrato Seco Total
- IN 51 - Instrução Normativa nº 51
- IN 62 – Instrução Normativa nº 62
- IDF – International Dairy Federation
- IP – Iodeto de Propídio
- Log _ Logaritmo

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

RBS – Fluido carreador usado em citometria de fluxo

RBQL – Rede Brasileira de Laboratórios de Análise de Qualidade do Leite

RNA – Ácido ribonucléico

UFC/mL – Unidades formadoras de colônias por mililitro

RESUMO

Foi feita a contagem bacteriana de 179 amostras de leite cru refrigerado provenientes de diferentes bacias leiteiras de Minas Gerais, pelos métodos de citometria de fluxo e contagem padrão em placas. Os resultados obtidos pelos diferentes métodos foram analisados através da correlação de Pearson. Houve correlação significativa entre os valores de contagem de psicrotróficos e mesófilos determinados pelo método de referência com os valores de contagem bacteriana total determinados por citometria de fluxo ($r = 0,6695$ e $0,7008$, respectivamente), sendo possível estabelecer equações de regressão linear para a contagem bacteriana obtida por citometria de fluxo em função da contagem de mesófilos ($\log \text{CBI} = 0,7011 \log \text{mesófilos} + 1,9091$) e psicrotróficos ($\log \text{CBI} = 0,4703 \log \text{psicrotróficos} + 3,2784$). Não foi possível estabelecer curvas de calibrações para termófilos e termodúricos, pois os coeficientes de correlação obtidos entre a contagem desses micro-organismos e a contagem bacteriana total, determinada por citometria de fluxo, foram baixos ($r = 0,2996$ e $0,2746$, respectivamente). Adicionalmente, foram determinados os coeficientes de correlação entre a contagem de psicrotróficos e os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite, através da correlação de Spearman. Houve uma fraca correlação negativa ($p < 0,01$) para os teores de gordura e sólidos totais ($r = -0,2198$ e $-0,1635$, respectivamente). Também foi encontrada uma fraca correlação negativa ($p < 0,01$) entre a contagem de células somáticas (análises realizadas no equipamento Somacount, Bentley) e os teores de sólidos totais ($r = -0,1346$), e alta correlação entre a contagem de células somáticas e os teores de lactose ($r = -0,7180$) empregando-se a correlação de Spearman. Não houve correlação entre a contagem bacteriana total e a contagem de células somáticas do leite. Os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite apresentaram correlações fracas e negativa ($p < 0,05$) com a contagem bacteriana total ($r = -0,2130$; $-0,1772$; $-0,1912$ e $0,2335$; respectivamente).

Palavras-Chave: micro-organismos, qualidade do leite, contagem bacteriana total, citometria de fluxo, contagem padrão em placas, composição centesimal do leite, contagem de células somáticas.

ABSTRACT

Bacterial count was made of 179 raw milk samples from different dairy farms of Minas Gerais, Brazil, through the methods of flow cytometry and standard plate count, the reference method. The results obtained by different methods were analyzed by Pearson correlation. There was significant correlation between the values of psychrotrophic and mesophilic counts determined by the reference method with the values of bacterial count determined by flow cytometry ($r = 0.6695$ and 0.7008 , respectively), being possible to establish linear regression equations for bacterial count obtained by flow cytometry according to the count of mesophilic ($\log \text{CBI by flow cytometry} = 0.701 \log \text{mesophilic} + 1.9091$) and psychrotrophic ($\log \text{CBI by flow cytometry} = 0.4703 \log \text{psychrotrophic} + 3.2784$). It was not possible to establish calibration curves for thermophiles and thermotolerants because the correlation coefficients obtained among the count of these organisms and total bacterial count determined by flow cytometry were low ($r = 0.2996$ and 0.2746 , respectively). Additionally, the correlation coefficients among the psychrotrophic count and the percentage of fat, protein, lactose and total solids of milk were determined, through the Spearman correlation. There was weak negative correlation ($p < 0.01$) for fat and total solids ($r = -0.2198$ and -0.1635 , respectively). There was also weak negative correlation ($p < 0.01$) between somatic cell count (analysis performed on the Bentley Somacount® equipment) and milk total solids content ($r = -0.1346$) and strong negative correlation between somatic cell count and lactose content ($r = -0.7180$) using the Spearman correlation. There was weak negative correlation between total bacterial count and somatic cell count in milk. The fat, protein, lactose and total solids of milk showed a negative correlation ($p < 0.05$) with the total bacterial count ($r = -0.2130$; -0.1772 ; -0.1912 and -0.2335 ; respectively).

Key words: microorganisms, milk quality, total bacterial count, flow cytometry, standard plate count, chemical composition of milk, somatic cell count.

1. INTRODUÇÃO

Em 2009, o Brasil produziu 29.112.000 toneladas de leite, o que corresponde a 5% da produção total mundial, posicionando o país como 5º maior produtor. Entretanto, um desenvolvimento mais acelerado da atividade é impedido devido às características da produção leiteira brasileira. A maior parte dos produtores brasileiros é classificada como pequenos ou médios, com produção diária de 50 a 100L e de caráter familiar. Conseqüentemente, o investimento na atividade é menor, acarretando em baixa tecnificação, falta de controle sanitário dos animais e condições higiênicas inadequadas durante a ordenha, conservação e transporte. Essas deficiências refletem na baixa produtividade do rebanho nacional e redução da qualidade do leite produzido (Nero, Viçosa e Pereira, 2009; EMBRAPA GADO DE LEITE, 2009).

A busca por melhoria na qualidade do leite é um tema muito relevante na atualidade, pois além de tornar o produto mais seguro para o consumo, aumenta a vida de prateleira e torna o setor laticinista brasileiro mais competitivo frente ao mercado internacional (Leite, 2006).

Ao longo dos anos, os consumidores têm mudado seu conceito de qualidade alimentar. Nos anos 60, a composição nutricional definia a qualidade do alimento. Nos anos 70, o alvo das preocupações tornou-se a ausência de resíduos químicos. Nos anos 80, houve a definição dos níveis máximos de resíduos, drogas, aditivos e contaminantes. Ao longo dos anos 90, os consumidores passaram a dar prioridade aos alimentos ricos em proteínas, minerais, vitaminas e ácidos graxos essenciais, e que não ofereçam riscos à saúde (Monardes, 2004).

A qualidade dos produtos lácteos é caracterizada pela qualidade higiênica (ou

inocuidade), qualidade composicional, qualidade sensorial e qualidade tecnológica. A qualidade higiênica é definida pela ausência de agentes físicos, químicos ou biológicos que apresentem riscos à saúde do consumidor, tais como substâncias estranhas, antimicrobianos, pesticidas e herbicidas, patógenos, toxinas, etc. No que diz respeito à qualidade composicional, os teores de gordura, proteína, lactose, vitaminas e minerais devem corresponder à própria natureza do produto. A qualidade sensorial é aquela percebida pelos sentidos do paladar, olfato e visão sendo que, para esta avaliação, o leite considerado normal é um líquido branco, opaco e homogêneo, de sabor e odor característicos. Por fim, a qualidade tecnológica é traduzida como a adequação do leite para o processamento, armazenagem e distribuição (Picinin, 2003).

Com o intuito de garantir uma maior padronização do leite cru comercializado no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou a Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002) que estabelece limites para a contagem padrão em placas, contagem de células somáticas e padrões físicos e químicos para o leite cru refrigerado.

A contagem padrão em placas é o método de referência para a contagem bacteriana total. Em virtude da demora da execução desta técnica, métodos rápidos baseados em citometria de fluxo têm sido usados para contagem bacteriana total (CBT) e também para a contagem de células somáticas (CCS). Um problema observado refere-se à transformação dos valores lidos em contagem bacteriana individual (CBI) em unidades formadoras de colônia (UFC). Muitos fatores podem interferir nesta transformação e conseqüentemente, na curva de calibração do equipamento. Entre eles, destacam-se os diferentes tipos de micro-organismos presentes no leite cru.

Considerando a escassez de informações na literatura, este trabalho se propõe a estudar a influência dos diferentes tipos de micro-organismos presentes no leite cru sobre a contagem bacteriana por citometria de fluxo, a contagem de células somáticas (CCS) e ainda, sobre a composição do leite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Qualidade do leite

Para produção de leite nutritivo e seguro, em setembro de 2002, foi publicada a Instrução Normativa nº 51. Esta entrou em vigor em julho de 2005 e determina que as indústrias de laticínios sob Inspeção Federal tenham que enviar amostras de cada uma das propriedades rurais que lhes fornecem leite para análises mensais em um dos laboratórios da Rede Brasileira de Controle da Qualidade (RBQL). As amostras de leite devem ser analisadas quanto aos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD), a contagem de células somáticas (CCS), a pesquisa de resíduos de antimicrobianos, a determinação do índice crioscópico e a contagem bacteriana total (CBT) (Brasil, 2002).

A RBQL possui laboratórios ligados às seguintes entidades: Universidade de Passo Fundo (RS); Universidade Federal do Paraná/ Associação de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (PR); Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP (SP); Embrapa Gado de Leite (MG); Universidade Federal de Goiás (GO); Universidade Federal de Minas Gerais (MG) e na Universidade Federal Rural de Pernambuco (PE) (Dürr, 2004).

Atualmente, há um laboratório localizado em Santa Catarina (CIDASC) e outro, de

referência, localizado no LANAGRO, em Minas Gerais.

Um importante parâmetro utilizado para se verificar a qualidade do leite é o seu perfil microbiológico, determinado principalmente pela forma de obtenção, armazenamento e transporte. Grupos específicos de micro-organismos são pesquisados para esse fim, como os aeróbios mesófilos, coliformes e psicrotóxicos. A presença de altos níveis de contaminação microbiana no leite e seus derivados compromete a durabilidade desses produtos, devido à deterioração dos seus componentes (Guimarães, 2002).

Os parâmetros fixados pela IN 51 visam compatibilizar a qualidade de leite e derivados produzidos no Brasil com os padrões mundiais. No que diz respeito à composição centesimal do leite cru refrigerado, foram estabelecidos os limites mínimos de 2,9% de proteína, 3,0% de gordura, e 8,4% de ESD (Brasil, 2002).

A Instrução Normativa nº 62 (IN 62), publicada em dezembro de 2011, estabelece mudanças nos prazos e nos valores máximos de contagem bacteriana e de células somáticas permitidos, até que sejam alcançados os limites máximos de contagem de 100.000UFC/mL e 400.000 cél./mL (julho de 2016 e julho de 2017 de acordo com a região do Brasil). O valor máximo permitido para a contagem bacteriana e para a contagem de células somáticas no período de 01/01/2012 até 30/06/2014 será de 600.000 UFC/mL e 600.000 céls./mL, respectivamente, nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, e de 750.000 UFC/mL e 750.000 céls./mL nas regiões Norte e Nordeste. As mudanças nos requisitos de CCS e CBT no Brasil podem ser vistas no quadro 1 (Brasil, 2011).

Quadro 1. Requisitos microbiológicos e de CCS a serem avaliados pela RBQL segundo a Instrução Normativa Número 62 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Índice medido (por propriedade rural ou por tanque comunitário)	De 01.07.2008 até 31.12.2011 Regiões: S/SE/CO De 01.07.2010 até 31/12/2012 Regiões: N/NE	De 01.01.2012 até 30.06.2014 Regiões: S/SE/CO De 01.01.2013 até 30.06.2015 Regiões: N/NE	De 01.07.2014 até 30.06.2016 Regiões: S/SE/CO De 01.07.2015 até 30.06.2017 Regiões: N/NE	A partir de 01.07.2016 Regiões: S/SE/CO A partir de 01.07.2017 Regiões: N/NE
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre o período de três meses)	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $3,0 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em céls/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre o período de três meses)	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $5,0 \times 10^5$	Máximo de $4,0 \times 10^5$

Fonte: Adaptado de Brasil (2011).

2.1.1. Contagem de Células Somáticas

A contagem de células somáticas (CCS) é o parâmetro de qualidade do leite mais utilizado internacionalmente. Funciona como indicador da saúde da glândula mamária, da produção de leite do rebanho, da composição e da qualidade do leite. Segundo Machado et al. (2003), o parâmetro determinante da qualidade do leite mais difícil de ser trabalhado é a contagem de células somáticas, seguido pela composição e contagem bacteriana.

As células somáticas são constituídas por dois grupos de células: as advindas da resposta inflamatória na glândula mamária, como os leucócitos; e as oriundas dos processos de renovação natural e reparo a injúrias (células epiteliais). Essas últimas

são encontradas em menor proporção, e variam de 0 a 7 % do conjunto total de células (Harmon, 1998).

Assim, a contagem de células somáticas permite avaliar o grau de inflamação da glândula mamária. A avaliação periódica da CCS do leite de tanque do rebanho permite a determinação da incidência média de mastite no rebanho. A correlação entre a CCS média do tanque e a ocorrência de mastite é alta, e varia de 0,50 a 0,96. A manutenção de baixa CCS no tanque é um indicativo de boa saúde da glândula (Emanuelson e Funke, 1991).

Devido à resposta inflamatória ocasionada pela mastite, ocorre uma alteração na composição do leite. Segundo Bueno et al. (2004), contagens acima de 200.000

céls./mL causam alterações significativas no teor de gordura, proteína, lactose e sólidos totais.

