

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA

**CURVA DE CONVERSÃO DE CONTAGEM BACTERIANA INDIVIDUAL EM
CONTAGEM PADRÃO EM PLACA**

RODRIGO BARROS DE LUCENA

RECIFE – PE

2016

RODRIGO BARROS DE LUCENA

**CURVA DE CONVERSÃO DE CONTAGEM BACTERIANA INDIVIDUAL EM
CONTAGEM PADRÃO EM PLACA**

Tese apresentada ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, do qual participam a Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção Animal

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Ângela Maria Vieira Batista – Orientador principal

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2016**

Ficha catalográfica

L935c Lucena, Rodrigo Barros de
Curva de conversão de contagem bacteriana individual
em contagem padrão em placa / Rodrigo Barros de Lucena. –
Recife, 2016.
91 f. : il.

Orientadora: Ângela Maria Vieira Batista.
Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia, Recife, 2016.
Referências.

1. Citometria de fluxo 2. Contagem bacteriana total
3. Contagem padrão em placa 4. Qualidade do leite cru I. Ângela
Maria Vieira Batista, orientadora II. Título

CDD 636

RODRIGO BARROS DE LUCENA

**CURVA DE CONVERSÃO DE CONTAGEM BACTERIANA INDIVIDUAL EM
CONTAGEM PADRÃO EM PLACA**

Tese defendida e aprovada pela Comissão Examinadora em 29 de fevereiro de 2016

Comissão Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Guim
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Sampaio de Medeiros
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Andreia Paiva Botelho Lapenda de Moura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Severino Gonzaga Neto
Universidade Federal da Paraíba

Prof^ª. Dr^ª. Ângela Maria Vieira Batista
Universidade Federal Rural de Pernambuco

RECIFE – PE

MARÇO-2015

Ele foi guerreiro, superou as previsões médica e em pouco tempo ensinou o verdadeiro significado da vida, transmitiu paz e amor para todos que viveram a sua história. E por ser tão puro, repleto de bondade e amor, Deus resolveu transforma-lo em um lindo anjinho.

Ele me ensinou a aceitar as adversidades, a acreditar, proteger e amar incondicionalmente.

Transformou dias em momentos eternos e inesquecíveis, e me ensinou a enxergá-lo com o coração.

Por ele superei meus medos e anseios e pude viver a mais linda história de amor.

Com ele aprendi a ser pai de anjo e aceitei a difícil missão de entregá-lo a Deus.

Com ele aprendi a maior de todos os ensinamentos. Que a medida do amor, é amar sem limites, é amar sem medida

Por ele vivo ansiosamente esperando o dia do nosso reencontro.

Ele é meu maior orgulho e é o meu maior presente de Deus, é um orgulho tê-lo como meu filho.

Ao meu filho e agora anjo protetor,

Davi Lucas

“NÃO ESTÁ LONGE DE NÓS QUEM ESTÁ PERTO DE DEUS”

Dedico

*Aquela que sempre me apoiou, que dividiu comigo vitórias e tristeza, me incentivou e
construiu comigo essa família tão especial.*

Minha amiga, companheira, querida, amada, esposa e agora mãe dos meus filhos

Patricia Pontual.

*Aquele que chegou para aumentar ainda mais o nosso amor, que é motivo dos meus
sorrisos mais sinceros e que me fez experimentar mais uma vez esse sentimento puro e
intenso que é ser pai*

Daniel.

*Ao meus amados pais e irmãos por todo amor, carinho, apoio e por tudo que representam
na minha vida.*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso pai maior, que dá força para minha luta diária, pelas provas que nos aperfeiçoam o raciocínio e nos abrandam o coração, pela benção da oração que nos faculta apoio interior para a solução de nossos problemas e pela tranquilidade de consciência que ninguém nos pode subtrair.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e a todos os professores da graduação e pós-graduação que não mediram esforços para transmitir da melhor forma possível todos os seus conhecimentos. Profissionais capazes de mudar a vida de seus alunos.

A minha orientadora, Ângela Maria Viera Batista, pela convivência e oportunidade concedida, pela confiança em mim depositada desde a graduação e pelos conhecimentos proporcionados na área profissional e principalmente pelo exemplo como ser humano.

Aos amigos da graduação e pós-graduação: Rafael De Paula, Anidene Christina, Ana Maria Duarte Cabral, Guilherme Bigode, Alessandra, Evaristo, Eduardo Bruno (*in memorian*), Almir Ferreira, Guilherme Caixa, Rafael Aquino, Fredson, Gabriel, Chicó, Alvaro.e todos os demais pela agradável e divertida convivência e colaboração.

Meu sincero muito obrigado!

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”

(Mahatma Gandhi)

SUMÁRIO

	Página
Referencial Teórico.....	1
Referências Bibliográficas.....	17
Capítulo 1 – Qualidade microbiológica e composição química do leite cru em função da estação do ano, no diferentes estados do Nordeste brasileiro.	
Resumo.....	24
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Material e Métodos.....	29
Resultados e Discussão.....	32
Conclusão.....	48
Referências Bibliográficas.....	49
Capítulo 2 – Estabelecimento de uma curva de conversão de contagem bacteriana individual em contagem padrão em placa	
Resumo.....	55
Abstract.....	56
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	63
Resultados e Discussão.....	68
Conclusão.....	76
Referências Bibliográficas.....	77

REFERENCIAL TEÓRICO

A produção do leite, bem como seus derivados, tem sido utilizados como alimento pelos humanos desde os tempos pré-históricos, sendo obtido de vaca, cabra, búfalo, ovelha, dentre outras espécies. Isso ocorre devido ao seu papel nutricional importante para a alimentação e saúde do homem, particularmente nos primeiros anos de vida, uma vez que fornecem proteínas de alta qualidade, carboidratos, gorduras e sais minerais necessários ao desenvolvimento do organismo.

Do ponto de vista biológico, o leite é o produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cuja função natural é a alimentação dos recém-nascidos (Pereda et al., 2005), já no aspecto técnico a RISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal através do artigo 475, define: "Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda". Esse alimento é composto por nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores sanguíneos filtrados nas células alveolares. Para Hurley, (2009) o leite é uma mistura complexa de nutrientes, formado por uma emulsão de glóbulos de gordura e uma fase aquosa onde estão suspensas as micelas de caseína (ligadas ao cálcio e fósforo), lactose, proteínas do soro e minerais.

De acordo com Tronco (2010), a glândula mamária é uma diferenciação especial do tecido da pele de mamíferos, onde a mesma encontra-se conectada ao organismo através do sistema circulatório e do sistema nervoso central (SNC). A produção de leite pela glândula mamária ocorre através da transformação de substâncias trazidas da corrente sanguínea,

como glicose, ácidos graxos, aminoácidos, minerais, vitaminas e água. Sendo que estes nutrientes são provenientes diretamente da dieta ou após sofrerem modificações nos tecidos dos animais antes de alcançar a glândula (Tronco, 2010).

Apesar dos processos metabólicos para síntese do leite serem (relativamente) semelhantes nas diferentes espécies produtoras, a produção e a proporção de cada componente no leite está influenciada, em diferentes graus, por vários fatores, os quais exercem influência direta (em quantidade e qualidade) sobre o produto final, sendo que essas alterações vem ganhando importância no mercado cada vez mais exigente quanto à qualidade (nutricional e microbiológica) dos produtos lácteos comercializados.

Segundo Morand-Fehr et al. (2007), vários são os fatores que podem influenciar na produção, composição e qualidade do leite, sendo que estes podem estar relacionados aos animais (raça, sanidade, nutrição, reprodução e estágio de lactação), ao ambiente de criação e principalmente ao manejo alimentar. Essas alterações que são observadas na composição final do leite tornam-os importantes para o consumo humano, o que se deve a fatores como a presença de proteínas de alto valor biológico, gordura de elevada digestibilidade, presença de componentes desejáveis para o processamento de derivados, entre outros. Sendo que essas alterações vêm ganhando importância no mercado cada vez mais exigente quanto à qualidade (nutricional e microbiológica) dos produtos lácteos comercializados.

A crescente relevância dada a variação da composição nutricional do leite, surge em resposta as tendências de um mercado consumidor cada vez mais informado e exigente na busca por alimentos saudáveis e de boa qualidade. Além disso, a fim de atender as exigências impostas pelo mercado, as indústrias buscam matéria-prima de qualidade, que seja capaz de fornecer maior rendimento e segurança na fabricação do leite e dos seus derivados.

A cadeia produtiva do leite pode demonstrar sua responsabilidade com a sociedade, assumindo o compromisso com a saúde do consumidor fornecendo produtos seguros, saudáveis e competitivos (Brito, 2008). Neste sentido, o setor leiteiro brasileiro vem passando por um intenso processo de modernização com significativas mudanças no sistema de produção, armazenamento e transporte para garantir a qualidade do produto final.

Mesmo apresentando uma série de benefícios para saúde do homem devido aos componentes presentes em sua composição, o leite é, também, um bom meio de cultura para muitos microrganismos. Em função do número e do tipo de microrganismo, alterações indesejáveis podem ser observadas na aparência, sabor ou odor do leite ou de seus derivados. Além das alterações nas características organolépticas do leite provocada por microrganismos, alguns deles podem representar risco à saúde do consumidor (Fonseca; Santos, 2000). Desta forma, torna-se necessário a adoção de medidas que visem garantir a qualidade deste alimento, bem como a adoção de análises que possa garantir a segurança alimentar por parte do consumidor.