A colonização da glândula mamária por bactérias patogênicas promove alterações na permeabilidade dos capilares sanguíneos e redução na capacidade de síntese das células secretoras. As concentrações de lactose e de caseína são menores no leite de vacas com mastite, e há aumento da concentração de íons (Na, Cl) e proteínas sanguíneas (Kitchen, 1981).

Quanto ao efeito da mastite sobre a concentração de gordura no leite, os dados encontrados na literatura são conflitantes. Em geral, a porcentagem de gordura apresenta uma pequena queda devido à infecção no úbere. Entretanto, alguns trabalhos mostram que a gordura pode ser concentrada no leite quando a produção de leite é reduzida mais intensamente que a síntese de gordura (Kitchen, 1981; Machado, Pereira e Sarries, 2000).

Além do efeito na composição e na produção do leite, a mastite provoca modificação da atividade enzimática e aumento da contaminação microbiana do leite. Uma importante alteração enzimática é o aumento da plasmina, uma enzima proteolítica derivada do plasminogênio, seu precursor inativo. O leite tem quatro vezes mais plasminogênio do que plasmina. No leite de vacas com mastite, há uma maior conversão do plasminogênio em plasmina, levando a um impacto negativo no teor de proteína do leite, pois hidrolisa as α - e β -caseínas (Gigante, 2004).

A ordem e o estágio de lactação também influenciam a contagem de células somáticas. Vacas adultas apresentam uma maior resposta celular à ocorrência de mastite. Além disso, animais mais velhos apresentam uma maior prevalência de infecções e lesões residuais de infecções anteriores. Dessa forma, a ocorrência de

mastite pode resultar em perdas de produção não só na lactação atual, mas também nas lactações seguintes, comprometendo a produção total do animal (Auldish e Hubble, 1998).

Paula et al. (2004) analisaram 257.540 amostras de leite de tanques, provenientes de 32.590 rebanhos dos Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, no período de janeiro de 1999 a novembro de 2001. Estudou-se o efeito da micro-região, ano e mês da análise, idade da amostra e rebanho sobre a contagem de células somáticas. Todos os efeitos foram significativos. A maior média de CCS foi observada em janeiro, devido a maior incidência de mastite clínica em decorrência da alta temperatura e umidade. Com relação à idade da amostra, houve redução da CCS até o quarto dia, provavelmente devido à lise celular. A partir dessa data, os valores de CCS apresentaram grandes oscilações.

Os parâmetros nacionais para os valores de contagem de células somáticas foram estipulados pela Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002). O intuito dessa Normativa é equiparar os padrões nacionais aos internacionais, para melhorar a qualidade do leite, tornando os produtos destinados aos mercados interno e externo, mais competitivos e seguros.

O monitoramento da CCS de rebanhos do Reino Unido mostrou que a porcentagem de rebanhos com CCS acima de 400.000 céls/mL passou de 63%, em 1979, para 27%, em 1993. Em 2001, essa porcentagem foi reduzida para 3% (Bradley, 2002). Os resultados mostram que, mesmo no Reino Unido, onde é empregado um alto nível de tecnificação na atividade leiteira o impacto da adoção de um programa de controle e prevenção da mastite para uma região ou país podem ser demorados dependendo da meta que se deseja alcançar.

2.1.2. Composição Centesimal do leite

O leite e seus componentes são quase insubstituíveis na dieta da maioria dos seres humanos, especialmente para os recém-nascidos, em função de suas propriedades nutricionais. Além do seu papel nutricional, o leite exerce vários efeitos positivos na saúde. Dentre os constituintes do leite de importante valor funcional, estão o ácido butírico e os esfingolípídeos, que ajudam na redução do câncer de cólon; os polipeptídeos e as proteínas do leite, que contribuem para a diminuição do risco de hipertensão; o ácido linoléico conjugado, que auxilia na função imunológica e na redução de certos tipos de câncer; e o ácido esteárico, que atua no controle dos lípides sanguíneos (Monardes, 2004).

A composição normal do leite é de aproximadamente 87,4% de água e de 12,6% de EST. Nessa última porção, estão incluídos 3,9% de gordura; 3,2% de proteína; 4,6% de lactose e 0,9% de minerais e vitaminas (Harding, 1995).

Esta composição está relacionada a diversos fatores de origem genética, fisiológica e ambiental, dentre os quais podem ser citadas as variações entre diferentes raças, indivíduos, idade, estágios de lactação, climas e manejos nutricionais. A gordura é o componente do leite que apresenta maior variação, sendo fortemente influenciada pela genética e pelo manejo nutricional. Quanto maior o teor de fibra na dieta, maior a concentração de gordura no leite. De modo geral, o teor de gordura pode variar de 2,2 a 4,4%. Provavelmente devido a esta variabilidade, a gordura foi o primeiro componente do leite a ser usado nos sistemas de pagamento por qualidade do leite; sendo o constituinte mais valorizado na maioria dos sistemas de pagamento por qualidade, seguido pela proteína (Burchard e Block, 1998).

O pagamento por qualidade é uma ferramenta importante para estimular

melhorias no setor leiteiro. Através dele, é possível obter uma remuneração adicional de até 20% do preço base do leite (Machado et al., 2003). Por esse sistema, é possível para a indústria selecionar as matérias primas que ofereçam maior rendimento industrial na produção de derivados lácteos, tais como creme de leite, sorvetes, leite em pó, queijos, manteiga e requeijão (Monardes, 1998).

Machado, Pereira e Sarries (2000) realizaram um levantamento de dados de contagem de células somáticas, porcentagens de gordura, proteína, lactose e sólidos totais de amostras recebidas de dezembro de 1996 a julho de 1998, para se caracterizar a composição do leite segundo sua CCS. Concluiu-se que leite de tanque com CCS mais alta apresentou maior porcentagem de gordura, menor porcentagem de proteína e lactose e igual porcentagem de sólidos totais. As mudanças significativas nas concentrações dos constituintes do leite ocorreram a partir de $1,0 \times 10^6$ céls./mL para gordura e $5,0 \times 10^5$ céls./mL para proteína e lactose.

A qualidade composicional do leite também está relacionada à sua qualidade microbiológica. A lactose é utilizada por vários gêneros bacterianos e geralmente seu metabolismo leva à produção de ácido láctico, o qual pode desestabilizar a caseína, quando presente em concentrações elevadas. As concentrações de gordura e de proteína do leite podem ser afetadas quando há elevada contagem de psicotróficos no leite, responsáveis pela produção de lipases e proteases (Fonseca e Santos, 2000).

Bueno et al. (2008) avaliaram a relação entre a contagem bacteriana e os teores de gordura, lactose e sólidos totais de 16.491 amostras de leite cru refrigerado, obtidas entre outubro de 2002 e setembro de 2003, no estado de Goiás. Foi observado que conforme ocorria a elevação da contagem bacteriana, reduzia-se a concentração de

lactose e aumentava-se a concentração de proteína. Já as concentrações de gordura e sólidos totais não apresentaram correlação significativa com a contagem bacteriana total. Segundo os pesquisadores, a redução da lactose se deve à facilidade de degradação desse componente. O aumento da concentração de proteína foi explicado pela necessidade de uma grande atividade bacteriana para que ocorra a sua degradação, e ainda, pelo aumento da concentração de proteína sérica, resultante do quadro inflamatório gerado na glândula.

2.1.3. Contagem bacteriana total

Características como elevada disponibilidade de nutrientes, alta atividade de água e pH próximo à neutralidade tornam o leite um ótimo meio de cultura para muitos micro-organismos. A contagem bacteriana total (CBT) do leite influencia o processamento tecnológico, o rendimento industrial, a vida de prateleira e a qualidade do produto, além de ter importantes implicações na saúde pública (Lange e Brito, 2003).

Oliver, Jayarao e Almeida (2005) listaram alguns fatores que esclarecem o modo como o leite pode afetar a saúde pública. Entre esses fatores, destaca-se o risco de o leite de tanques de armazenamento conter vários patógenos causadores de doenças veiculadas por alimentos em humanos. Surtos de doenças em humanos têm sido associados ao consumo de leite cru e também de leite pasteurizado. Os riscos estão associados ao consumo direto deste leite contaminado por patógenos pelos produtores de leite e suas famílias, empregados e vizinhos e ainda à recepção deste leite contaminado por patógenos pelas indústrias de laticínios. Estes micro-organismos podem permanecer no ambiente e/ou equipamentos industriais e formar biofilmes, com consequente contaminação de produtos processados. Por fim, a pasteurização não destrói a totalidade dos

micro-organismos presentes no leite. Esses pesquisadores realizaram um trabalho com o objetivo de estabelecer a prevalência dos principais patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos encontrados no leite e nas indústrias de laticínios, contidos nos biofilmes (*Campylobacter jejuni*, *Esherichia coli* produtora de Shiga-toxina, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.). As prevalências desses micro-organismos encontradas nos tanques de leite variaram, respectivamente, de: 0,4 a 12,3%, 0,8 a 3,8%, 1,0 a 12,6%, e de 0,2 a 8,9%. Adicionalmente, os autores destacam que o rebanho leiteiro se contamina por esses patógenos através da ingestão de alimentos e água contaminados, amplificam os mesmos em seu trato intestinal e os disseminam através das fezes, as quais podem contaminar o leite durante a ordenha.

Problemas como acidificação (com consequente instabilidade e coagulação), geleificação, aumento de viscosidade, alterações de sabor, odor e cor são resultantes de reações de proteólise e lipólise. As enzimas responsáveis por tais reações são termoestáveis e são produzidas em quantidades suficientes para causar deterioração quando a carga microbiana do leite é alta. Esses defeitos são responsáveis por redução no rendimento industrial, na vida de prateleira e na qualidade do produto (Gigante, 2004).

Ao ser secretado dos alvéolos da glândula mamária, o leite normal deve ser estéril. Posteriormente, em seu trajeto pelos canais lactíferos, cisterna da glândula e canal do teto, o leite pode atingir uma carga microbiana baixa, entre 500 e 1.000 UFC/mL (IDF, 1980).

Valores de CBT superiores a 10^3 UFC/mL sugerem contaminação devido a outros fatores, como o uso inadequado ou a não utilização de produtos de limpeza e sanificação (detergente alcalino, detergente

ácido e sanitizante) nos equipamentos de ordenha e/ou no tanque de refrigeração. Falhas na realização do *predipping* também podem contribuir para aumentos significativos na contagem bacteriana total. Tetos e úberes podem ser contaminados por micro-organismos presentes no esterco, no alimento e nas camas dos animais. Bactérias comumente encontradas nas camas são *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., bactérias formadoras de esporos, coliformes e outras bactérias Gram-negativo. Micro-organismos termofílicos e psicrotrofílicos são frequentemente isolados da superfície dos tetos. Deve-se estar atento ainda à qualidade da água utilizada na limpeza dos tetos e dos equipamentos de ordenha, devido à possibilidade de veiculação hídrica de micro-organismos com perda da qualidade do leite (Fonseca, 1998; Murphy e Boor, 2000).

Outra causa de aumento do número de micro-organismos do leite é a mastite. Animais com mastite podem aumentar consideravelmente o número de micro-organismos do leite. A influência da mastite sobre a contagem bacteriana total do leite de tanque depende do micro-organismo infectante envolvido, do estágio da infecção e do percentual do rebanho infectado. Uma vaca infectada tem o potencial de aumentar a contagem de bactérias do leite em 10^7 UFC/mL. Se o leite dessa vaca corresponder a 1% do leite total do tanque, a contagem bacteriana total do tanque, desconsiderando outras fontes de contaminação, seria de 10^5 UFC/mL. Micro-organismos causadores de mastite que mais frequentemente influenciam a contagem bacteriana total do leite de tanque são *Streptococcus* spp., mais frequentemente *S. agalactiae* e *S. uberis*. *Staphylococcus aureus* normalmente não contribui significativamente com o aumento da CBT do tanque (Murphy e Boor, 2000).

Falhas na refrigeração durante o armazenamento e transporte do leite implicam no aumento da população microbiana. O leite deve ser resfriado rapidamente até a temperatura de 4°C e permanecer nessa temperatura até sua coleta pelo laticínio. Nero et al. (2005) realizaram um experimento em quatro bacias leiteiras do Brasil: Viçosa (MG), Pelotas (RS), Londrina (PR) e Botucatu (SP). As amostras de leite cru foram analisadas quanto ao nível de contaminação por mesófilos. Foi observado que 48,6% das amostras estavam em desacordo com os limites estabelecidos pela IN 51. Destas, 21,3% pertenciam a região de Viçosa, 56% a região de Pelotas, 47,6% a região de Londrina e 68% a região de Botucatu. Nesta última região foi detectada a ausência de transporte granelizado até a usina de beneficiamento, sendo possível concluir a importância da refrigeração na conservação e no transporte do leite cru, aliado a implantação de boas práticas e da assistência técnica nas propriedades leiteiras.

A refrigeração do leite nas fontes produtoras reduz a deterioração do leite pela atividade acidificante das bactérias mesófilas. Entretanto, muitos produtores de leite poderiam abandonar a atividade por terem dificuldades em adquirir tanques refrigeradores individuais, devido ao seu custo. Para contornar esse problema, a legislação brasileira permite o resfriamento do leite em tanques comunitários. Com o objetivo de conhecer as características microbiológicas do leite mantido nesses tanques, pela determinação das contagens de mesófilos e psicrotrofílicos, Souza et al. (2009) analisaram 72 amostras de leite cru individual e 12 amostras do leite de conjunto provenientes de nove propriedades rurais do município de Sacramento (MG). Os valores obtidos na contagem de mesófilos das 72 amostras de leite individual analisadas variaram de $6,2 \times 10^2$ a $2,2 \times 10^7$ UFC/mL, sendo que 91,6% das

amostras analisadas apresentaram contagens abaixo de 10^6 UFC/mL. Já os valores obtidos na contagem de psicotróficos variaram de $3,2 \times 10^2$ a $9,6 \times 10^5$ UFC/mL. Em relação às 12 amostras de leite de conjunto, 11 (91,6%) apresentaram contagens de mesófilos abaixo de 10^6 UFC/mL. A média geométrica da contagem de micro-organismos psicotróficos obtida das 12 amostras de leite cru de conjunto foi de $7,4 \times 10^4$ UFC/mL. Provavelmente, o que proporcionou a obtenção de resultados que indicam qualidade microbiológica satisfatória foi a proximidade entre o tanque comunitário e as nove propriedades estudadas.

Um efeito negativo da prática da refrigeração é a seleção de bactérias que se multiplicam nessa temperatura, as quais podem produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas que acarretam em problemas tecnológicos. Pinto, Martins e Vanetti (2006) isolaram bactérias psicotróficas provenientes de tanques de refrigeração individual, coletivo e do silo de uma indústria processadora de leite. O leite cru refrigerado mantido no silo industrial apresentou contagens bacterianas significativamente superiores as do leite mantido em tanques individuais e coletivos, podendo-se observar que a refrigeração do leite cru por períodos prolongados pode comprometer a sua qualidade microbiológica e tecnológica.

Os esforços para reduzir a população bacteriana do leite devem estender-se ao longo de toda a cadeia produtiva do leite e derivados, a qual envolve atividades de produção, manipulação, elaboração, armazenamento, transporte e distribuição. Quanto maior essa cadeia, maior o número de pessoas intervindo no processo e maior o risco veiculação de doenças através do leite. O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle procura identificar perigos e riscos que podem afetar a inocuidade de um alimento. Na implantação

desse sistema em propriedades leiteiras, devem ser analisadas: a limpeza e a adequação do piso da sala de ordenha, a qualidade da água, o tipo de ordenha empregado, a presença de canaletas nos estábulos para drenagem da água e dejetos resultantes das operações de limpeza, a higiene e a capacidade do resfriador de leite, o número de animais do rebanho, verificar a ocorrência da prática de homogeneização do leite durante o resfriamento e quantificar o número de pessoas diretamente envolvidas na atividade. É importante salientar que o leite deve possuir uma boa qualidade microbiológica inicial, visto que é impossível reverter a qualidade microbiológica de ruim para boa (Rosa e Queiroz, 2007).

2.2. Tipos de micro-organismos que contaminam o leite

De acordo com a temperatura de crescimento, os principais micro-organismos contaminantes do leite podem ser divididos em quatro grupos: os psicotróficos, que crescem entre 0 a 30°C ; os mesófilos que crescem entre 20 e 45°C ; os termófilos que crescem entre 45 e 65°C e os termodúricos, que sobrevivem à pasteurização (Brito e Brito, 1998).

2.2.1. Bactérias psicotróficas

Bactérias psicotróficas são aquelas capazes de crescer em temperaturas de 7°C ou menos, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento. Geralmente, essa temperatura ótima está na faixa de 20 a 30°C . São encontradas no solo, na água, na vegetação e nos animais. A superfície do teto e do úbere, devido ao contato com o solo e com as camas, pode apresentar altas contagens desses micro-organismos quando deficientemente limpos e sanificados. Uma população de psicotróficos no leite cru entre 10^6 e 10^7 UFC/mL já é capaz de produzir enzimas em

quantidades suficientes para causar alterações no leite. As enzimas produzidas pelos psicrotróficos degradam lípidos, fosfolípidos e proteínas, mas raramente degradam a lactose. Proteases e lipases causam alterações no odor e sabor do leite. A proteólise resulta em liberação de peptídeos amargos. A liberação de ácidos graxos de baixo peso molecular (de quatro a oito carbonos) durante a lipólise resulta em sabor e odor de ranço. A liberação de ácidos graxos de maior peso molecular (de

dez a doze carbonos) é responsável pelo odor e sabor de sabão. A esterificação de ácidos graxos livres com etanol resulta em sabor de fruta. O sabor metálico ou oxidado é devido à formação de cetonas e aldeídos a partir da oxidação de ácidos graxos insaturados (Chen, Daniel e Coolbear, 2003). A tabela 1 expõe os efeitos da contagem de psicrotróficos do leite cru sobre a qualidade do leite e dos produtos lácteos.

Tabela 1. Efeito do crescimento de psicrotróficos no leite cru antes do tratamento térmico sobre a qualidade dos produtos lácteos

Produto	Psicrotróficos em leite cru (Log UFC/mL)	Efeito sobre a qualidade
Leite UAT	5,9	Gelificação após 20 semanas
	6,9-7,2	Gelificação após 2-10 semanas, desenvolvimento gradual de sabores de sujo, amargo e envelhecido
Leite em pó	6,3-7,0	Redução da estabilidade térmica e aumento da capacidade de formar espuma em leite reconstituído
Leite pasteurizado	5,5	Sabor de qualidade inferior quando comparado ao leite pasteurizado produzido com leite fresco
Queijos duros	6,5-7,5	Rancidez
	7,5-8,3	Alteração de sabor, principalmente rancidez e sabor de sabão. Redução do rendimento de fabricação
Cottage cheese	5,0-7,8	Correlação significativa entre a contagem de psicrotróficos em leite cru e o sabor amargo
Iogurte	7,6-7,8	Gosto amargo, sabor “sujo” ou de fruta, de acordo com a microbiota presente

Fonte: Adaptado de dados compilados por Sorhaug e Stepaniak (1997).

A microbiota psicrotrófica contaminante do leite cru inclui espécies Gram-negativo dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, e *Flavobacterium*, e bactérias Gram-positivo dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium*. Bactérias do gênero *Pseudomonas* têm sido isoladas com maior frequência do leite e de produtos lácteos refrigerados, sendo ainda mais

prevalentes em países de clima temperado (Arcuri, 2003; Pinto, Martins e Vanetti, 2006).

As medidas para prevenção da contaminação e proliferação de psicrotróficos no leite são basicamente higiene e manutenção de temperatura de estocagem adequada. No quesito higiene, um ponto fundamental é a correta limpeza e sanificação dos equipamentos de ordenha. Os resíduos de leite na superfície dos

mesmos fornecem nutrientes para o crescimento bacteriano e as protegem da ação dos sanificantes, favorecendo a formação de biofilmes. Uma aderência significativa pode ocorrer quando o tempo entre duas limpezas exceder oito horas. O suprimento de água de qualidade inadequada também pode atuar como fonte de contaminação de psicotróficos (Pereira Júnior, 2002).

Arcuri et al. (2008) quantificaram, isolaram e caracterizaram as bactérias psicotróficas do leite cru refrigerado, produzido na Zona da Mata de Minas Gerais e no sudeste do Rio de Janeiro. Verificou-se a predominância de bactérias psicotróficas Gram-negativo (81,2%). A espécie predominante foi *Pseudomonas fluorescens*. A maioria dos isolados bacterianos apresentou atividade proteolítica e/ou lipolítica em temperatura de refrigeração (4°C, 7°C e 10°C), evidenciando o alto potencial de deterioração desses micro-organismos.

Cook e Sanderman (2000) afirmam que fatores como diferentes regimes alimentares e condições climáticas podem afetar a incidência e os tipos de bactérias contaminantes do leite. Muitos estudos têm investigado os tipos de *Bacillus* sp. encontrados no leite e produtos lácteos. A maioria tem focado nas espécies psicotróficas, devido ao papel importante dessas na deterioração do leite refrigerado. Porém, poucos estudos têm concentrado na incidência e nos tipos de mesófilos no leite cru. Os mesófilos são importantes porque podem se adaptar às condições de crescimento tanto de psicotróficos como de termófilos. Adicionalmente, alguns termófilos muito resistentes ao calor, como *B. sporothermodurans* podem crescer sob condições mesofílicas.

2.2.2. Bactérias mesófilas

Bactérias mesófilas têm sua temperatura ideal de crescimento entre 30 e 35°C. Multiplicam-se rapidamente no leite não refrigerado, causando sua deterioração. Incluem-se nesse grupo as bactérias lácticas e os coliformes (Landgraf, 1999).

As bactérias ácido-lácticas são Gram-positivo, microaerofílicas, não esporuladas e nutricionalmente exigentes: necessitam de aminoácidos, vitaminas e nucleotídeos. Pertencem aos gêneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. São encontradas nas plantas, intestino, pele e mucosas do homem e de animais, podendo contaminar o leite durante a ordenha. A maior parte dessas bactérias é mesófila, mas existem algumas linhagens termófilas. São capazes de crescer num intervalo de temperatura de 5° a 45° C e toleram baixos valores de pH (ao redor de 3,8). São assim chamadas por produzirem ácido láctico como produto de seu metabolismo fermentativo. Como consequência da produção de ácido láctico, ocorre redução do pH do leite e coagulação da caseína. Portanto, essas bactérias são indesejáveis para o leite fluido. As bactérias ácido-lácticas produzem vários fatores antimicrobianos, tais como ácido láctico, acético e propiônico (Forsythe, 2000).

Segundo Marshall (1992), coliformes são bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, que fermentam a lactose com a produção de ácido e gás a temperatura de 32 ou 35°C, dentro de 48 horas. Alguns representantes desse grupo são os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. São habitantes do solo, água e do trato intestinal de homens e animais. Portanto, a presença dessas bactérias no leite e em equipamentos de ordenha denota contaminação externa, sendo indicativa de falta de higiene. Os coliformes diminuem a qualidade e a vida de prateleira do leite e derivados, devido à acidificação e à atividade proteolítica e

lipolítica de muitos gêneros. Além disso, no grupo coliforme encontram-se micro-organismos patogênicos, como algumas espécies do gênero *Escherichia*.

2.2.3. Bactérias termófilas e termodúricas

Bactérias termófilas crescem no leite em temperaturas elevadas (maiores que 55°C). A pasteurização lenta favorece esse grupo de micro-organismos, pois o leite é mantido na temperatura de 65°C durante 30 minutos, ocorrendo rápida multiplicação dos termófilos. São indicativos de falta de higiene na ordenha, nos equipamentos de ordenha, no processamento do leite ou nos equipamentos industriais, podendo ser introduzidos na propriedade leiteira ou na indústria de beneficiamento. Bactérias termófilas do leite pertencem ao gênero *Bacillus* (Lange e Brito, 2003).

Flint et al. (2007) pesquisaram um método rápido para a contagem de termófilos no leite em pó. Esses micro-organismos podem crescer rapidamente durante a fabricação deste produto, e quando seus números atingem valores superiores a 10⁶ UFC/g, há potencial de deterioração enzimática do produto, resultando em alterações de sua composição e de suas propriedades sensoriais. Para garantir a qualidade do leite em pó, este deve ser armazenado até que haja liberação dos resultados das análises laboratoriais. Esse processo pode levar cinco dias úteis ou mais, sendo necessário o estudo de métodos mais rápidos para enumeração desses micro-organismos.

As bactérias termodúricas, segundo Jay (1992), são aquelas que sobrevivem à temperatura de pasteurização do leite, embora não cresçam a essa temperatura. São resistentes à pasteurização porque suportam temperaturas elevadas e formam esporos. As bactérias formadoras de esporos pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, e, geralmente, necessitam de

serem expostas à temperatura de 120°C por 20 minutos para serem inativadas. As bactérias termodúricas não formadoras de esporos possuem representantes nos gêneros *Microbacterium*, *Micrococcus* e *Alcaligenes*. Algumas espécies de *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium* também possuem alguma resistência ao calor. As bactérias termodúricas são associadas com falhas crônicas na limpeza dos equipamentos de ordenha ou à contaminação originada do solo. Devido ao fato de sobreviverem à pasteurização, as bactérias termodúricas causam redução da vida de prateleira do leite e dos produtos lácteos.

Leitão et al. (1987) avaliaram a presença e o significado de bactérias termodúricas não esporogênicas no leite comercial pasteurizado e refrigerado. Os termodúricos representaram 58% da microbiota total das amostras analisadas. Observou-se nesse grupo de bactérias, a predominância de *Microbacterium* sp., *Micrococcus* sp. e bactérias corineformes, respectivamente. Caracterizou-se o potencial deteriorador das cepas presentes nas amostras através da inoculação de 10.000 UFC/mL das mesmas em leite esterilizado, seguindo-se de incubação a 4°C e 15°C, durante oito dias. Foram feitas análises da acidez titulável, determinação do pH, contagem bacteriana e avaliação organoléptica de cor e odor. Constatou-se que as amostras inoculadas mantinham qualidade aceitável até seis dias a 15°C e oito dias a 4°C, comprovando-se o reduzido potencial deteriorador das cepas termodúricas estudadas.

A enumeração e a diferenciação das bactérias encontradas no leite são ferramentas úteis para identificar as principais causas de uma elevada contagem bacteriana, permitindo ao produtor eliminar a fonte de contaminação dentro de um curto prazo (Holm, Mathiasen e Jespersen, 2004).