- Qualidade do leite

O termo qualidade vem do latim *qualitate*, que pode ser utilizado em situações distintas, como exemplo, do ponto de vista de produção, a forma que ocorre o processo para obtenção do produto e se este atende às exigências dos consumidores. Do ponto de vista do produtor, a qualidade se associa à concepção e produção de um produto que vá ao encontro das necessidades do cliente. Já do ponto de vista do cliente, a qualidade está associada ao valor e à utilidade reconhecida ao produto. Outro ponto diz respeito à

composição do produto, suas propriedades nutricionais, durabilidade, funcionalidade e a segurança que ele oferece (Jatobá, 2009).

Os principais elementos que definem a qualidade do leite são: a composição (gordura, proteína, lactose), a contagem de células somáticas, a contagem bacteriana, a ausência de adulterantes (água, resíduos de antimicrobianos, substâncias químicas e outros), a qualidade sensorial (odor, sabor, aspecto) e a temperatura (Monardes, 1998; Brasil, 2002). O conhecimento da composição do leite é essencial para a determinação de sua qualidade, pois define diversas propriedades sensoriais e industriais. Os parâmetros de qualidade são cada vez mais utilizados para detecção de falhas nas práticas de manejo, servindo como referência na valorização da matéria-prima.

Ainda na glândula mamária, o leite normal é considerado estéril, entretanto, durante todo o trajeto até sua ejeção (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 das medidas profiláticas, nos equipamentos de ordenha e/ou no tanque de refrigeração.

Além da contaminação natural (durante a ejeção do leite) e da contaminação provocada por falha no manejo sanitário, o aumento do número de microrganismos no leite pode ser provocada pela incidência da mastite. A influência da mastite sobre a contagem bacteriana total do leite de tanque depende do microrganismo 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.

A presença de microrganismos na glândula mamária provoca modificações do tecido glandular, sendo os grandes responsáveis pelas alterações na qualidade do leite produzido. Os principais mecanismos pelos quais ocorrem alterações nos níveis dos

componentes do leite são: aumento na permeabilidade vascular da glândula mamária, determinando aumento da passagem de substâncias do sangue para o leite, como sódio, cloro, imunoglobulinas, soroalbuminas, entre outras proteínas; alteração na síntese dos nutrientes do tecido secretor, podendo modificar a concentração dos principais componentes do leite como gordura, proteína e lactose e ação direta dos patógenos ou de enzimas sobre os componentes já secretados no interior do quarto (Machado et al., 2000).

Além da saúde da glândula mamária, uma série de fatores pode influenciar na qualidade do leite cru, entre os quais se destacam os fatores de caráter zootécnico como: o manejo, a alimentação e o potencial genético dos rebanhos, e outros relacionados à obtenção e armazenamento do leite recém-ordenhado (Guerreiro et al., 2005). Segundo Oliveira et al. (1999), os fatores zootécnicos, os associados ao manejo, à saúde da glândula mamária, à alimentação e ao potencial genético dos rebanhos são responsáveis pelas características de composição do leite e, também, pela produtividade do rebanho. A obtenção e o armazenamento do leite *in natura*, por outro lado, relacionam-se com a qualidade microbiológica do produto, inclusive determinando o seu prazo de vida útil.

De acordo com Rosa e Queiroz, (2007) a existência de falhas durante os processos de obtenção, manipulação e conservação vem sendo considerada como uma das principais razões para a perda de qualidade do leite. Além disso, o leite pode torna-se um veículo de transmissão de doenças que este pode vir a desempenhar, caso não haja um conjunto de ações preventivas, desde a sua produção até a chegada ao consumidor final (Gracindo e Pereira, 2009). Com o aumento com a preocupação na alimentação e principalmente com a segurança alimentar por parte dos consumidores, tornou o mercado mais exigente em relação a qualidade de todos alimentos, inclusive os produtos lácteos, que sejam seguros, nutritivos e tenham sabor de um produto fresco (Mittelmann et al, 2009).

Neste sentido medidas de profilaxia, manejo nutricional, bem estar animal, qualificação da mão de obra, higiene dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha, bem como o transporte adequado até a indústria, são considerados fatores essenciais na qualidade do produto final.

A população microbiana do leite é contada ou estimada e usada como parâmetro para avaliar a saúde do úbere, bem como os cuidados higiênicos relacionados às etapas de obtenção, armazenamento e transporte do leite cru. A higiene durante a ordenha constitui o principal recurso na fonte de produção, relacionado ao período de conservação do leite, devido à impossibilidade de se reverter a sua qualidade de ruim para boa (CERQUEIRA, 2006).

A qualidade microbiológica é um dos aspectos mais importantes a ser considerada na avaliação do leite, devido ao risco de contaminação por microrganismos potencialmente nocivos a saúde humana. Os grupos de microrganismos (gênero ou espécie) apresentam capacidades de permanecerem viáveis, multiplicar-se, e comprometer a qualidade do leite e a saúde do consumidor de forma diferenciada (Horst, 2005). Sendo assim, apresentam efeitos diferenciados sobre a degradação dos componentes do leite para industrialização e altera as características dos produtos finais.

Para evitar à contaminação inicial do leite, a união e o esforço conjunto de todos os segmentos da indústria lactea, bem como o governo, torna-se primordial para garantir um leite de boa qualidade. Neste sentido, a adoção de medidas profiláticas deve ser aplicada. Segundo Guerreiro et al. (2005), a aplicação destas práticas em todo o processo de obtenção do leite proporciona diminuições significativas na contagem de bactérias psicotróficas no leite, o que comprova a importância das práticas preventivas de higiene sobre a qualidade do leite.

A higiene durante a ordenha constitui o principal recurso na fonte de produção, relacionado ao período de conservação do leite, devido à impossibilidade de se reverter a sua qualidade de ruim para boa (Cerqueira, 2006). Horst et al. (2005) citou que a contaminação da superfície dos tetos do animal varia conforme as condições de alojamento das vacas. Mesmo tetos aparentemente limpos podem carregar contaminações bacterianas. Já os equipamentos, acessórios e utensílios de ordenha, somente se mostram devidamente limpos quando higienizados com produtos bactericidas, pois os resíduos de leite constituem meio favorável à proliferação dos microrganismos (Horst, 2005).

A higiene durante a ordenha constitui o principal recurso na fonte de produção relacionado ao período de conservação do leite, devido à impossibilidade de se reverter a sua qualidade de ruim para boa. A manutenção dessa qualidade depende das condições adequadas de armazenamento do leite na propriedade e de seu transporte até a indústria (Cerqueira et al., 1999).

Durante o procedimento de ordenha, o equipamento utilizado para extração do leite, pode ser considerado uma grande fonte de contaminação do leite. Desta forma os procedimentos de limpeza e higienização tonam-se influência direta sobre o nível da carga microbiana. Os resíduos de leite que permanecem aderidos à superfície interna do equipamento de ordenha podem favorecer a multiplicação de grande variedade de microrganismos (Horst, 2006). Diante do que foi exposto, as medidas de higienização dos equipamentos de ordenha devem ser seguidos para evitar a proliferação de microrganismos.

A presença de microrganismos na água compromete a qualidade do leite. A água utilizada para a limpeza dos tetos, do equipamento de ordenha e utensílios empregados para a obtenção do leite devem ser de boa qualidade para garantir que não ocorra contaminação proveniente da água. Cerqueira et al. (2006) relatam em seu trabalho que se

a água utilizada para obtenção do leite for de baixa qualidade, além de aumentar a CBT do leite poderá veicular patógenos de importância em saúde pública.

- Microbiologia do leite

De acordo com Monardes (2004) devido ao risco de contaminação por microrganismos potencialmente nocivos a saúde humana, a qualidade microbiológica do leite deve ser considerada dos aspectos mais importantes na avaliação do leite. Para Horst, (2005) os grupos de microrganismos (gênero ou espécie) apresentam capacidades de permanecerem viáveis, multiplicar-se, e comprometer a qualidade do leite e a saúde do consumidor de forma diferenciada. Sendo assim, apresentam efeitos diferenciados sobre a degradação dos componentes do leite para industrialização e altera as características dos produtos finais.

Segundo Martins et al. (2008) os principais prejuízos industriais ocasionados pelo alto efetivo microbiano são: acidificação e coagulação, produção de gás, gelificação, sabor amargo, coagulação sem acidificação, aumento da viscosidade, alteração de cor, produção de sabores, odores variados, dentre outros, os quais diminuem a vida de prateleira e o rendimento industrial.

Sendo assim, população microbiana do leite é contada ou estimada e usada como parâmetro para avaliar a saúde do úbere, bem como os cuidados higiênicos relacionados às etapas de obtenção, armazenamento e transporte do leite cru. Segundo Philpot e Nickerson (2002), mais de 140 tipos de microrganismos podem causar infecções na glândula mamária, dentre os quais fazem parte desta lista, bactérias, micoplasmas, leveduras, algas, fungos e, em raras ocasiões, vírus. No entanto, as bactérias são as principais causadoras de

infecções intramamárias em vacas leiteiras e, de acordo com Philpot (1998), a maioria das mastites clínicas é causada por *estreptococos*, *estafilococos* e *coliformes*.