2.3. Métodos de contagem bacteriana

2.3.1. Contagem padrão em placas

A contagem padrão em placas (CPP) é o método referenciado pela International Dairy Federation (IDF) e pela American Public Health Association (APHA) para a contagem bacteriana total no leite cru. Baseia-se na viabilidade bacteriana, que é a capacidade das bactérias formarem colônias em meio de cultura sólido ou de proliferarem em meio de cultura líquido. Por essa técnica, micro-organismos mesófilos aeróbios e facultativos viáveis são enumerados, após a incubação a 32°C por 48 horas em ágar padrão. Para a execução da análise, o primeiro passo é a realização de diluições sucessivas das amostras de leite, utilizando água peptonada 0,1%. Essas diluições são necessárias para se obter uma contagem final nas placas de Petri, de 25 a 250 colônias. Em seguida, as amostras diluídas são transferidas com o auxílio de uma pipeta para o fundo da placa de Petri. Após isso, o meio de cultura é vertido cuidadosamente na placa e misturado em movimentos circulares. Segue-se a incubação da placa na temperatura e no tempo citados acima, e a enumeração das unidades formadoras de colônia (Marshall, 1992).

A vantagem da contagem padrão em placas é a facilidade de sua execução, tendo em vista que não necessita de equipamentos sofisticados e de mão-de-obra tecnicada (apenas bem treinada) para a realização das análises. Dentre as limitações do método, destaca-se o fato de que apenas as bactérias capazes de crescer rapidamente em um meio de cultura artificial são contadas. Os nutrientes disponíveis no meio, a presença de oxigênio, e o binômio tempo/temperatura de incubação podem não ser ideais para o crescimento do total de bactérias presente na amostra de leite (Castro, 2007).

Outro fator responsável pela subestimação da contagem bacteriana total por essa técnica é a ocorrência de injúrias subletais, como por exemplo, o tratamento térmico, que faz com que parte das bactérias não forme colônias, apesar de serem metabolicamente ativas. Pelos motivos expostos, a CPP é considerada como capaz de enumerar somente os micro-organismos cultiváveis, e não a totalidade dos viáveis (Broutin, 2004).

Também a característica de agregação bacteriana influencia a contagem, pois o método enumera apenas as colônias, e estas podem ser formadas por uma única célula ou por um agregado de células. Dessa forma, o resultado obtido pela CPP é considerado pouco preciso. Outra desvantagem é o tempo prolongado para disponibilizar os resultados (48-72 horas em média), fazendo com que seja inviável a realização de grandes quantidades de análises diárias (Cassoli et al, 2008).

Entretanto, por se tratar do método de referência, todos os demais métodos para contagem bacteriana do leite devem ser comparados a ele e os resultados obtidos devem ser expressos em UFC/mL, atendendo as determinações da Instrução Normativa n° 51 (Brasil, 2002).

2.3.2. Citometria de fluxo

Os primeiros citômetros de fluxo foram desenvolvidos durante a Segunda Guerra Mundial para identificar a presença de bactérias e esporos no ar, usados como armas biológicas. Mais recentemente, esses equipamentos vêm sendo usados na área animal. No leite, o emprego da citometria de fluxo permite agilizar e automatizar sua contagem bacteriana total. É comumente empregada em laboratórios de controle de qualidade e em indústrias de laticínios (Gunasekera e Attfield, 2000).

O potencial de membrana é o parâmetro de viabilidade celular mais utilizado nos citômetros de fluxo. Esse potencial é gerado devido à presença da membrana plasmática que envolve a célula, responsável pela geração e manutenção de um gradiente eletroquímico entre o meio interno e o externo. A membrana plasmática intacta é seletivamente permeável, devido à presença de carreadores protéicos específicos que participam do transporte (Brock et al., 1994).

Outro parâmetro relacionado à viabilidade celular é a integridade de membrana. Em condições de estresse, como a submissão à tratamento térmico, a célula bacteriana tem sua membrana plasmática afetada, causando alterações nos sistemas de transporte ativo e possibilitando a sua permeabilização. Devido a essas alterações, é possível corar as células por corantes fluorescentes catiônicos ou aniônicos. A integridade da membrana pode ser detectada por métodos de retenção ou exclusão do corante pela célula. No método de exclusão, utilizam-se fluorocromos como o iodeto de propídio (IP) e o brometo de etídeo (BE). O BE atravessa a célula porque o sistema de transporte próton ativo não específico, responsável pela expulsão do fluorocromo, foi perdido. Então, o BE liga-se ao DNA bacteriano e emite radiação quando exposto ao laser (Silva et al., 2010).

A avaliação da viabilidade microbiana é necessária em diversas áreas da microbiologia, incluindo saúde pública, biotecnologia e tecnologia de alimentos. A citometria de fluxo permite a mensuração de múltiplos parâmetros celulares, tanto estruturais como funcionais. Essa mensuração geralmente baseia-se em difusão da luz e fluorescência. Um corante fluorescente que, em condições normais, é expulso da célula bacteriana, e que difundiu-se passivamente através da parede celular pode atuar como indicador da integridade da membrana, e

consequentemente, da viabilidade celular (Jepras et al., 1995).

Através da citometria de fluxo é possível detectar os diferentes estados fisiológicos celulares. Os micro-organismos que sofreram estresse, como por exemplo a escassez de nutrientes, respondem a esse estímulo reduzindo seu tamanho e aumentando a granularidade citoplasmática. Essas mudanças afetam as propriedades de dispersão da luz, o que pode ser detectado e interpretado pelo citômetro de fluxo, possibilitando a contagem diferencial desses indivíduos (Porter et al., 1996; Hewitt e Nebe-Von-Caron, 2001).

Um típico citômetro de fluxo contém várias partes: (i) Um sistema hidráulico, que produz uma corrente fluida, com uma bainha líquida ao redor da suspensão de células. Essa bainha é responsável pela passagem das partículas através de sensores, com velocidade constante. (ii) Um sistema de iluminação, que consiste de uma luz que produz sinais de reflexão e de fluorescência, quando as partículas passam por ele. Os citômetros empregados para contagem bacteriana no leite utilizam o laser como fonte de luz. (iii) Um sistema óptico, que direciona a luz que incide sobre as partículas e recupera a luz refletida e a fluorescência, produzidas pelo fluorocromo presente nas células, e direciona ambas para o tubo fotomultiplicador apropriado (figura 1). (iv) Um sistema eletrônico que transforma a luz refletida e a fluorescência captadas pelo sistema óptico em pulsos elétricos. (v) Um sistema de análise de dados, que consiste de um software que permite a análise da grande quantidade de informações produzidas pela aquisição de dados multiparamétricos (Álvarez-Barrientos et al., 2000).

O BactoCount IBC, da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América (figura 2), é um equipamento totalmente automatizado que utiliza a

citometria de fluxo, e que possui capacidade analítica de até 150 amostras/hora. Neste equipamento, a amostra de leite é aquecida em um carrossel a 50°C. Uma solução de incubação composta de um tampão para clarificação, uma enzima proteolítica e um marcador fluorescente de DNA (brometo de etídeo) é adicionada para romper as células somáticas, solubilizar os glóbulos de gordura e proteínas, permeabilizar as bactérias e corar o DNA/RNA. A mistura é “sonicada” duas vezes durante a incubação com uma sonda ultra-sônica, o que auxilia a degradação química das partículas interferentes e o rompimento de colônias bacterianas remanescentes. Após o período de incubação, a solução é transferida para a citometria de fluxo, onde as células são alinhadas e expostas a um feixe de laser. Ocorre emissão de um sinal de fluorescência, que é coletado por um sistema óptico, filtrado e traduzido em contagem bacteriana (Broutin, 2004).

Devido ao fato da contagem bacteriana por citometria de fluxo se basear na viabilidade bacteriana, tal método permite a mensuração de células individuais. Portanto, o resultado obtido por essa técnica é expresso em Contagem Bacteriana Individual por mililitro (CBI/mL). Como a legislação nacional estabelece que os valores de contagem bacteriana do leite devem ser expressos em UFC/mL, os resultados obtidos pelo citômetro de fluxo devem sofrer uma transformação estatística. Para tanto, o aparelho deve ser calibrado com uma equação de correlação entre o método de referência e a citometria de fluxo (Cassoli et al., 2008).

Em países onde existem vários laboratórios de controle de qualidade do leite

(conhecidos internacionalmente como *Central Milk Testing*) é essencial que os diferentes equipamentos utilizados em cada um gerem resultados similares, tanto quando expressos em contagem bacteriana individual, quanto quando expressos em unidades formadoras de colônia. Onze países da Europa definiram uma equação de conversão nacional. Alguns deles adotaram também equações de conversão entre países vizinhos (Suhren e Lombardi, 2006). No Brasil, cada laboratório desenvolveu sua equação de conversão.

As principais vantagens dessa técnica são o baixo custo de análise e o elevado rendimento analítico. A desvantagem, segundo Suhren e Walte (2000), é que equipamentos automatizados subestimam a contagem de bactérias Gram-negativo, devido ao fato destas bactérias apresentarem uma parede celular que atua como uma barreira para a entrada do marcador fluorescente.

Além do tipo da microbiota presente, outros fatores que podem interferir na contagem bacteriana por citometria de fluxo são o tempo de conservação e a temperatura de armazenamento das amostras. Amostras adicionadas de azidiol, conservadas em temperaturas de 4 a 10°C, podem ser usadas na contagem bacteriana por citometria de fluxo, sem que ocorram diferenças significativas nos resultados encontrados, por até 10 dias de armazenamento. O armazenamento em temperatura ambiente de amostras destinadas às análises microbiológicas não pode ser recomendado, pois o efeito bacteriostático do conservante adicionado não é suficiente para estacionar a multiplicação microbiana quando a população inicial é muito elevada (Leite, 2006).

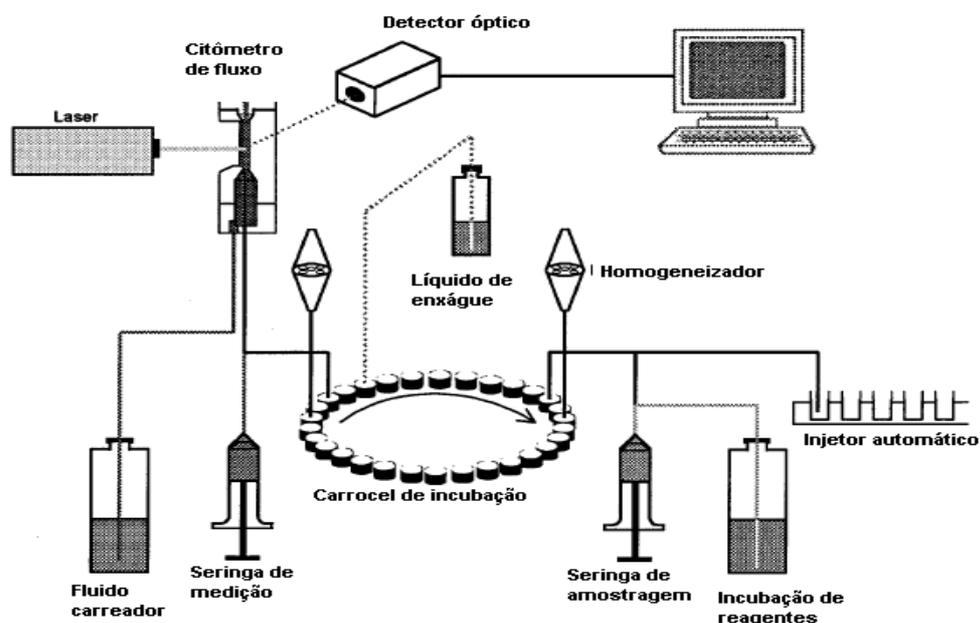


Figura 1. Esquema de funcionamento do citômetro de fluxo (adaptado de Foss Electric®, Hillerod, Dinamarca).

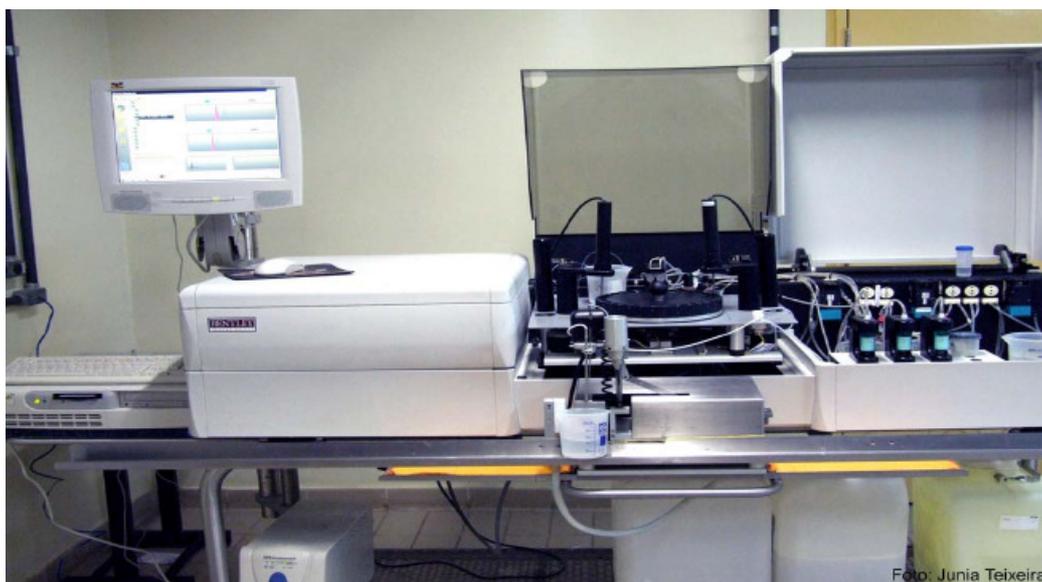


Figura 2- Foto do equipamento eletrônico IBC Bactocount da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem bacteriana total em amostras de leite cru.

2.4. Métodos de contagem de células somáticas

O método de referência para a determinação da CCS em leite cru é a microscopia direta. Nesta técnica, uma alíquota de leite de 0,01mL é transferida pra uma lâmina de

vidro, sendo distribuída uniformemente em uma área de 1cm². Após a secagem, ocorre a coloração da lâmina por uma solução de azul de metileno 0,6%. O próximo passo é a contagem das células em microscópio óptico. As limitações desse método são o tempo e trabalho requeridos, além da ampla variabilidade dos resultados em função dos observadores que executam a contagem (Marshall, 1992).

Em virtude dessas limitações, foram desenvolvidos equipamentos eletrônicos para contagem de células somáticas, como o Somacount® (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos),

Somascope (Delta Instruments, Drachten, Holanda) e Fotosomatic® (Foss Electric®, Hillerød, Dinamarca). Na contagem de células somáticas por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento Somacount (figura 3), uma alíquota de leite é aspirada, aquecida a 67°C e corada pelo brometo de etídeo. Após isso, 50 µL da amostra são conduzidos para o citômetro de fluxo, através de um fluido carreador (RBS). Neste local, as células recebem incidência de laser e emitem fluorescência, a qual é coletada por filtros ópticos, ampliada, filtrada, e traduzida em contagem de células somáticas (Leite, 2006).



Figura 3. Foto do equipamento eletrônico Somacount 300 da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América, para contagem de células somáticas em amostras de leite cru.

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

Nos laboratórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), a análise da composição centesimal do leite cru é realizada por equipamentos eletrônicos, baseada no princípio de espectrofotometria

no infravermelho médio. Após o aquecimento da amostra de leite a 40° C, ela é agitada e aspirada pelo equipamento. Essa amostra recebe irradiação infravermelha no interior do equipamento. Em seguida, a energia absorvida pela amostra analisada é comparada à energia absorvida pela amostra de referência. Essa diferença é captada por um detector de

infravermelho, quantificada e transformada em teores dos componentes do leite. Cada componente do leite absorve energia em um determinado comprimento de onda, sendo observados os valores de 5,73 μm para a gordura, 6,46 μm para proteína e 9,53 μm para a lactose (Bentley ...,1998).

3. OBJETIVOS

Avaliar a influência de micro-organismos mesófilos aeróbios, psicrotróficos, termófilos e termodúricos sobre a contagem bacteriana por citometria de fluxo, em comparação com a contagem padrão em placas.

Estabelecer diferentes curvas de calibração para o equipamento Bactocount IBC Bentley Instruments® em função dos tipos de micro-organismos predominantes no leite.

Verificar se há correlação entre os grupos de micro-organismos presentes no leite com a contagem de células somáticas e com a composição centesimal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e conservação das amostras

Foram coletadas 179 amostras de leite cru provenientes de Minas Gerais, que enviam suas amostras regularmente ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG) pertencente à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras (40 mL, aproximadamente) foram acondicionadas, no momento da coleta, em frascos estéreis, contendo azidiol, para determinar a contagem bacteriana total, ou bronopol, para as análises de composição e de contagem de células somáticas. O conservante azidiol tem propriedades bacteriostáticas, no entanto, devido às

posteriores diluições seriadas a que as amostras foram submetidas, sua concentração final nas placas foi considerada insignificante. Sendo assim, não interferiu nos resultados das contagens padrão em placas.

As amostras analisadas tinham valores de CBT heterogêneos, sendo esses valores distribuídos em classes de muito baixa contagem bacteriana (0 a 50.000UFC/mL), baixas contagens (50.001 a 100.000UFC/mL), médias contagens (100.001 a 750.000UFC/mL), altas contagens (750.001 a 1.000.000UFC/mL) e muito altas contagens bacterianas (>1.000.000 UFC/mL), como apresentado nos resultados (p. 26).

Durante o transporte até o laboratório, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo reciclável, permanecendo sob refrigeração (4 °C) durante esse período. O tempo transcorrido entre a coleta do leite e a realização da contagem padrão em placas não ultrapassou 36 horas. Já o intervalo de tempo entre a contagem bacteriana padrão em placas e a contagem bacteriana por citometria de fluxo não ultrapassou 24 horas. Ao chegar ao laboratório, a temperatura das amostras de leite foi verificada e registrada. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (4 °C) até o momento das análises. A contagem bacteriana total (método de citometria de fluxo), a composição centesimal e a contagem de células somáticas das amostras foram realizadas no LabUFMG e a contagem padrão em placas foi realizada no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

4.2. Análises laboratoriais

4.2.1. Contagem Padrão em Placas

A contagem padrão em placas foi realizada de acordo com a IN 62 (BRASIL, 2003). Inicialmente, as placas foram identificadas com o número da amostra, data, diluição e o binômio tempo/temperatura de incubação. A amostra de leite foi homogeneizada e em seguida, foi transferido assepticamente 1 mL da amostra para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. O tubo foi agitado e foram realizadas diluições decimais subsequentes para obtenção de placas com contagem entre 25 e 250 colônias.

Posteriormente, 1 mL do material diluído para a placa de Petri. Após fundir o ágar padrão, este foi vertido assepticamente na placa de Petri, na quantidade de 10 a 12 mL. O diluído e o ágar padrão foram misturados em movimentos circulares e suaves, e permaneceram em uma superfície nivelada (por cerca de 10 minutos), para solidificação do ágar. As placas foram incubadas invertidas, e o binômio tempo/temperatura de incubação empregados para micro-organismos mesófilos e psicotróficos foi de 30°/72h e 21°/25h, respectivamente, segundo IDF (1991 a) modificado. Para a contagem de micro-organismos termófilos, as placas foram incubadas a 55°C/48h, segundo Marshall (1992). Após o período de incubação adequado, foi efetuada a enumeração das colônias.

Para contagem dos micro-organismos termodúricos, foi realizado um pré-tratamento da amostra de leite, de acordo com o procedimento a seguir. Foram transferidos assepticamente 5 mL da amostra de leite para um tubo de ensaio esterilizado. As amostras foram incubadas em banho-maria a 62-65°C/30 minutos, e posteriormente, foram refrigeradas a 10°C e submetidas às diluições decimais seriadas, semeadas em placas e incubadas a 32°C/48 h (Marshall, 1992).

4.2.2. Contagem bacteriana por citometria de fluxo

A contagem bacteriana por citometria de fluxo foi realizada em equipamento eletrônico IBC BactoCount IBC da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América (Bentley..., 2002). Os resultados foram obtidos considerando a CBI (contagem bacteriana individual) e UFC (unidades formadoras de colônia).

4.2.3. Contagem de células somáticas

Realizou-se a contagem de células somáticas por citometria de fluxo nas amostras em equipamento eletrônico Somacount, da Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos da América (Bentley..., 1998), segundo IDF (1995). O emprego deste método encontra-se normatizado na Instrução Normativa N° 51/ /2002/MAPA.

4.2.4. Composição centesimal

A determinação da composição centesimal foi realizada em equipamento eletrônico, baseada em leitura instrumental pelo princípio de Espectrometria de Absorção no Infravermelho Médio (EIVM) com equipamento calibrado pelo método de referência de IDF (International Dairy Federation), segundo IDF (2000). O emprego deste método encontra-se normatizado na Instrução Normativa N° 51/ /2002/MAPA.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de contagem individual de bactéria (CBI) e unidade formadora de colônia (UFC) foram convertidos para logaritmo de base dez. Foi utilizada a análise de correlação de Pearson para comparar os resultados de contagem bacteriana obtidos por contagem padrão em placas e por citometria de fluxo. Foi feita

também a análise de regressão linear, considerando-se o logaritmo de base dez do valor da contagem bacteriana determinado por citometria de fluxo como variável dependente e os logaritmos de base dez dos valores das contagens de cada grupo de micro-organismos do leite, determinados pelo método padrão, como variáveis independentes. Os resultados obtidos pelas análises de correlação e regressão linear foram utilizados para a criação de curvas de calibração para cada micro-organismo (Sampaio, 2002).

Os resultados das contagens de células somáticas e os valores das contagens de cada grupo de micro-organismo do leite foram também transformados em logaritmos de base dez e posteriormente

foram analisados pela correlação de Spearman. Para efetuar a análise estatística entre a contagem de cada grupo bacteriano do leite e a composição centesimal também foi utilizada a correlação de Spearman. Esse tipo de correlação também foi utilizado na análise estatística entre a contagem bacteriana total e a composição do leite (SAS, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Contagem bacteriana total

A distribuição das amostras de leite cru segundo sua contagem bacteriana encontra-se exposta na tabela 2.

Tabela 2. Distribuição das amostras de leite cru refrigerado em classes de acordo com a contagem bacteriana total

Classificação	Contagem Bacteriana (UFC/mL)	Número de Amostras	Porcentagem
Muito baixa contagem	0-50.000	53	29,61
Baixa contagem	50.001-100.000	27	15,08
Média contagem	100.001-750.000	69	38,55
Alta contagem	750.001-1.000.000	9	5,03
Muito alta contagem	>1.000.000	21	11,73

Avaliando-se a porcentagem de amostras enquadradas em cada categoria, verifica-se que não houve concentração de amostras nas classes de baixa ou alta contagem bacteriana total. Se tal fato ocorresse, poderia influenciar a curva de calibração do equipamento Bactocount IBC®, prejudicando os resultados deste experimento.

Observa-se ainda, que 30 amostras, ou seja, 16,76% do total analisado, encontraram-se fora dos parâmetros de contagem bacteriana estabelecido pela IN 51 para o período de análise (> 750.000 UFC/mL).

Se as análises fossem realizadas a partir de 2012, 38 amostras estariam fora dos

parâmetros estabelecidos pela legislação, pois 21,23% possuíam contagem bacteriana acima de 600.000UFC/mL. Obteve-se um grande número de amostras (80 amostras, correspondendo a 44,69% do total analisado) com contagem bacteriana muito baixa ou baixa (abaixo de 100.000 UFC/mL), indicando a boa qualidade desse leite.

Nero et al. (2005), em experimento realizado nas bacias leiteiras de Viçosa (MG), Pelotas (RS), Londrina (PR) e Botucatu (SP), encontraram 48,6% amostras de leite em desacordo com os limites estabelecidos pela IN 51, sendo que, naquela época, o limite máximo era de 1.000.000 UFC/mL.

Fonseca (2005), ao analisar dados de 50.434 amostras de leite enviadas de dezembro de 2003 a janeiro de 2005 para o Laboratório de Análise da Qualidade do Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, constatou que 18,4% das amostras estavam fora dos padrões estabelecidos por lei para contagem bacteriana total.

Segundo Mesquita et al. (2006), 25% das amostras analisadas no Laboratório de Qualidade do Leite de Goiás, no período de fevereiro a setembro de 2006, apresentaram contagens superiores a 1×10^6 UFC/mL.

Resultados de contagem bacteriana mais satisfatórios foram encontrados por Souza et al. (2009), ao analisar 72 amostras de leite cru individual e 12 amostras do leite de conjunto provenientes de Sacramento (MG). Do total analisado, 91,6% das amostras apresentaram contagens abaixo de 10^6 UFC/mL, que era o limite superior de contagem bacteriana vigente no ano dessas análises. Atribuem-se esses resultados indicativos de boa qualidade microbiológica do leite à refrigeração do leite imediatamente após a ordenha.

Lima (2007), ao analisar 183 amostras de leite cru da Zona da Mata, encontrou 50,8% das amostras em conformidade com os parâmetros definidos pela IN 51. Os motivos que enquadraram 49,2% das amostras como não conformes, segundo a autora, foram pouca higiene durante a ordenha, instalações precárias, baixa utilização de refrigeração do leite na fazenda e ausência do monitoramento e tratamento da água utilizada no processo de obtenção do leite. Jatobá (2009), em experimento realizado no Nordeste, observou que 59,32% das amostras de leite cru analisadas possuíam contagens superiores a 1×10^6 UFC/mL.

5.1.1. Contagem padrão em placas de psicrótrófilos, mesófilos, termófilos e termodúricos

A maior parte dos micro-organismos presentes nas amostras de leite analisadas pertenciam ao grupo dos psicrótrófilos e dos mesófilos (tabela 3).

Tabela 3. Médias e desvios padrão das contagens dos grupos de micro-organismos do leite pelo método de referência.