Os grupos de microrganismos contaminantes do leite podem depender do tipo de manejo aplicado e da conservação do leite após a ordenha. Para Cerqueira et al. (1999) a manutenção da qualidade do leite depende das condições adequadas de armazenamento na propriedade e de seu transporte até a indústria. No leite cru, encontra-se uma população bacteriana bem heterogênea, incluindo as psicotróficas, que podem se desenvolver a 7°C ou menos; independente de sua temperatura ótima de crescimento, as termodúricas; que podem sobreviver ao tratamento térmico; as lácticas, que possuem a capacidade de acidificar rapidamente o leite cru sem refrigeração; os coliformes e; as bactérias patogênicas, principalmente as envolvidas com a mastite (HAYES & BOOR, 2001).

As bactérias psicotróficas são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração do leite (abaixo de 7°C), sendo os principais agentes de deterioração de leite cru refrigerado. Altas contagens estão associadas a condições higiênicas deficientes, falhas na limpeza dos equipamentos de ordenha, temperatura de refrigeração do leite inadequada ou período longo de estocagem do leite refrigerado (superior a 48 horas) (Brito, 2010). Este grupo de bactérias em sua maioria produz proteases e/ou lipases a temperaturas de refrigeração. As proteases e lipases hidrolisam, respectivamente, a proteína e a gordura do leite, sendo que muitas destas enzimas não são desnaturadas durante o processo de pasteurização, permanecendo ativas no leite mesmo após o processamento térmico.

As bactérias termodúricas são capazes de sobreviver à temperatura de pasteurização (63°C por 30 minutos ou 72 a 75°C por 15 a 20 segundos). Elas podem se multiplicar em biofilmes nos equipamentos de ordenha. Altas contagens estão associadas a falhas persistentes de limpeza dos equipamentos de ordenha, rachaduras nos componentes de borracha, depósitos chamados de pedras de leite nas tubulações ou tetos muito sujos. A

maioria das bactérias termodúricas não é capaz de crescer sob as condições de refrigeração na qual o leite é armazenado (igual ou inferior a 4°C).

Já os coliformes, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.*, por exemplo, são encontrados nos dejetos dos animais, no solo e em água contaminada. Altas contagens de coliformes (acima de 50 ufc/ml) sugerem contaminação fecal de úberes e tetos sujos, deficiência na higiene da ordenha, falhas na limpeza dos equipamentos ou utilização de água contaminada na limpeza dos equipamentos (Brito, 2010).

De acordo com Pinto et al. (2006) a estocagem do leite cru sob refrigeração na fonte de produção reduz substancialmente as perdas econômicas por atividade acidificante de bactérias mesofílicas. Dessa forma a refrigeração do leite imediatamente após a ordenha tem por objetivo a conservação de sua qualidade, obtida durante a ordenha, e a diminuição da taxa de multiplicação dos microrganismos mesófilos, entre eles, os coliformes.

Verifica-se ainda que, no leite com baixa CBT ocorre predominância de bactérias gram-positivas e um leite com contagens elevadas prevalece às gram-negativas (SUHREN & REICHMUTH, 2000). Dentre as gram-negativas podemos destacar as bactérias dos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.* e *Alcaligenes sp.*, que podem causar maior preocupação, pela capacidade que possuem de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas de grande resistência térmica, ocasionando problemas durante o processamento do leite (TRONCO, 2010).

As contagens de microrganismos a que se refere à IN51 e IN62 são para mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis no leite. Os mesófilos fazem parte de um grupo de bactérias que fermentam a lactose em ácido lático e apresentam crescimento ótimo aproximadamente em temperatura na faixa de 32 a 35°C (TRONCO, 2010).

Compreende-se que a IN-51 foi grande passo para obtenção de um leite de melhor qualidade no país. É certo que há muito ainda por fazer, mas as expectativas de melhoria

são as mais elevadas possíveis para tornar o Brasil, além de grande produtor de leite, uma referência em produção e qualidade de leite.

- Métodos para contagem de bactérias no leite

O acesso a informações e um mercado consumidor cada vez mais exigente, aumentou a preocupação com a qualidade e inocuidade dos produtos e subprodutos de origem animal consumidos pela população e entre estes produtos encontra-se o leite. O leite apresenta excelente valor nutricional, tanto para os neonatos quanto para o ser humano em diferentes faixas etárias. Entretanto, devido ao seu alto valor biológico, torna-se um meio adequado ao crescimento de microrganismos patogênicos, portanto, o consumo de leite cru pode ser considerado um fator de risco para infecções alimentares.

O MAPA publicou em 2002 a Instrução Normativa 51 (IN51), que reúne normas de produção, identidade e qualidade de leites tipo A, B e C, pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel (Brasil, 2002). Entre os padrões de qualidade da IN 51 encontram-se: regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), composição química e caracterização física (BRASIL, 2002). Posteriormente a IN 51 foi complementada pela Instrução Normativa 62 (IN 62), que definiram limites da Contagem Bacteriana Total (CBT) e da Contagem de Células Somáticas (CCS), prevendo o uso de ordenhas e de refrigeração na propriedade ou em tanques de refrigeração comunitários (OLIVEIRA e SILVA, 2012; MAPA, 2003).

As CBT e CCS são métodos de referência usados como indicadores da qualidade do leite cru (Pantoja et al., 2009). As células somáticas do leite são consideradas células de defesa do organismo (leucócitos) que migram do sangue para o interior da glândula

mamária. E tem como objetivo o combate aos agentes causadores da mastite. Sendo assim, este parâmetro funciona como indicador da saúde da glândula mamária, da produção de leite do rebanho, da composição e da qualidade do leite. De acordo com Hartmann et al., (2009) elevados valores da contagem de células somáticas acarretaram maior influência negativa sobre a qualidade e quantidade do leite. O aumento na contagem de células somáticas, pode implicar em diversas mudanças na composição do leite, uma vez que ocorrem alterações na permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula e por conseguinte, reduz a síntese e secreção dos componentes do leite na glândula mamária (proteína, gordura e lactose).

A CBT é de particular interesse para o produtor e para a indústria, pois reflete as condições gerais de higiene no processo de produção do leite na fazenda. De acordo com Souza et al., (2008) as principais fontes de contaminação bacteriana do leite cru são: glândula mamária infectada (mastite) e má higiene da pele dos tetos e do úbere, de utensílios que entram em contato direto com o leite como baldes, equipamento de ordenha e tanque de refrigeração.

Sendo assim, a CBT deve ser utilizada como uma ferramenta importante para auxiliar no controle da qualidade do leite, já que fornece um perfil geral de todo o processo de ordenha, da saúde do úbere e do armazenamento e da coleta do leite (Fonseca et al., 1999). Sendo que a carga bacteriana inicial é influenciada pela limpeza e desinfecção da pele dos tetos e do úbere, da limpeza dos utensílios e equipamentos de ordenha e do tanque de resfriamento e da qualidade da água usada nesses procedimentos.

Os métodos utilizados para a determinação da qualidade microbiológica podem ser divididos em dois grupos, os qualitativos e os quantitativos. Entre os testes qualitativos, destacam-se: o teste da redutase, teste da fermentação e o teste da acidez. Apesar da

praticidade de realização, estes testes são subjetivos e indiretos, sendo utilizados apenas para um diagnóstico geral da qualidade do leite (Fonseca & Santos, 2000).

Dentre os testes quantitativos, destaca-se a contagem bacteriana total (CBT), em que são estimados o número de unidades formadoras de bactérias por mililitros de leite (UFC/mL). Para esta determinação, existem vários métodos disponíveis, dentre eles, a contagem em placa padrão (CPP) é considerado o método referência. A CPP é considerada o método oficial. Este método permite a visualização de colônias bacterianas formadas em placas de Petri (Brasil, 2003) e com este método obtém-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC).

O procedimento de contagem em placas é vantajoso pelo fato de ser de fácil realização. Além disso, mensura populações de qualquer grandeza em virtude das várias diluições realizadas e apresenta sensibilidade para detectar populações muito pequenas. Essa técnica é usualmente utilizada na contagem de microrganismos presentes na água, leite e alimentos em geral. Diversos autores avaliaram a qualidade microbiológica do leite cru utilizando o método de contagem em placas (NERO et al., 2009; CITADIN et al., 2009; ARCURI et al., 2006; GUERREIRO et al., 2005).

Algumas desvantagens também podem ser pontuadas: este método pode ser considerado inviável quando se deseja analisar grandes quantidades de amostras, por ser uma prática lenta, tediosa e intensiva (CASTRO, 2007; VASAVADA, 1993). É incapaz de isolar microrganismos viáveis e não cultiváveis (DAVEY & KELL, 1996), pode subestimar os resultados de contagem, uma vez que uma colônia pode se originar de mais de uma célula bacteriana (CASSOLI et al., 2010).

Com o objetivo de atender a demanda por estas análises, novas metodologias para análise do leite vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos com o intuito de aumentar a capacidade analítica e obter resultados confiáveis num menor espaço de tempo. Neste

sentido a citometria de fluxo vem sendo aplicada em análises humanas e, mais recentemente, foi adaptada e empregada em análises na área animal devido ao seu elevado rendimento analítico.

A citometria de fluxo também é uma tecnologia de análise quantitativa, só que realizada de forma rápida e prática, que envolve enumeração celular e é expressa em contagem bacteriana individual (CBI), sendo os dados de contagem enviados para um computador conectado ao Bactocount IBC[®] (equipamento totalmente automatizado que utiliza a citometria de fluxo para contagem de bactérias individuais do leite cru).