	Média (UFC/mL)	Média log (UFC/mL)	Desvio padrão log (UFC/mL)
Psicrótrófilos	$2,68 \times 10^6$	4,97	1,35
Mesófilos	$8,41 \times 10^5$	5,28	0,93
Termófilos	$3,85 \times 10^3$	2,80	0,60
Termodúricos	$1,54 \times 10^4$	3,10	0,84

Souza et al. (2009), em estudo realizado em Sacramento, Minas Gerais, obtiveram médias das contagens bacterianas de $3,3 \times 10^5$ UFC/mL, para mesófilos, e de $3,8 \times 10^4$ UFC/mL, ambas inferiores as obtidas nesse experimento. Os autores justificam os baixos valores de contagens com base na proximidade entre as propriedades e o tanque comunitário de refrigeração do leite.

Valores de contagens superiores ao aqui obtidos foram encontrados por Pinto,

Martins e Vanetti (2006), ao analisar amostras de leite coletadas em silo industrial. As médias dos logaritmos das contagens bacterianas verificadas por esses autores foram de 6,36 para mesófilos e 6,20 para psicrótrófilos.

O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1952) determina o controle da contaminação da microbiota psicrótrófica de tal forma que sua contagem não exceda a

10% do número total de mesófilos aeróbios, com o intuito de assegurar as condições higiênicas de produção e de armazenamento, de transporte e de refrigeração, nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite. Tal condição não foi atendida pelas amostras de leite analisadas nesse estudo, uma vez que a população psicotrófica do leite foi superior a população de micro-organismos mesófilos. Celestino, Iyer e Roginski (1996), ao avaliar os dados de amostras de leite cru estocado a 4°C, por 48 horas, encontraram uma relação entre 47% e 80%, entre a contagem de bactérias psicotróficas e mesófilas aeróbias.

As contagens de termófilos e termodúricos encontradas nas amostras analisadas foram baixas (médias de $3,85 \times 10^3$ UFC/mL e $1,54 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente). Brum e Valenti (1974), ao avaliar a qualidade microbiológica do leite distribuído em Santa Maria, Rio Grande do Sul, também

obtiveram valores baixos para as contagens de termófilos e termodúricos: todas as amostras analisadas apresentaram contagens de termófilos inferiores a 100UFC/mL e 66,6% possuíam contagens de termodúricos inferiores a 10^4 UFC/mL. Leitão et al. (1987) obtiveram valores superiores nas contagens de termodúricos: a população dos mesmos correspondia a 58% da microbiota total das amostras de leite analisadas.

5.1.2. Comparação entre os resultados de contagem bacteriana do leite obtidos por citometria de fluxo e por contagem padrão em placas

O valor médio de contagem bacteriana total obtido através do método de contagem padrão em placas foi de $8,23 \times 10^5$ UFC/mL, enquanto que o valor médio obtido através de citometria de fluxo foi de $2,68 \times 10^6$ CBI/mL, como exposto na tabela 4.

Tabela 4. Médias e desvios padrão dos valores de contagem bacteriana total obtidos pelo método de referência e por citometria de fluxo.

	Contagem por citometria de fluxo	Contagem padrão em placas
Média CBT	$2,68 \times 10^6$ CBI/mL	$8,23 \times 10^5$ UFC/mL
Média log CBT	5,59	5,28
Desvio padrão log CBT	0,94	0,93

O valor da contagem bacteriana obtido pela citometria de fluxo é 3,25 vezes superior ao valor obtido por contagem padrão em placas. Holm, Mathiasen e Jespersen (2004), ao analisarem 5.973 amostras de leite cru amostras de leite cru, obtiveram resultados de contagem bacteriana por citometria de fluxo 3,5 vezes superior aos obtidos pela CPP, semelhante aos obtidos neste experimento.

Evangelista (2008), ao comparar os resultados de contagem bacteriana total obtidos pelo método padrão e por citometria de fluxo encontrou valores 2,93

vezes superiores quando foi empregado o método eletrônico.

Neves (2008), em experimento realizado no Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal de Goiás, encontrou médias de contagem bacteriana de $2,85 \times 10^5$ CBI/mL, utilizando a análise por citometria de fluxo, e de $9,95 \times 10^4$, ao empregar o método de referência. Houve uma diferença de 2,86 vezes entre os dois métodos.

O principal motivo dessa diferença nos valores encontrados é o fato do método de

contagem padrão em placas subestimar a quantidade total de bactérias, uma vez que apenas bactérias viáveis crescem no meio de cultura. O resultado obtido por CPP é expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro. Entretanto, deve-se ressaltar que uma colônia nem sempre se constitui de uma única célula bacteriana. Outro fator que contribui para subestimar a contagem bacteriana por essa técnica é que somente os micro-organismos cultiváveis, ou seja, aqueles que se desenvolvem nas condições de plaqueamento das amostras, são enumerados. Outras desvantagens desse método são seu alto custo e baixo desempenho analítico (Cassoli et al., 2010).

Em virtude das desvantagens citadas acima, técnicas alternativas de contagem bacteriana do leite têm sido adotadas. O método de citometria de fluxo é empregado em laboratórios de controle de qualidade do leite de todo o mundo, devido à grande demanda de análises dos mesmos, tornando necessário a utilização de métodos de rotina automatizados, de alto desempenho e baixo custo (Surhren e Walte, 1998; Gunasekera e Attfield, 2000).

A International Dairy Federation (IDF) afirma que fatores como o tipo de bactéria, o seu estado fisiológico, características de

agregação, entre outros, podem influenciar a conversão dos resultados de CBI/mL para UFC/mL.

Considerando-se as diferenças existentes entre as propriedades leiteiras brasileiras, tais como clima, rebanho e manejo, é de se esperar que o leite contenha uma população bacteriana diversificada em função de sua origem. Isso pode levar a obtenção de resultados pouco precisos quando o leite for analisado fora de sua região de origem, em equipamento calibrado com amostras contendo uma microbiota diferente, justificando a decisão de cada laboratório pertencentes à RBQL estabelecer sua equação de conversão.

5.1.3. Correlação entre a contagem bacteriana total por citometria de fluxo com a contagem padrão em placas de psicotróficos, mesófilos, termófilos e termodúricos

A influência de cada grupo de micro-organismos do leite sobre a contagem bacteriana por citometria de fluxo foi avaliada pela correlação de Spearman, comparando-se os resultados de contagem obtidos pelo método padrão e por citometria de fluxo. A tabela 5 expõe os coeficientes de correlação encontrados.

Tabela 5. Coeficientes de correlação entre a contagem bacteriana total obtida por citometria de fluxo e as contagens padrão em placas dos grupos de micro-organismos do leite.

Contagem bacteriana	Citometria de fluxo	CPP de psicotróficos	CPP de mesófilos	CPP de termófilos	CPP de termodúricos
Citometria de fluxo	1,0000	0,6695	0,7008	0,2996	0,2746
CPP de psicotróficos	0,6695	1,0000	0,7901	0,3384	0,3228
CPP de mesófilos	0,7008	0,7901	1,0000	0,2497	0,3203
CPP de termófilos	0,2996	0,3384	0,2497	1,0000	0,1839
CPP de termodúricos	0,2746	0,3228	0,3203	0,1839	1,0000

Valores de correlação significativos ($p < 0,01$)

Os maiores coeficientes foram obtidos nas correlações entre contagem bacteriana total por citometria de fluxo e as contagens de mesófilos e psicotróficos pelo método padrão ($r = 0,7008$ e $0,6695$; respectivamente), e entre a CPP de mesófilos e psicotróficos ($r=0,7901$).

Cassoli et al. (2010) consideraram que uma elevada prevalência de *Pseudomonas* spp. nas amostras de leite analisadas em seu experimento poderia explicar a alta correlação observada entre as contagens de mesófilos e de psicotróficos. A mesma explicação pode ser utilizada no presente estudo, uma vez que a população bacteriana predominante no leite é Gram-negativo (80%), sendo que o gênero *Pseudomonas* spp. representa 50 a 70% desse grupo. Bactérias do gênero *Pseudomonas* multiplicam-se em uma ampla faixa de temperatura, de 4 a 30°C, sendo 25° C sua temperatura ótima de crescimento (Arcuri et al., 2008; Martins et al, 2006).

As correlações entre micro-organismos termófilos e termodúricos com a contagem bacteriana total obtida por citometria de fluxo foram consideradas muito fracas ($r < 0,25$) (Finney, 1980). Os baixos coeficientes encontrados se devem às baixas contagens de termófilos e termodúricos nas amostras de leite cru refrigerado analisadas. Entretanto, mesmo quando presentes no leite em proporções menores, os micro-organismos termodúricos podem deteriorar o leite e os produtos lácteos, devido ao fato de sobreviverem à pasteurização e se multiplicarem durante a vida de prateleira do leite e dos produtos lácteos.

5.1.4. Regressão linear entre as contagens bacterianas de mesófilos e psicotróficos obtidas pelo método de referência e a contagem bacteriana total determinada por citometria de fluxo

Em virtude da moderada correlação encontrada entre os valores das contagens de mesófilos e psicotróficos obtidos pela técnica padrão com a CBT determinada por citometria de fluxo, foi possível estabelecer equações de regressão linear entre essas variáveis.

Para os micro-organismos mesófilos, foi estabelecida a seguinte equação: $\log \text{CBI} = 0,7011 \log \text{mesófilos} + 1,9091$, em que o logaritmo de base dez do valor da contagem bacteriana individual (CBI) determinada por citometria de fluxo ($\log \text{CBI}$) é a variável dependente, e logaritmo da base dez do valor da contagem de mesófilos ($\log \text{mesófilos}$), determinado pelo método padrão, é a variável independente (figura 4). Os valores de r e R^2 desta equação são 0,7007 e 0,4911, respectivamente.

Já para os psicotróficos, a equação estabelecida foi: $\log \text{CBI} = 0,4703 \log \text{psicotróficos} + 3,2784$, onde o logaritmo de base dez do valor da contagem bacteriana determinada por citometria de fluxo ($\log \text{CBI}$) é a variável dependente, e logaritmo da base dez do valor da contagem de psicotróficos ($\log \text{psicotróficos}$), determinado pelo método padrão, é a variável independente (figura 5). Os valores de r e R^2 desta equação são 0,6695 e 0,4488, respectivamente.

Figura 4. Representação gráfica da regressão linear estabelecida entre a contagem de mesófilos e a contagem bacteriana determinada por citometria de fluxo

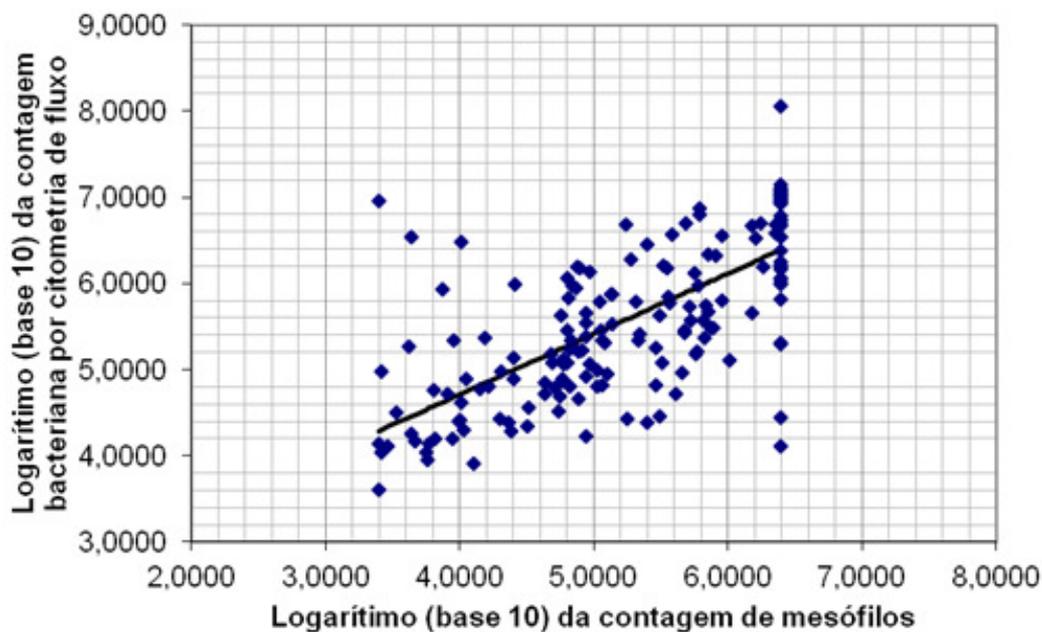
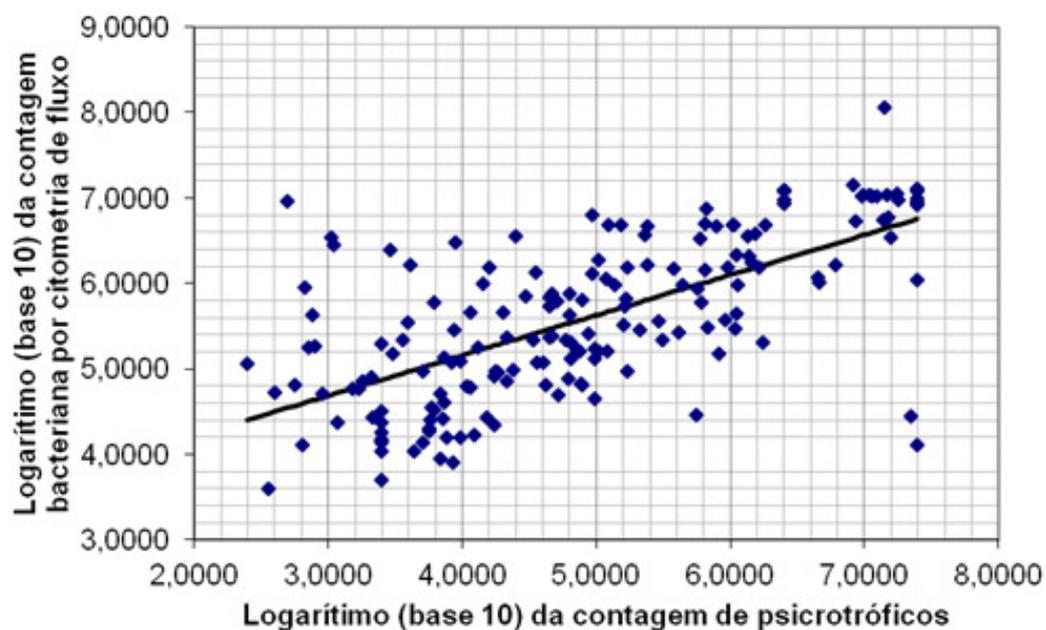


Figura 5. Representação gráfica da regressão linear estabelecida entre a contagem de psicrotróficos e a contagem bacteriana determinada por citometria de fluxo



Essas equações poderão ser utilizadas para calibrar o equipamento Bactocount IBC em função da microbiota predominante no leite a ser analisado. Tem sido frequente a demanda por análises de psicrotróficos em amostras de leite, sobretudo de carretas. Com a calibração do equipamento especificamente para este grupo de micro-organismo, será possível realizar esta análise rapidamente utilizando-se a citometria de fluxo. Não foi possível estabelecer curvas de calibrações para termófilos e termodúricos, pois os

coeficientes de correlação obtidos entre a contagem desses micro-organismos e a contagem bacteriana total, determinada por citometria de fluxo, foram baixos ($r = 0,2996$ e $0,2746$, respectivamente).