Os primeiros equipamentos surgiram durante a Segunda Guerra Mundial e tinham como objetivo, identificar a presença de bactérias e esporos no ar (armas biológicas). Após este período, a citometria de fluxo também foi usada na oncologia para diagnóstico de câncer e defeitos cromossômicos e também na hematologia. Aplicações clínicas da citometria de fluxo ainda constituem a maior parte das publicações científicas que utilizam esta técnica. Ao longo dos anos, novos equipamentos foram desenvolvidos para identificação de microrganismos em meio fluido e, mais recentemente, no leite (Guansakera et al., 2000).

Para Winson e Davey (2000), a aplicação da citometria de fluxo na microbiologia é tão antiga quanto à técnica em si, porém, historicamente, sempre foi subexplorada para este tipo de aplicação. Os mesmos autores citam que em 1947 um grupo de pesquisadores liderado por Frank T. Gucker desenvolveram um instrumento para a análise de partículas de poeira no ar e esporos de bactérias que é comumente referido como sendo o primeiro citômetro de fluxo. Estes estudiosos indicaram ainda que o princípio da técnica da CF tem grande utilização em estudos bacteriológicos. De acordo com Cassoli et al. (2005), recentemente a CF tem sido adaptada e utilizada em análises na ciência animal.

A CF envolve o estudo de células singulares e pode fornecer numerosas informações sobre estas, como contagem total, mensurações de tamanho, conteúdo do ácido nucléico, viabilidade e atividade celular e detecção de grupos específicos de bactérias ou espécies (HAMMES & EGLI, 2010).

A determinação da CBT realizada por citômetro de fluxo apresenta alto rendimento analítico, da ordem de milhares de células por segundo (MCCOY, 2002; VIVES-REGO et al., 2000) e 150 amostras/hora (BENTLEY INSTRUMENTS INC., 2009).

O citômetro é constituído de uma câmara de fluxo, fonte de laser, bancada óptica e computador. Para a realização das contagens, a amostra do leite recebe um corante específico para DNA e RNA (brometo de etídio). Para que este corante penetre nas células bacterianas, misturam-se algumas substâncias que contêm enzimas proteolíticas e detergentes para eliminação das proteínas e glóbulos de gordura, respectivamente. As enzimas ainda agem sobre as células somáticas degradando-as durante o processo, desse modo, o ácido nucléico da célula bacteriana será entremeadado com este corante.

Após a ação destas enzimas, detergentes e corante, uma alíquota da amostra segue por um capilar para a câmara de fluxo, que alinha as células uma por uma. A fonte do laser é direcionada para o ponto de passagem das partículas coradas; a luz que intercepta as partículas provoca emissão de fluorescência. Ao passar por esse feixe de luz, cada bactéria emite luminescência, que é captada pelo sistema óptico, transformando a incidência luminosa de pulsos elétricos em números, por meio de um computador conectado a estes sistemas (CASSOLI et al., 2007; BROUTIN, 2004; GUNASEKERA et al., 2000; NINANE et al., 2000).

Da mesma forma que na técnica da CPP, quando células bacterianas agregadas (pares, tríades, tétrades ou cadeias) compõem as amostras, estas podem induzir a erros de

interpretação dos resultados. Neste caso, o citômetro irá interpretá-las como um aglomerado que passa através do feixe de luz (MCCOY, 2002).

Segundo Surhen e Reichmuth (2000) não há um único método apropriado para expressar a correta qualidade bacteriológica do leite.

Ainda assim, considerando que a CF enumera todas as bactérias presentes na amostra, vivas (viáveis ou não) e mortas, enquanto que a CPP enumera apenas as bactérias que tenham condições de crescer nas condições impostas do meio (viáveis), pode-se considerar que a CF seria capaz de representar melhor a qualidade bacteriológica do leite (CASSOLI et al., 2007).

Segundo Flint et. al (2005), a desvantagem de equipamentos que utilizam a citometria de fluxo, como é o caso do Bactocount IBC[®] e de outros que são encontrados no mercado, por exemplo, é que estes não diferenciam os diversos tipos de bactéria, embora a CF tenha sido desenvolvida para este feito.

Além disso, os limites para contagem bacteriana total (CBT) propostos pela Instrução Normativa nº 51 (IN-51), de 18 de setembro de 2002, foram estabelecidos em unidade formadora de colônia por ml de leite (UFC/ml), sendo assim, os resultados do Bactocount necessitam ser convertidos de CBI para UFC. Esta equação é denominada curva de calibração ou curva de conversão.

Considerando os aspectos mencionados, torna-se necessário estabelecer uma curva de calibração para o equipamento Bactocount IBC (Bentley Instruments [®]). Para elaboração da curva de calibração foram utilizados dados de análises de leite cru refrigerado, aplicando-os em uma análise de regressão para obtenção de uma equação, e conversão dos valores de contagem individual de bactérias (CIB) para unidade formadora de colônia (UFC) como estabelecido na IN 51 (BRASIL, 2002) e determinar o grau de associação entre os métodos de citometria de fluxo (CIB) e o de referência (UFC).

Referências Bibliográficas

- ARCURI et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. **Bentley Bactocount IBC: User Handbook**. 47p, 2009.
- BIRGEL JUNIOR, E. H. **Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de bovinos das raças Holandesa, Gir e Girolando criados no Estado 996 de São Paulo**. 2006. Tese. (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária 997 e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 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.
- BRITO, J. R. F. Boas Práticas Agropecuárias na Produção de Leite. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008. p. 129-143.
- BRITO, M. A. V. P. Identificando fontes e causas de alta contagem bacteriana total do leite do tanque. **Panorama do Leite on line**, n. 40, 2010. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/especial40.html>>. Acessado em: 30 maio. 2015.
- BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O compromisso da qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. cap.26, p.317-333.
- CASSOLI, L.D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. 2005. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP.

- CASSOLI, L.D. et al. Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.1, p.44-48. 2007.
- CASSOLI, L.D. et al. The relationship of flow cytometry results with classical measures of bacterial counts in raw refrigerated milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.2, p.297-300, 2010.
- CASTRO, J.F. **Azidiol Comprimido Esterilizado Como Conservante do Leite Cru Destinado a Contagem Microbiana por Citometria de Fluxo**. 2007. 39f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2007.
- CERQUEIRA, M.M.O.P. Contagem bacteriana de leite: como está e como melhorá-la? **Revista Técnica de Bovinocultura de Leite**, Belo Horizonte, v.1, n.2, p.56 – 66, 2006.
- CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; SENA, M.J. Fatores determinantes na qualidade do leite: estudo de uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.54, p.241-245, 1999.
- CITADIN, A.S. et al. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.52-59, 2009.
- DAVEY, H. M.; KELL, D. B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. **Microbiology Reviews**, v.60, p.641–696, 1996.
- FONSECA, L. F. L.; PEREIRA, C. C.; CARVALHO, M. P. Qualidade microbiológica do leite. In: Interleite - Simpósio Internacional Sobre Produção Intensiva De Leite, 4, 1999, Caxambu. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 1999. p. 1044 36-43.
- FONSECA, L.F.L., SANTOS. M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. p. 49-58.

- FLINT, S. et. al. A rapid, two-hour method for the enumeration of total viable bacteria in samples from commercial milk powder and whey protein concentrate powder manufacturing plants. **International Dairy Journal**, v.16,p. 379–384, 2006.
- GRACINDO, A.P.A.C.; PEREIRA, G.F. **Produzindo leite de alta qualidade**. Natal: Empresa de Pesquisa Agropecuária do RN (EMPARN), 1ed., 2009. 41p;
- GUANASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D.A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1228-1232, 2000.
- GUERREIRO P.K. et al. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.216-222, 2005.
- HAMMES, F.; EGLI T. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. **Anal Bioanal Chem**, v.397, p.1083–1095, 2010.
- HARTMANN, W. **Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de listeria monocytogenes**, Curitiba, PR, 2009. Tese de Doutorado - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2009.
- HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J.L. (Eds.). **Applied Dairy Microbiology**, 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.59-76.
- HORST, J. A. Impacto da refrigeração na contagem bacteriana do leite. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite 2., 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, p.163-174, 2006.
- HORST, J. A. SILVA, M.S.G. Contagem bacteriana: indicador de qualidade do leite. **Revista Balde Branco**. v 77, p.16-17, 2005.
- HURLEY, W.L. [2009]. **Milk composition and synthesis**. Disponível em: <<http://classes.ansci.illinois.edu/ansc438/Milkcompsynth/milkcompsynthresource1077s.html>>. Acesso em : 03/12/2015.

- IDF, International IDF Standard 120:1980: **Factors influencing the bacteriological quality of raw milk**. Brussels, 4f, 1980.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SILVA, L. F. P.; SARRIÉS, G. A. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 359 – 361, 2000.
- 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.
- MAPA. **Instrução Normativa nº 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.
- MARTINS, M.E.P.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; ARRUDA, M.T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008;
- MCCOY J.P. Basic principles of flow cytometry. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.16 p.229-243, 2002.
- MEDEIROS, L.F.D.; VIEIRA, D.H. **Bioclimatologia Animal**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 126 p, 1997.
- MITTELMANN, A. et al. **Noções sobre produção de leite** / editor-técnico: Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 172p.
- MONARDES, H. Programa de pagamento de leite por qualidade em Québec, Canadá. In: Simpósio Internacional Sobre Qualidade Do Leite, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Biblioteca da UFPR, 1998, p.40-43.
- 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.
- MORAND-FEHR, P.; FEDELE, V.; DECANDIA, M. et al. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1, p. 20-34, 2007.

- NERO, L.A. et al. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.2, p.386-390, 2009.
- NINANE, V. et. al. Évaluation du Bactoscan FC pour la numeration des bactéries du lait cru. **Le Lait**, v.80, p.527-538, 2000.
- OLIVEIRA, L. F. T.; SILVA, S. P. Mudanças institucionais e produção familiar na cadeia produtiva do leite no Oeste Catarinense. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, Brasília, v. 50, n. 4, p. 705- 720, 2012.
- PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F. et al., **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 279p.
- PHILPOT, W. N. Programas de qualidade do leite no mundo. In: Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1998. p.1-8.
- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo. Ed. Milkbuzz. p.188, 2002.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645 – 651, 2006.
- ROSA, L.S.; QUEIROZ, M.I. Avaliação da qualidade do leite cru resfriado mediante aplicação de princípios do APPCC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 27, n.2, p. 422-430, 2007;
- SOUZA, G. N., BRITO, M. A. V. P., LANGE, C., FARIA, C. G., MORAES, L. C. D.; BRITO, J. R. Qualidade do leite de rebanhos bovinos localizados na Região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Janeiro/2007 a Junho/2008. In: BARBOSA, S. B. P., BATISTA, A. M. V., MONARDES, H. (Org.). **Anais... do 3 Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Recife: CCS Gráfica Editora, 2008, p. 71-81.
- SUHREN, G. e REICHMUTH, J. Interpretation of quantitative microbiological results. **Milchwissenschaft**. v.55, p.18-22, 2000.
- TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4.ed. Santa Maria: UFSM, 2010, 195p.

VASAVADA, P.C. Rapid Methods and Automation in Dairy Microbiology. **Journal Dairy Science**, v.76, p.3101-3113, 1993.

VIVES-REGO, J. et. al. Current and future applications of flow cytometry in aquatic Microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.429-448, 2000.

WINSON, M.K.; DAVEY, H.M. Flow Cytometric Analysis of Microorganisms. **Methods**, v.21, p.231-240, 2000.

CAPÍTULO 1

Qualidade microbiológica e composição química do leite cru em função da estação do ano, nos diferentes estados do Nordeste brasileiro.

Microbiological quality and chemistry composition of raw milk in function of year season, in the different Brazilian Northeast States

Resumo: O experimento foi conduzido no Laboratório de Qualidade do Leite, Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste – PROGENE, situado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição (DN). Objetivou-se avaliar a qualidade do leite através da composição química e contagem bacteriana total (CBT) preconizado pela IN 62. Foram coletadas aproximadamente 800 amostras de leite de tanques de expansão e de latões dos Estados da região Nordeste e, em seguida, acondicionadas em recipientes estéreis com capacidade para 100 mL e conservadas a 4°C (± 1) até a realização das análises, que não ultrapassou 48 horas. Após a análise no equipamento Bactocount IBC, as amostras foram encaminhadas para determinação de UFC utilizando a norma ISO 4833:2003. Para determinação da qualidade do leite foi avaliada a Contagem de Células Somáticas (CCS), Contagem Bacteriana Individual (CBI), pH, acidez titulável, proteína e gordura no leite em amostras de leite de todos os estados o Nordeste e nas diferentes estações do ano. Houve interação entres os estados avaliados e as estações do ano ($p < 0,05$) para as variáveis CCS, pH, acidez, lactose e proteína. Não havendo interação ($p > 0,05$) para a variável CBI e gordura. Os leites analisados em todos os estados do Nordeste apresentam alta carga bacteriana, sendo em sua grande maioria acima dos limites mínimos preconizado pela Instrução Normativa 62. O estado do Sergipe foi o único estado da região Nordeste, que apresentou valores médios de todo ano abaixo das recomendações feitas pela IN 62 para o ano vigente.

Palavras-chave: leite bovino, qualidade bacteriológica, instrução normativa 62

Abstract: The experiment was conducted in the Milk Quality Laboratory, Management of Dairy Herds of Northeast Program (*PROGENE*, *Portuguese initials*), localized in the Animal Science Department of the Federal Rural University of Pernambuco (*UFRPE*) and in the Federal University of Pernambuco (*UFPE*), in the Experimentation and Feed Analysis Laboratory (*LEAAL*) of the Nutrition Department (*DN*). It is aimed established a calibration curve to the Bactocount IBC equipment, that realize an individual score of bacterias (ISB) on milk, which should express the results on unit form colony (UFC), preconized by IN (*Normative Instruction*) n. 51 (MAPA, 2002). Was collected approximately 800 milk samples of expansion tanks and of milk cans too arising from four Brazilian States of Northeast Region and, following, conditioning in sterile recipients with 100 mL of volume capacity and conserved at 4°C (± 1) until the analysis proceed, made it maximum in 48 hours. After the analysis in the Bactocount IBC, the samples were conducted to UFC determination using the ISO normative n. 4833:2003. To determination of milk quality was available the Somatic Cell Count (SCC), Individual Bacteria Count (IBC), pH, titratable acid, protein and milk fat in samples of all Northeast States and in the different seasons of the year. There was interaction between the Stats analyzed and the year seasons ($p < 0.05$) to SCC, pH, acidity, lactose and protein variables. Not had interaction ($p > 0.05$) to IBC and fat milk variables. All milk samples analyzed of all Northeast States showed high bacterial load, that it mostly was above of the minimum limits preconized by the Brazilian Normative Instruction n. 62. The Sergipe State was the one of a kind that showed medium values of all year below of recommendations made by the *IN* n. 62 to actual year.

Keywords: bovine milk, bacteriological quality, normative instruction 62

1. Introdução

O termo qualidade pode ser utilizado em situações distintas, como exemplo, a forma que ocorre o processo para obtenção do produto e se este atende às exigências dos consumidores, à concepção e produção de um produto que vá ao encontro das necessidades do cliente. A qualidade está associada ao valor e à utilidade reconhecida ao produto. Outro ponto diz respeito à composição do produto, suas propriedades nutricionais, durabilidade, funcionalidade e a segurança que ele oferece (JATOBÁ, 2009).

Dentre os produtos que fazem parte da alimentação humana, o leite é um dos mais completos por possuir em sua composição elementos essenciais ao crescimento e manutenção da saúde (GRACINDO e PEREIRA, 2009). Apesar dos benefícios proporcionados pelo leite, como fornecer nutrientes e proteção imunológica (por meio dos anticorpos) ao recém-nascido, o leite é, também, um bom meio de cultura para muitos microrganismos. Em função do número e do tipo de microrganismo, alterações indesejáveis podem ser observadas na aparência, sabor ou odor do leite ou de seus derivados. Além disso, alguns microrganismos podem representar risco à saúde do consumidor. Outras alterações não são tão facilmente observadas e devem ser verificadas utilizando-se métodos físico-químicos e microbiológicos.

Falhas durante toda a cadeia produtiva do setor lácteo pode ser considerada como uma das principais razões para a perda de qualidade do leite. De acordo com Gracindo e Pereira (2009), o leite pode torna-se um veículo de transmissão de doenças, caso não haja um conjunto de ações preventivas, desde a sua produção até a chegada ao consumidor final.

O aumento com a preocupação na alimentação e principalmente com a segurança alimentar por parte dos consumidores, tornou o mercado mais exigente em relação a qualidade de todos alimentos, inclusive os produtos lácteos, que sejam seguros, nutritivos e

tenham sabor de um produto fresco (MITTELMANN et al, 2009). De acordo com Martins et al. (2004), a qualidade do leite sempre foi o objetivo primordial do setor lácteo. Contudo, para que esse objetivo seja alcançado, a união e o esforço conjunto de todos os segmentos da indústria lactea, bem como do governo, torna-se primordial para garantir um leite de boa qualidade e oferecer um produto competitivo no mercado (Godkin, 2000).

Medidas de profilaxia, manejo nutricional, bem estar animal, qualificação da mão de obra, higiene dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha, bem como o transporte adequado até a indústria, são considerados fatores essenciais na qualidade do produto final. Neste contexto, medidas de controle de qualidade do leite torna-se uma ferramenta para valorização dos produtos comercializados, a fim de permitir a sua diferenciação e escolha por parte do consumidor. Esses atributos podem ser medidos pelo valor sensorial (sabor, aparência, odor, textura), nutricional (composição) e grau de segurança (qualidade microbiológica, presença de resíduos etc) (ALVES et al., 2008).

Um dos requisitos para atender a qualidade do leite é a baixa carga bacteriana. O controle da carga bacteriana no leite inicia-se com medidas profiláticas, como a saúde do úbere da vaca, sendo este controle mais facilmente implementado quando se conhece a fonte de contaminação.

Existem várias características que podem influenciar na qualidade do leite. Sendo que algumas delas pode ser detectadas pela próprio consumidor, desta forma, as características organolépticas como: sabor, aroma e cor, pode ser identificadas através do paladar, olfato e visão. Quando alteradas, as características organolépticas podem ser facilmente detectadas pelos consumidores. Outras características como acidez, pH, densidade, ponto de congelamento, calor específico, viscosidade e condutividade elétrica tem sua importância mais atrelada ao processo de produção de derivados do leite e por isso tem especial atenção nos laticínios (SILVA, 1997).

De acordo com Teixeira, (2009) no setor de alimentos, a manutenção das características sensoriais do produto contribui para a lealdade do consumidor em um mercado cada vez mais competitivo, sendo parte inerente ao plano de controle de qualidade de uma indústria. Para Ponce (2009), as características físico-químicas do leite e suas inter-relações constituem uma valiosa ferramenta para avaliar o desempenho produtivo dos rebanhos leiteiros, informar sobre o estado fisiológico da lactação e para diagnosticar distúrbios de metabolismo e seus possíveis impactos sobre o processamento industrial e a qualidade final dos produtos lácteos.