5.2. Composição centesimal do leite

Os valores médios dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais das 97 amostras de leite cru refrigerado analisadas, com seus respectivos desvios, estão expostos na tabela 6.

Tabela 6. Média e desvio padrão dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado.

Constituinte do leite	Média(%) e desvio padrão
Gordura	3,8580 ± 0,4040
Proteína	3,3834 ± 0,1521
Lactose	4,4933 ± 0,1054
Sólidos totais	12,6983 ± 0,4519

Os resultados obtidos estão em conformidade com os padrões exigidos pela IN 51 para o leite cru refrigerado.

Souza et al. (2008), ao analisarem dados do Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite, de amostras coletadas em Minas Gerais, Espírito Santo e Rio Janeiro, no período de janeiro de 2007 a junho de 2008, encontraram resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo: 3,85% de gordura, 3,32% de proteína, 4,43% de lactose e 12,56% sólidos totais.

Silva (2011) analisou dados de 2.550 amostras de leite cru inspecionado pelo Serviço Estadual de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, dos anos de 2007 a 2009. Os teores médios de gordura, proteína, lactose e sólidos totais encontrados foram: 3,64, 3,21, 4,44 e 11,93, respectivamente, inferiores aos obtidos no presente experimento.

Em um levantamento de dados de composição de leite analisado no

Laboratório de Fisiologia da Lactação, da ESALQ, no período de dezembro de 1996 a julho de 1997, Machado, Pereira e Sarríes (2000) encontraram os seguintes valores médios: 3,61% de gordura, 3,20% de proteína, 4,51% de lactose e 12,37% de sólidos totais. Os desvios padrão obtidos para esses constituintes foram, respectivamente: 0,59%, 0,22%, 0,17% e 0,68%. Pode-se perceber que, assim como no presente estudo, o teor de gordura apresentou alta variação entre as amostras analisadas. O resultado está de acordo com o esperado, devido aos fatores genéticos e ambientais que influenciam no teor desse constituinte.

5.2.1. Correlação entre os teores dos constituintes do leite e a contagem de psicrotróficos

Os resultados obtidos através da correlação de Spearman para analisar a influência da contagem de psicrotróficos sobre os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado encontram-se expostos na tabela 7.

Tabela 7. Correlação entre o logaritmo da contagem de psicrotróficos e os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado.

Constituinte do leite	Coefficiente de Correlação
Gordura	-0,2197*
Proteína	-0,0534
Lactose	-0,0458
Sólidos Totais	-0,1635*

* Valores de correlação significativos ($p < 0,01$)

Houve correlação negativa entre a contagem de psicrotróficos e os teores dos constituintes do leite, sendo a gordura e os sólidos totais as variáveis mais afetadas. Cerca de 22 % do teor de gordura do leite foi determinado pela sua contagem de micro-organismos psicrotróficos, e aproximadamente 17% da concentração de sólidos totais foi reduzida em função dessas bactérias.

Sabe-se que os psicrotróficos produzem lipases e fosfolipases que degradam a gordura do leite, o que ocasiona a redução da mesma e, conseqüentemente, dos sólidos totais.

Os teores de proteína e lactose foram pouco influenciados pela contagem de psicrotróficos ($r = -0,0795$ e $0,0078$; respectivamente). Apesar desses micro-organismos produzirem proteases (Chen, Daniel e Coolbear, 2003). Possivelmente, a presença de psicrotróficos proteolíticos não era representativa nas amostras analisadas.

5.2.2. Correlação entre a composição centesimal e a contagem bacteriana total do leite

Os coeficientes de correlação entre a contagem bacteriana total e os teores dos constituintes do leite encontram-se expostos na tabela 8.

Tabela 8. Correlação entre o logaritmo da contagem bacteriana total e os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado

Constituinte do leite	Coefficiente de correlação
Gordura	-0,2130
Proteína	-0,1772
Lactose	-0,1912
Sólidos Totais	-0,2335

Valores de correlação significativos ($p < 0,05$)

O teor de sólidos totais foi a variável mais afetada pelo valor de CBT ($r = -0,2335$). Como o teor de sólidos totais é dependente dos teores de gordura, lactose e proteína, e todos esses constituintes apresentaram decréscimo com o aumento da CBT, o somatório das porcentagens desses constituintes apresentou uma queda ainda

mais acentuada que quando analisados isoladamente.

O coeficiente de correlação entre a CBT e o teor de gordura ($r = -0,2130$) foi muito próximo do coeficiente de correlação obtido entre a porcentagem desse constituinte e a contagem de psicrotróficos no leite ($r =$

0,2197) (tabela 6). Isso pode ser justificado pelo fato de que os psicrotróficos são o grupo de micro-organismos do leite mais atuante na degradação da gordura do mesmo, devido à produção de lipases por essas bactérias. Corroborando com essa afirmativa, a correlação entre a CBT e a contagem de psicrotróficos mostrou-se moderada ($r=0,6695$) (tabela 4).

Andrade, Hartmann e Masson (2009), analisaram os dados de composição e CBT de amostras de leite oriundas de rebanhos na região de Curitiba, Paraná. Os pesquisadores observaram que as médias de gordura e proteína diminuíam com o aumento da CBT, o que corrobora com os resultados aqui apresentados.

A lactose também apresentou correlação negativa com a CBT ($r= -0,1912$). Trata-se de um componente do leite facilmente degradado pela atividade bacteriana (Fonseca e Santos, 2000). A contagem bacteriana também influenciou negativamente o teor de proteínas do leite ($r= -0,1772$), devido à produção de proteases por esses micro-organismos.

Bueno et al. (2008), ao avaliar dados de amostras de leite de tanque do Estado de Goiás, analisadas entre outubro de 2002 e setembro de 2003, verificaram que apenas a lactose reduziu significativamente conforme ocorria elevação da contagem bacteriana. Por outro lado, o coeficiente de correlação entre a CBT e o teor de proteína foi positivo, diferente do que foi observado no presente experimento. Os autores justificaram essa correlação com base na possível concentração relativa do teor de proteína, em função da degradação do teor de lactose e de gordura.

5.3. Contagem de células somáticas

O valor médio de CCS obtido foi de $6,84 \times 10^5$ céls/mL. Após a transformação dos

resultados em logaritmo de base dez, o desvio padrão encontrado foi de 0,35.

O limite máximo de contagem de células somáticas por mililitro de leite estabelecido pela IN 51 que vigorou no ano de 2011 foi de 750.000 céls./mL. Sendo assim, 79,38% das amostras analisadas encontraram-se dentro dos padrões legais brasileiros, enquanto 20,62% estavam inconformes.

Mesquita et al. (2008) analisaram dados de CCS de amostras de leite analisadas no Laboratório de Qualidade do Leite de Goiás, do período de janeiro de 2007 a julho de 2008. As amostras eram oriundas da Região Norte (Tocantins, Pará e Rondônia), Centro Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e de parte de Minas Gerais. Os pesquisadores obtiveram resultados mais conformes para CCS quando comparados a esse estudo: apenas 6% do total analisado apresentaram contagens superiores a 750.000 céls./mL.

Dados de amostras de leite analisados no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa, no período de janeiro de 2007 a junho de 2008, possuíam média de CCS de 372.000 céls./mL. Do total de amostras analisadas, 79,8% atenderam ao limite preconizado pela IN 51. Esse percentual foi bem próximo do aqui obtido (Souza et al., 2008).

Lima (2007), ao analisar 183 amostras de leite provenientes da Zona da Mata de Minas Gerais, no período de fevereiro e março de 2006, constatou que 84,1% das amostras estavam em conformidade com o padrão legal. As amostras eram de produtores que entregavam o leite em estabelecimentos com inspeção estadual.

5.3.1. Correlação entre a contagem de células somáticas e a composição centesimal do leite

Os coeficientes obtidos da correlação de Spearman entre o logaritmo da contagem de

células somáticas e os teores percentuais de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do

leite estão expressos na tabela 9.

Tabela 9. Correlação entre a contagem de células somáticas (log céls./mL) e os teores percentuais de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite cru refrigerado

Constituinte do leite	Coefficiente de correlação com o logaritmo da CCS
Gordura	-0,0719
Proteína	-0,0925
Lactose	-0,7180*
Sólidos totais	-0,1346*

* Valores de correlação significativos ($p < 0,01$)

Observa-se que o constituinte do leite mais afetado pela contagem de células somáticas foi a lactose ($r = -0,7180$). Sabe-se que este é o componente do leite responsável pelo volume de produção da glândula mamária. Quando ocorre afecção do úbere, a síntese de leite é reduzida devido a lesões no epitélio secretor, portanto, há redução da habilidade de síntese da glândula e conseqüentemente, ocorre redução da produção de lactose. Além disso, nos casos clínicos, o edema da glândula pode limitar o aporte de glicose, limitando ainda mais a síntese de lactose. Somam-se a esses fatores a perda de lactose para a corrente sanguínea, decorrente do aumento da permeabilidade da membrana dos capilares, e a utilização da lactose pelos patógenos intramamários (Paula et al., 2004).

O resultado encontrado está de acordo com o encontrado por Prada e Silva et al. (2000). Esses pesquisadores analisaram 1.361 amostras de leite cru em um estudo em Piracicaba, São Paulo. As amostras com contagens de células somáticas menores que 283.000 céls./mL foram consideradas oriundas de vacas sadias e as com contagem maior ou igual a 283.000 céls./mL foram consideradas oriundas de vacas com mastite. Em seguida, os dados foram organizados em dez grupos de acordo com o nível de infecção da glândula mamária. Observou-se uma correlação negativa entre a concentração de lactose e a contagem de células somáticas, com coeficiente de correlação de -0,343. Já a concentração de

sólidos totais não apresentou correlação significativa com a contagem de células somáticas, com coeficiente de -0,023.

Cunha et al. (2010), em um estudo realizado em propriedades integrantes do programa de controle leiteiro da Associação de Criadores de Gado Holandês de Minas Gerais, verificaram a ocorrência de mastite subclínica em animais da raça holandesa, e a relação entre a contagem de células somáticas com a ordem de lactação, com a produção e com a composição química do leite. A correlação entre a contagem de células somáticas e a produção de leite foi negativa (-0,1837), e entre a contagem de células somáticas e a porcentagem de gordura e de proteína, positivas (0,0719 e 0,01505, respectivamente). Animais com maior número de lactações apresentaram maior contagem de células somáticas, e animais com CCS acima de 100.000 céls/mL apresentam menor produção de leite.

Céron-Muñoz et al. (2002) também encontraram coeficiente de correlação significativo e negativo entre a CCS e o teor de lactose do leite, e entre a CCS e a produção de leite, ao analisarem amostras de leite de um rebanho de 222 búfalas da raça Murrah, em São Paulo. Os resultados mostraram que o rendimento do leite e a porcentagem de lactose diminuíram com o aumento da CCS, causando perdas na produção de leite de búfalas.

A gordura e a proteína apresentaram correlação baixa, porém significativa, com a CCS ($r = -0,0719$; $-0,0925$, respectivamente).

O aumento da CCS em decorrência da mastite acarreta redução da síntese de gordura e dos demais componentes do leite, mas em contrapartida, ocorre a concentração da gordura, devido à redução do volume de leite produzido. Sendo assim, um efeito contrabalança o outro, e o resultado esperado é que a concentração de gordura apresente alterações insignificantes com o aumento da CCS (Paula et al., 2004).