Atualmente, o consumidor tornou-se mais exigente e muitos são os requisitos que as indústrias precisam atender para comercializar os seus produtos nos mercados interno e externo. Nesse contexto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou no Diário Oficial da União de 18 de setembro de 2002, a Instrução Normativa nº. 51 (IN 51), que regulamenta o padrão de identidade e qualidade do leite, incluindo manejo de ordenha, resfriamento na propriedade, transporte em grande quantidade, parâmetros físico-químicos, microbiológicos e contagem de células somáticas, o que aumentou o nível de exigência nas propriedades e nas indústrias da área. O objetivo da IN nº 51 foi fixar os requisitos mínimos que devem ser observados na qualidade do leite cru, do leite cru refrigerado e do leite pasteurizado, enquanto perdurar a produção desse tipo de leite destinado ao comércio nacional (LUZ et al., 2011).

Com o objetivo de monitorar e analisar o leite provenientes das propriedades produtoras foi criada uma rede de laboratórios (RBQL), seguindo os parâmetros internacionais de avaliação da qualidade do leite (BRASIL, 2002). Logo após a implementação do PNQL, o MAPA publicou em 2002 a Instrução Normativa 51 (IN51), que reuni normas de produção, identidade e qualidade de leites tipo A, B e C, pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a

granel (BRASIL, 2002). A cadeia leiteira brasileira tem iniciado um processo sério de monitoramento da qualidade do leite *in natura*, que deve servir não só para observar e qualificar a matéria-prima, mas também para melhorar os processos produtivos das propriedades leiteiras.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica dos leites produzidos nos Estados do Nordeste brasileiro e nas diferentes estações do ano.

2. Material e Métodos

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no laboratório PROGENE do Departamento de Zootecnia (DZ) e na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no Laboratório de Microbiologia do Instituto Tecnológico de Pernambuco-IPA. O período de coleta das amostras ocorreu de novembro/2011 a agosto/2013, para que a amostragem fosse representativa de todas as estações do ano.

Foram utilizadas em média 800 amostras de leite bovino (100 ml) de todos os estados do Nordeste, oriundas de tanques de expansão e latões, provenientes de indústrias de laticínios, cooperativas e fazendas leiteiras cadastradas no PROGENE. A coleta e transporte das amostras eram responsabilidade do PROGENE, seguindo o Procedimento Operacional Padrão desenvolvido pelo Ministério de Agricultura, Abastecimento-MAPA.

Após a homogeneização do leite cru nos tanques ou latões, as amostras foram depositadas em recipientes estéreis com capacidade para 200 mL e acondicionadas em caixa térmica com gelo reciclável permanecendo sob refrigeração a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ durante todo o trajeto até o laboratório. No PROGENE, as amostras eram divididas em quatro parcelas, uma para análise utilizando o Bactocount IBC[®], outra foi enviada ao ITEP, onde as

bactérias eram enumeradas pelo método de referência, a terceira era utilizada para análise da composição química e a quarta para determinação do pH e da acidez titulável.

O tempo transcorrido entre a coleta e a chegada ao laboratório não ultrapassou 24 horas. Na recepção do laboratório, a temperatura das amostras foi verificada, e estas foram em seguida armazenadas sob refrigeração a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, até o momento da análise. O tempo entre a coleta do leite e a análise laboratorial não ultrapassou 72 horas.

Quando chegavam no PROGENE, as amostras eram avaliadas quanto à temperatura e às informações de local de coleta, nome da propriedade, município onde se encontrava a fazenda e data da coleta. Na falta de qualquer informação e/ou se a temperatura de conservação da amostra no transporte fosse superior a 5°C , a amostra seria descartada. Após a análise da composição química, da acidez titulável e da contagem bacteriana total, as amostras sofriam outra seleção, ou seja, se a acidez estivesse fora de 0,14 a 0,18, se os teores de gordura e proteína fossem menores que 3,0% e 2,9%, respectivamente, e a contagem bacteriana fosse superior a 10.000.000 CBT/mL, as amostras seriam descartadas, como pode-se observar na Tabela 1.

Tabela 1 Amostras de acordo com o nível de contagem bacteriana e o percentual a que cada uma corresponde em uma análise geral dos dados.

	Amostras	Válidas				
CBI	859	764	<10.000.000	<600.000	<300.000	<100.000
			764	361	242	97
Acidez titulável	864	726	<14,0	>18,0		
			77	61		
Gordura	853	769				
Proteína	853	707				

As amostras eram homogeneizadas manualmente e alinhadas no rack da esteira do equipamento, em seguida, cada amostra passou por agitação automática e aquecimento (50°C). Na sequência, uma alíquota de leite foi succionada pelo equipamento passando por dois períodos de homogeneização (sonificação). Por conseguinte, após o período de 10 minutos para que a solução de incubação destruísse os interferentes da amostra e conseqüentemente ocorresse a adesão do corante ao DNA bacteriano. Então, as células coradas eram injetadas em um capilar, onde cada partícula corada emitia fluorescência, sendo captadas pelos tubos fotônicos do sistema óptico, sendo posteriormente, transformados em pulsos elétricos pelo sistema eletrônico. Estes pulsos por sua vez, eram convertidos em sinais, mediante transformação do sistema analógico para o digital, possibilitando a avaliação dos resultados em CBI automaticamente na tela do computador (BARRIENTOS et al., 2000; JATOBÁ, 2009; GUNASEKERA et al., 2000).

As análises realizadas por este método seguiram a norma ISO 4833:2003. Foram pipetados $25 \pm 0,2$ ml de cada amostra, em seguida foi adicionado 225 ml de solução salina peptonada 0,1%, com posterior homogeneização durante 60 segundos. Sendo esta a diluição 10^{-1} , as demais diluições necessárias foram efetuadas a partir desta, com base nos resultados expressos em CBI após análise pelo Bactocount IBC[®].

Para inoculação foi semeado 1 ml de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis (em duplicata), sendo adicionado de 12 a 15 ml de PCA fundido e mantido em banho-maria entre 46 e 48°C. Realizou-se a adequada homogeneização do ágar com o inóculo, seguindo-se da sua solidificação em uma superfície plana. Na sequência, as placas invertidas eram incubadas aerobicamente a 30°C por 72h. Foram selecionadas as placas que contenham entre 25 e 250 colônias, onde foram contadas todas as colônias presentes. A partir dos dados obtidos, foi calculado o número de microrganismos presentes na amostra, sendo este resultado expresso em UFC/ml.

Os dados de contagem de ambos os métodos passaram por transformação logarítmica (Log_{10}) sendo utilizados os procedimentos PROC CORR e PROC REG (SAS, 2002), para as análises de correlação e regressão linear.

3. Resultados e Discussão

Na Tabela 2, apresentam-se a distribuição das amostras de acordo com o nível de contagem de bacteriana individual (CBI) dentro de cada Estado de origem. Os padrões utilizados para a contagem bacteriana individual foi de 10.000.000 (CBI/mL) (garantia do equipamento) e 600.000; 300.000 e 100.000 (CBI/mL) que são os limites estabelecidos pela IN 62.

Tabela 2 Distribuição das amostras de acordo com a contagem bacteriana total

	Total	<10.000.000	<600.000	<300.000	<100.000
Alagoas	52	50	28	23	14
Bahia	76	69	35	16	4
Ceará	163	119	27	16	2
Paraíba	171	159	74	54	22
Pernambuco	184	159	73	49	22
Piauí	63	56	30	21	14
Rio Grande do Norte	91	102	49	35	10
Sergipe	58	51	42	26	7
Porcentagem de amostras validadas					
		<10.000.000	<600.000	<300.000	<100.000
Alagoas	100	96,15	53,85	44,23	26,92
Bahia	100	90,79	46,05	21,05	5,26
Ceará	100	73,01	16,56	9,82	1,23
Paraíba	100	92,98	43,27	31,58	12,87
Pernambuco	100	86,41	39,67	26,63	11,96
Piauí	100	88,89	47,62	33,33	22,22
Rio Grande do Norte	100	89,22	48,04	34,31	9,80
Sergipe	100	87,93	72,41	44,83	12,07

As amostras de leite dos estados analisados apresentaram baixa qualidade quando submetidas aos valores preconizados pela IN 62 (600.000; 300.000 e 100.000 CBI/mL). O estado do Sergipe apresentou melhores valores quando comparado aos demais estados em relação às metas estabelecidas pela IN 62, sendo inferior aos estados de Alagoas e Piauí apenas na classe <100.000.

O estado do Ceará apresentou o leite de menor qualidade em relação aos demais estados, podendo ser constatado com a baixa proporção de leite dentro dos padrões preconizados pela IN 62.

Apesar do leite ser um alimento com excelente potencial para crescimento e multiplicação de agentes patogênicos, devido ao seu alto valor biológico, o leite normal ao ser secretado dos alvéolos da glândula mamária, é considerado estéril. Durante todo o trajeto até sua ejeção (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). Entretanto, o uso inadequado ou a não utilização de medidas sanitárias, desde a coleta do leite até o seu processamento, podem contribuir para aumentos significativos na contagem bacteriana total.

A contagem bacteriana total deve ser utilizada como uma ferramenta importante para auxiliar no controle da qualidade do leite, já que fornece um perfil geral de todo o processo de ordenha, da saúde do úbere e do armazenamento e da coleta do leite (FONSECA et al., 1999). Sendo que a carga bacteriana inicial é influenciada pela limpeza e desinfecção da pele dos tetos e do úbere, da limpeza dos utensílios e equipamentos de ordenha e do tanque de resfriamento e da qualidade da água usada nesses procedimentos. O desafio é, portanto, manter o leite com baixa CBI durante a ordenha, o resfriamento e o transporte, até o seu processamento na indústria.

A refrigeração e transporte tornam-se práticas importantes para prolongar o tempo de armazenamento do leite e de seus derivados, pois o leite é perecível e necessita de procedimentos adequados para sua conservação. No presente estudo, os estados da Bahia e Ceará apresentaram menor proporção de leite com CBI abaixo de 100.000 UFC/mL, sendo a proporção de 5,26 e 1,23 % (respectivamente) do total de leite analisado nos estados. Neste contexto, é possível que o leite procedente da Bahia e Ceará, devido a distância do local de coleta até a análise, tenha sido prejudicado na conservação da qualidade do leite analisado. Além disso, nos referidos estados, parte das amostras coletadas eram encaminhadas pelo próprio produtor, o que pode ter resultado em falha na conservação e transporte destas amostras, fato esse observado no momento do recebimento deste material a ser analisado.

Em trabalho conduzido por Kumaresan et al., (2007) ao baixarem a temperatura de estocagem do leite de 7°C para 2°C, houve uma redução significativa no crescimento de *psicrófilos* e nas atividades proteolítica e lipolítica. Deve-se salientar que a refrigeração do leite não melhora sua qualidade, apenas evita a proliferação de alguns tipos de microrganismo. Medidas simples de profilaxia também se tornam ferramenta importante na tentativa de diminuir a carga bacteriana presente no leite. Guerreiro et al., (2005) após a adoção das técnicas profiláticas, verificaram-se reduções significativas na contagem total de bactérias *psicrófilas*, comprovando a importância de práticas de higiene e limpeza sobre a qualidade microbiológica do leite.

Na tabela 3 estão expressos os valores a distribuição das amostras de acordo com o nível de contagem de bacteriana individual (CBI) dentro de cada estação do ano. Pode-se observar variações nas diferentes estações do ano sobre a concentração bacterianas dos leites analisados. A influência da época do ano sobre a qualidade do leite resulta da combinação de efeitos relacionados com os fatores climáticos, a alimentação e até mesmo

a fase de lactação dos animais. Os fatores climáticos, variáveis durante as épocas do ano, sem dúvida são os principais agentes causadores das alterações na síntese do leite.

Tabela 3 distribuição das amostras de acordo com o nível de contagem de bacteriana individual (CBI) dentro de cada estação do ano.

	Total	<10.000.000	<600.000	<300.000	<100.000
Verão	242	205	81	61	27
Outono	299	221	94	62	25
Inverno	209	147	82	52	24
Primavera	144	129	76	51	17
Porcentagem de amostras validadas					
	100%	<10.000.000	<600.000	<300.000	<100.000
Verão	242	84,71	33,47	25,21	11,16
Outono	299	73,91	31,44	20,74	8,36
Inverno	209	70,33	39,23	24,88	11,48
Primavera	144	89,58	52,78	35,42	11,81

Observa-se que os leites coletados nas estações de verão e primavera apresentaram proporção maior de amostras (84,71 e 89,54%) aptas à análise (até 10.000.000), quando comparadas as estações de outono e inverno. Resultados semelhantes foram descritos por Bueno et al. (2008), que dividiram as variáveis climáticas por período de chuvas. O período de chuvas favorece a contaminação ambiental, o acúmulo de lama nas instalações e à maior ocorrência de tetos sujos no momento da ordenha. Além disso, a temperatura ambiente afeta o crescimento bacteriano e, portanto, pode acarretar a contaminação do leite (BUENO et al., 2008).

Parte da região Nordeste é caracterizada por apresentar alta umidade nas estações de outono e inverno, associado a temperatura relativamente alta que é característica da região. Esta combinação de fatores climáticos pode ter proporcionado maior carga bacteriana nas amostras de leites coletadas nestas estações.

A estação de primavera apresentou melhores proporções de amostras validadas considerando todos os limites de CBI (10.000.000; 600.000; 300.000 e 100.000 CBI/mL) em comparação as demais estações. Fato que pode ser atribuído a essa estação ser um período de transição entre as estações quente e úmida e quente e seca, o que pode proporcionar um período de clima mais agradável para os animais. É importante salientar que em períodos de altas temperaturas, os animais são submetidos a situação de estresse, o que pode provocar queda na imunidade e por conseguinte a incidência de infecções e o número de patógenos aos quais serão expostos (PAULA et al., 2004; LACERDA; MOTA; SENA, 2010).

Na figura 1 estão expressos os valores médios da Contagem de Células Somáticas (células/mL) em todos os estados analisado e nas quatro estações do ano (Verão; Outono; Inverno e Primavera). Houve interação ($p < 0,05$) para o variável Estado e Estação do Ano.

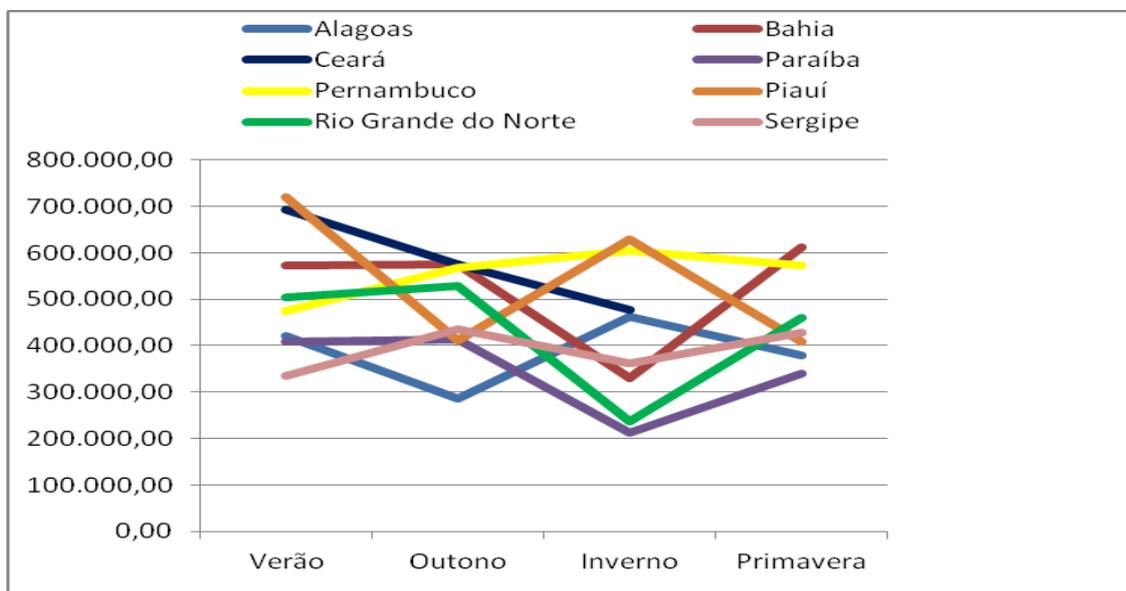


Figura 1 Valores médios da Contagem de Células Somáticas (células/mL) coletadas em estados do Nordeste nas diferentes estações do ano

As células somáticas do leite são consideradas células de defesa do organismo (leucócitos) que migram do sangue para o interior da glândula mamária. E tem como objetivo o combate aos agentes causadores da mastite. Sendo assim, este parâmetro funciona como indicador da saúde da glândula mamária, da produção de leite do rebanho, da composição e da qualidade do leite. De acordo com Hartmann et al., (2009) elevados valores da contagem de células somáticas acarretaram maior influência negativa sobre a qualidade e quantidade do leite.

O aumento na contagem de células somáticas pode implicar em diversas mudanças na composição do leite, uma vez que ocorrem alterações na permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula e, por conseguinte, reduz a síntese e secreção dos componentes do leite na glândula mamária (proteína, gordura e lactose). A ação direta dos patógenos ou de enzimas sobre os componentes secretados no interior da glândula são os responsáveis por essas alterações (MACHADO et al., 2000).

A maioria dos estados avaliados apresentam amostras de leite com a CCS dentro dos limites estabelecidos pela IN 62 para este ano (até 600.000 células/mL). Os estados de Alagoas, Paraíba e Sergipe apresentaram as médias de CCS, ao longo de todo ano, inferiores a meta final (Julho de 2017) estabelecida pela IN 62 de 400.000 células/mL, sendo esses valores de 387.479; 343.622; 390.324 células/mL respectivamente. Foram observadas alterações na concentração de CCS dentro das estações do ano, fato esse que pode ser atribuído a condição nutricional dos animais nas diferentes, manejo aplicado ou efeito do clima nas diferentes estações.

No estado de Pernambuco houve aumento do número de CCS na estação do inverno. É importante salientar que esta estação coincide com o período de chuva e consequentemente de umidade. Avaliando o efeito da estação do sobre a qualidade de leite, Rosa (2012) verificou o maior percentual de amostras de leite com contagem de células

somáticas acima de 750 mil células/mL no outono. Isto se deve ao regime de chuvas desta estação do ano na região estudada e suas consequências, que conduzem ao aumento de sujidades corporais e a dificuldade de manter a limpeza das instalações.