Com o teor de proteína do leite, ocorre uma situação semelhante: a mastite leva à redução da síntese de proteína, porém ocorre aumento da permeabilidade vascular, com afluxo de proteínas plasmáticas para o leite. Dessa forma, o resultado encontrado foi condizente com os efeitos da mastite sobre a glândula mamária.

A porcentagem de sólidos totais também não se altera significativamente com a elevação da contagem de células somáticas, devido ao mecanismo compensatório entre os constituintes do leite que aumentam e os que reduzem com a elevação da CCS. No presente trabalho, o coeficiente de correlação entre a CCS e a porcentagem de sólidos totais foi de $-0,1346$.

5.3.2. Correlação entre a contagem de células somáticas e a contagem bacteriana total

A correlação existente entre a contagem bacteriana total e a contagem de células somáticas não foi significativa ($p < 0,01$). Tal fato já era esperado, pois muitos micro-organismos causadores de mastite, como *Staphylococcus aureus*, normalmente não contribuem significativamente com o aumento da CBT do tanque (Murphy e Boor, 2000).

Sá et al. (2004), ao avaliarem a relação do *Staphylococcus aureus* e de suas enterotoxinas com a contagem de células somáticas, verificaram que não houve aumento estatisticamente significativo na CCS conforme aumentava a contagem de cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas.

Lima et al. (2006), em experimento realizado na Universidade Federal de Pernambuco, observaram que não houve variação na contagem bacteriana total do leite nos diferentes intervalos de contagem de células somáticas: < 400.000 céls./mL, de 400.001 a 750.000 céls./mL e > 750.000 céls./mL. Esses pesquisadores afirmaram que não há uma relação entre a elevada CCS e a CBT no leite.

6. CONCLUSÕES

Há correlação moderada entre a contagem de micro-organismos psicrófilos e mesófilos (enumerados através do método de referência) com os valores de contagem bacteriana obtidos por citometria de fluxo, o que permite estabelecer curvas de calibração para o equipamento Bactocount IBC® em função desses dois grupos bacterianos.

A fraca correlação entre os valores obtidos da contagem padrão em placas de termófilos e de termodúricos com os valores de contagem bacteriana determinados pela citometria de fluxo inviabiliza a calibração do equipamento eletrônico para análise destes micro-organismos por citometria de fluxo.

As contagens de mesófilos e de psicrófilos apresentaram alta correlação entre si, demonstrando a elevada contaminação do leite por micro-organismos que se multiplicam em temperaturas de refrigeração.

A contagem de psicotróficos influencia negativamente o teor de gordura, enquanto a contagem de células somáticas, o teor de lactose do leite.

A contagem bacteriana total não influenciou a contagem de células somáticas no leite, porém apresentou correlação negativa com os teores de gordura, lactose, proteína e sólidos totais.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de métodos instrumentais para quantificação de micro-organismos no leite, como a citometria de fluxo, é, sem dúvida, fator decisivo para a maior rapidez e precisão na obtenção dos resultados. No entanto, a precisão dessas metodologias será tão maior quanto maiores forem os

critérios de calibração dos equipamentos. Dessa forma, a continuidade dos estudos como o aqui apresentado é fundamental para o constante aprimoramento tecnológico.

Uma perspectiva de trabalho futuro é a criação curvas de calibração para o Bactocount IBC®, através da obtenção de equações de regressão linear entre os resultados obtidos nas contagens padrão em placas de termófilos e termodúricos e os valores de contagem bacteriana total determinados por citometria de fluxo. Para isso, deverão ser selecionadas amostras de leite cru refrigerado que apresentem contagens medianas ou elevadas de micro-organismos desses grupos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDIST, M. J.; HUBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Australian of Journal Dairy Tecnology*, v.53, p.28-36, 1998.
- ÁLVAREZ-BARRIENTOS, 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.
- ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; MASSON, L. M. *Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite*. *Ars Veterinária*, v. 25, n.3, p. 129-135, 2009.
- ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO LEITE, IMPACTO PARA A INDÚSTRIA E A QUESTÃO DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS, 2003, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: CBQL, 2003. p.105-115.
- ARCURI, E. F., SILVA, P. D. L., BRITO, M. A.V. P. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, v.38, p.2250-2255, 2008.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. BactoCount 150 operator's manual. Chaska: Bentley Instruments Inc., 2002. 49p.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. Bentley 2000 operator's manual. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1998. 79p.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an involving disease. *The Veterinary Journal*, v.164, p.116-128, 2002.
- BRASIL – Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Diário Oficial da União, Brasília, Seção1, 07 de julho de1952.
- BRASIL. Instrução normativa n.51, de 18 de setembro de 2002. *Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite*. Diário Oficial da União, Brasília, Seção1, p. 13, 21 de setembro de 2002.
- BRASIL. Instrução normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. *Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água*. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, p. 14, 18 de setembro de 2003.
- BRASIL. Instrução normativa n.62, de 30 de dezembro de 2011. *Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite*. Diário Oficial da União, Brasília, Seção1, p. 6, 30 de dezembro de 2011.
- 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.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; et al. *Biology of microorganisms*. 7 ed. New Jersey: rentice-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: UFP, 2004. p.316-331.

BRUM, M. A. R.; VALENTI, P. A. Flora mesófila, termodúricos e germes termófilos no leite cru consumido em Santa Maria, RS. *Revista do Centro de Ciências Rurais*, v.4, n.4, p.379-382, 1974.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J. O.; 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: UFP, 2004, p.301-306.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVEIRA, A. N. et al. Contagem bacteriana do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 15, n. 1, p. 40-44, 2008.

BURCHARD, J. F.; BLOCK, E. Nutrição do gado leiteiro e composição do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE, 1998. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.16-19.

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 Dairy of Technology*, v.60, n.1, p.44-48, 2008.

CASSOLI, L. D., FRANCISCHETTI, G., MACHADO, P. F. et al. The relationship of flow cytometry results with classical measures of bacterial counts in raw milk refrigerated milk. *International Journal of Dairy Technology*, v.63, n.2, p.297-300, 2010.

CASTRO, J. F. de. *Azidiol comprimido como conservante do leite cru destinado a contagem microbiana por citometria de fluxo*. 2007. 37 f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 51, p. 59-63, 1996.

CÉRON-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J. et al. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk constituents and milk yield in buffaloes. *Journal Dairy Science*, v.85, p.2885-2889, 2002.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

COOK, G. M., SANDEMAN, R. M. Sources and characterization of spore-forming bacteria in raw milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 55, n.3, 2000.

CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. V. et al. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com o número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

DÜRR, J. W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite: uma oportunidade única. In: O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UFP, 2004, p. 38-55.

EMANUELSON, U.; FUNKE, H. Effect of milk yield on relationship between bulk milk somatic cell count and prevalence of mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.74, p.2479-2483, 1991.

EMBRAPA. GADO DE LEITE. *Estatísticas do leite*. Juiz de Fora, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br>>. Acesso em: 30 de Agosto de 2010.

EVANGELISTA, D. T. *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*. 2008. 65 f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FINNEY, D. J. *Statistics for biologists*. London: Chapman and Hall, 1980. 165 p.

FLINT, S.; WALKER, K.; WATERS, B. et al. Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders. *Journal of Applied Microbiology*, v.102, n.4, p.909-915, 2007.

FONSECA, L. F. L. Qualidade do leite e sua relação com equipamentos de ordenha e sistema de resfriamento. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE, 1998. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.54-56.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos, 2000.

FONSECA, C. S. P. *Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais*. 2005. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária,

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. São Paulo: Artmed, 2000. 424p.

GIGANTE, M. L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UFP, 2004, p.235-254.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. *Higiene Alimentar*, v. 16, n. 102-103, p. 25-34, 2002.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D. A. A flow cytometric method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.1228-1232, 2000.

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

HARMON, J. R. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE, 1998. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.7-15.

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.

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.
- IDF, *International IDF Standard 120:1980*: Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. Brussels, 4f, 1980.
- IDF. *International IDF Standard 100B:1991*: Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C. Brussels, 3f, 1991 (a).
- IDF. *International IDF Standard 148A:1995*: Milk – Enumeration of somatic cell. Brussels, 8f, 1995 (a).
- IDF. *International IDF Standard 141C:2000*: Whole milk – determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Brussels, 15f, 2000.
- JATOBÁ, R. B. *Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipamento Bactocount para o monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado*. 2009. 47f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- JAY, J. M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. 3 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 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.
- LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. (Eds.). *Microbiologia dos alimentos*, São Paulo: Atheneu, 1999. p. 109-148.
- LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das altas contagens microbianas. In: **DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO LEITE, IMPACTO PARA A INDÚSTRIA E A QUESTÃO DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS**, 2003, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: CBQL, 2003. p.117-138.
- LEITÃO, M. F. F.; TEIXEIRA, L. T.; MORI, E. E. M. Bactérias termodúricas não esporogênicas e seu significado na qualidade do leite comercial pasteurizado. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v.17, p.54-64, 1987.
- 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.
- LIMA, L. L. *Características da produção e qualidade do leite cru na Zona da Mata de Minas Gerais*. 2007. 52f. Dissertação Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LIMA, M. C. G.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. et al. Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru tipo C produzido na região Agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, n.01, p.89-95, 2006.

- 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, 2000.
- MACHADO, P. F.; CASSOLI, L. D.; COLDEBELLA, A. *et al.* Panorama da qualidade do leite na Região Sudeste – São Paulo. In: DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE DO LEITE, IMPACTO PARA A INDÚSTRIA E A QUESTÃO DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS, 2003, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: CBQL, 2003. p.39-45.
- MARSHALL, R.T. Standard methods for the examination of dairy products. Baltimore: American Public Health Association, 1992. 546 p.
- MARTINS, M. L., PINTO, C. L. O., ROCHA, R. B. *et al.* Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.111, p.144-148, 2006.
- MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; COELHO, K. O. *et al.* A qualidade do leite na Região Centro Oeste. In: PERSPECTIVAS E AVANÇOS NA QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL. Goiânia: Talento, 2006. Cap. 1, p. 9-21.
- MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; BUENO, V. F. F. *et al.* A qualidade do leite na Região Centro Oeste e Norte do Brasil avaliada no Laboratório de Qualidade do Leite - Goiânia - GO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008, Recife. *Anais...* Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008. v.3. p.11-23.
- MONARDES, H. Programas de pagamento de leite por qualidade em Québec, Canadá. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE, 1998. *Anais...* Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.40-43.
- MONARDES, H. Reflexões sobre a qualidade do leite. In: O COMPROMISSO COM A QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL, 2004, Passo Fundo. *Anais...* Passo Fundo: UFP, 2004, p.11-37.
- 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.8, p.606-611, 2000.
- NERO, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; MATTOS, M. R. *et al.* Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.1, p.191-195, 2005.
- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, p.386-390, 2009.
- NEVES, R. B. S. *Influência do grupo de micro-organismos – mesófilos, psicrotóxicos – na linearização dos resultados do equipamento Bactoscan FC®*. 2008. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- NINANE, V., REU, K., OGER, R. *et al.* Évaluation du Bactoscan FC por la numeration des bactéries de lait cru. *Le lait*, v.80, p.527-538, 2000.
- OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens, mastitis, milk quality, and dairy food safety. In: *NMC Annual Meeting Proceedings*, 2005.

- 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.429-433, 1999.
- PEREIRA JÚNIOR, F. N. *Comparação de métodos de enumeração e de estimativa de micro-organismos psicotróficos em leite cru e avaliação do método de Moseley*. 2002. 36 f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PICININ, L. C. A. *Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais*. 2003. 89 f. Tese (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.3, p.645-651, 2006.
- 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.
- 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.
- ROSA, L. S. da; QUEIROZ, M. I. Avaliação da qualidade do leite cru e refrigerado mediante a aplicação de princípios do APPCC. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.2, p.422-430, 2007.
- SÀ, M. E. P.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O. *et al.* Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41,n.5, 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962004000500005&lng=pt&nrm=iso> Acesso em 15/02/2012.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- SAS INSTITUTE INC. *SAS/STAT User's guide. Version 8*, Cary, NC: SAS Institute Inc.,1999.
- SILVA, A. M. *Estudo da composição química, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite cru inspecionado pelo Serviço Estadual nos Estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte*. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- SILVA, T. L.; REIS, A.; HEWITT, C. *et al.* Citometria de fluxo- Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*, v.74, p.32-40, 2005. Disponível em: <<http://dequim.ist.utl.pt/bbio/77/pdf/citometria2.pdf>> Acesso em: 12/05/2010.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L.. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, v. 8, p. 35-41, 1997.

SOUZA, G. N. ; BRITO, M. A. V. P. ; LANGE, C. C. ; FARIA, C. G. ; MORAES, L. C. D. ; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de rebanhos bovinos localizados na Região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro - Janeiro/2007 a Junho/2008. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008, Recife. *Anais...* Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008. v.3. p.11-21.

>Acesso em 12/05/2010.

SOUZA, V.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M. et al. Características microbiológicas de amostras de tanque de leite comunitário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61. n.3, p. 758-761, 2009.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacteria count in raw milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n. 358, p.36-48, 2000.

SUHREN, G., LOMBARDI, B. Determination of total bacterial count in raw milk in EU-Members states: outcome of the 2006 questionnaire to the NRL's Milk. Disponível em: <<http://www.rikilt.wur.nl/NL/publicaties/Rapporten/>>