Na figura 2 e 3 estão expressos os valores médios de Contagem Bacteriana Individual CBI (CBI/mL) em todos os estados analisado e nas quatro estações do ano respectivamente (Verão; Outono; Inverno e Primavera). Não houve interação ($p>0,05$) para o variável Estado e Estação do Ano.

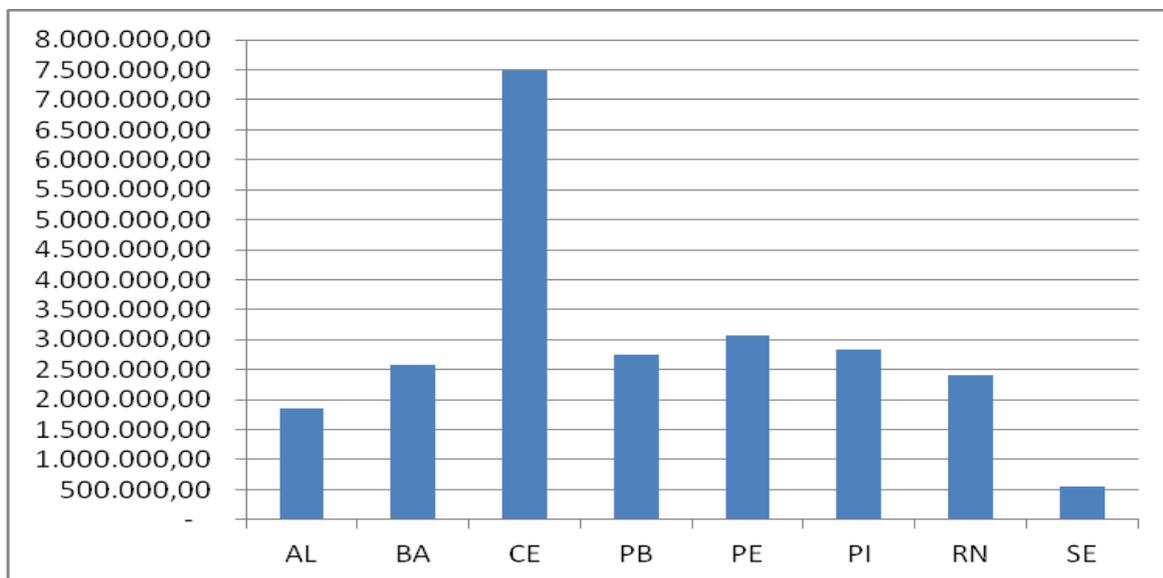


Figura 2 Valores médios da Contagem Bacteriana Individual (CBI/mL) coletadas nos estados do Nordeste

As amostras de leite dos estados analisados apresentaram alta concentração de contagem bacteriana individual, apresentando valores bastante elevados em relação ao preconizado IN 62 (600.000; 300.000 e 100.000 CBI/mL). O estado do Sergipe foi o único estado da região Nordeste, que apresentou valores médios de todo ano abaixo das recomendações feita pela IN 62 para o ano vigente. Estes valores foram na ordem de 559.883 CBI/mL sendo a recomendação de até 600.00 CBI/mL.

O estado do Ceará apresentou o leite de menor qualidade em relação aos demais estados, podendo ser constatado com a baixa proporção de leite dentro dos padrões preconizados pela IN 62. Sua média anual foi 7.495.305 CBI/mL, valor esse superior em mais de 2 vezes a média do estado com a segunda maior média, o Estado de Pernambuco (2.826.589 CBI/mL). Os demais estados também apresentaram valores bem acima das recomendações mínimas em vigor. De acordo com Rosa e Queiroz, (2007) a existência de falhas durante os processos de obtenção, manipulação e conservação vem sendo considerada como uma das principais razões para a perda de qualidade do leite.

A produção e a qualidade do leite podem ser influenciadas por uma série de fatores, que podem ser de ordem fisiológica e/ou ambiental. Os fatores fisiológicos podem ser hereditários que diz respeito à composição genética dos animais e não hereditários que incluem o estágio da lactação, a idade, ordem da lactação, tamanho, o nível nutricional, entre outros fatores. Quanto aos fatores ambientais, podem ser citados o ano, a estação de parição ou mês de parição e a frequência de ordenhas. Além dos fatores citados anteriormente, o ambiente e o sistema de criação e principalmente ao manejo alimentar exercem influência direta sobre a síntese do leite e seu componentes.

A estação do ano e conseqüentemente o clima podem provocar alterações na composição e qualidade do leite. Em zootecnia se diz que o ambiente, notadamente o clima, é um sobremodo regulador da produção animal (MEDEIROS e VIEIRA, 1997). Deste modo, em condições tropicais, o mês ou estação parição também são reconhecidos como importantes causas de variação na produção de leite (COLDEBELLA et al., 2003).

Além disso, a contagem bacteriana total está mais relacionada com as falhas nas medidas sanitárias desde a retirada do leite, sua conservação, transporte e processamento. Nero et al. (2005) relataram alta frequência de amostras de leite *in natura* com elevados níveis de contaminação bacterianas. Por outro lado Arcuri et al. (2006) verificaram que a

adoção de procedimentos de limpeza completa dos equipamentos de ordenha e estocagem do leite contribuiu para a redução na contagem de bacteriana no leite, enquanto que Pinto et al. (2006) ressaltaram que a manutenção do leite cru refrigerado por períodos prolongados na fonte de produção ou na indústria pode comprometer a qualidade do leite.

Em relação às estações do ano, pode-se observar maior concentração de bactérias nas amostras coletadas no verão em relação ao outono, inverno e primavera. O estresse de altas temperatura e a umidade podem aumentar a suscetibilidade a infecções, bem como aumentar o número de patógenos aos quais os animais estão expostos.

Altas temperaturas relatadas durante o verão da região Nordeste podem ter proporcionado um ambiente ideal para a proliferação de certos microrganismos. Os grupos de microrganismos contaminantes do leite podem depender do tipo de manejo aplicado e da conservação do leite após a ordenha. De acordo com Brito e Brito, (1998), esses grupos podem ser divididos: nos psicrotóxicos, que crescem entre 0 a 30°C; nos mesófilos que crescem entre 20 e 45°C; nos termófilos que crescem entre 45 e 65°C e nos termodúricos, que sobrevivem à pasteurização.

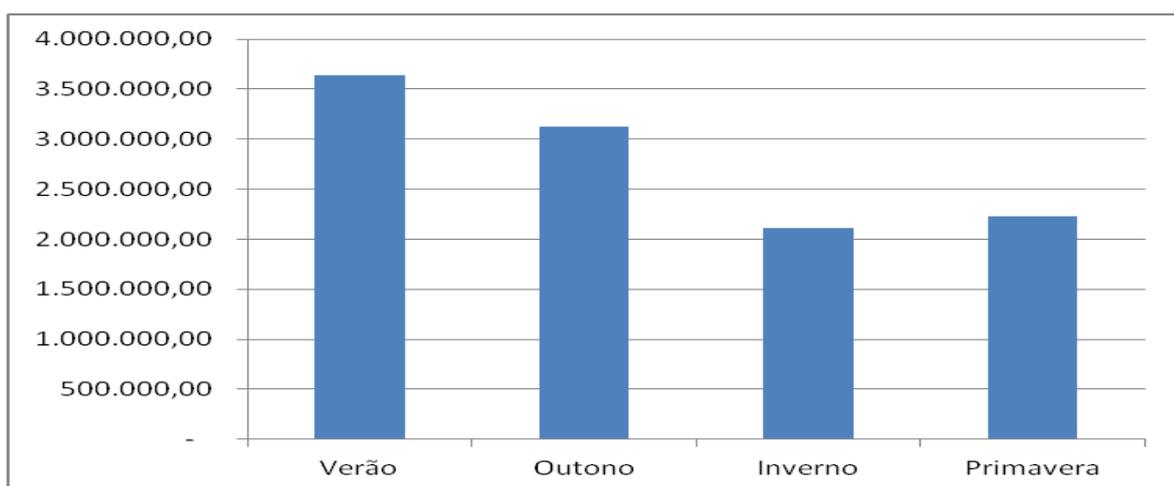


Figura 3 Valores médios da Contagem Bacteriana Individual (CBI/mL) coletadas nas diferentes estações do ano

O resfriamento imediatamente após a ordenha é determinante para a obtenção de leite com baixa contagem bacteriana total, pois a falta de refrigeração favorecerá o crescimento de microrganismos *mesofílicos*, enquanto que sob refrigeração adequada poderá ocorrer o desenvolvimento de microrganismos *psicrotróficos*. Esse grupo de microrganismos é formado por diversos gêneros bacterianos, com predominância do gênero *Pseudomonas*, que em sua maioria produz proteases e/ou lipases a temperaturas de refrigeração (ARCURI et al., 2008).

Silveira et al. (2000) relataram que a carga microbiana presente no leite *in natura* tem influência das estações do ano, das práticas de produção e manuseio na propriedade rural, localização geográfica, temperatura de permanência do leite e distância do transporte entre a propriedade rural e o local de beneficiamento.

Os dados referentes a composição química do leite estão expressos nas figuras 4, 5, 6, 7 e 8. Houve interação entre os estados avaliados e as estações do ano ($p < 0,05$) para as variáveis pH, acidez, lactose e proteína. Não havendo interação ($p > 0,05$) para a variável gordura.

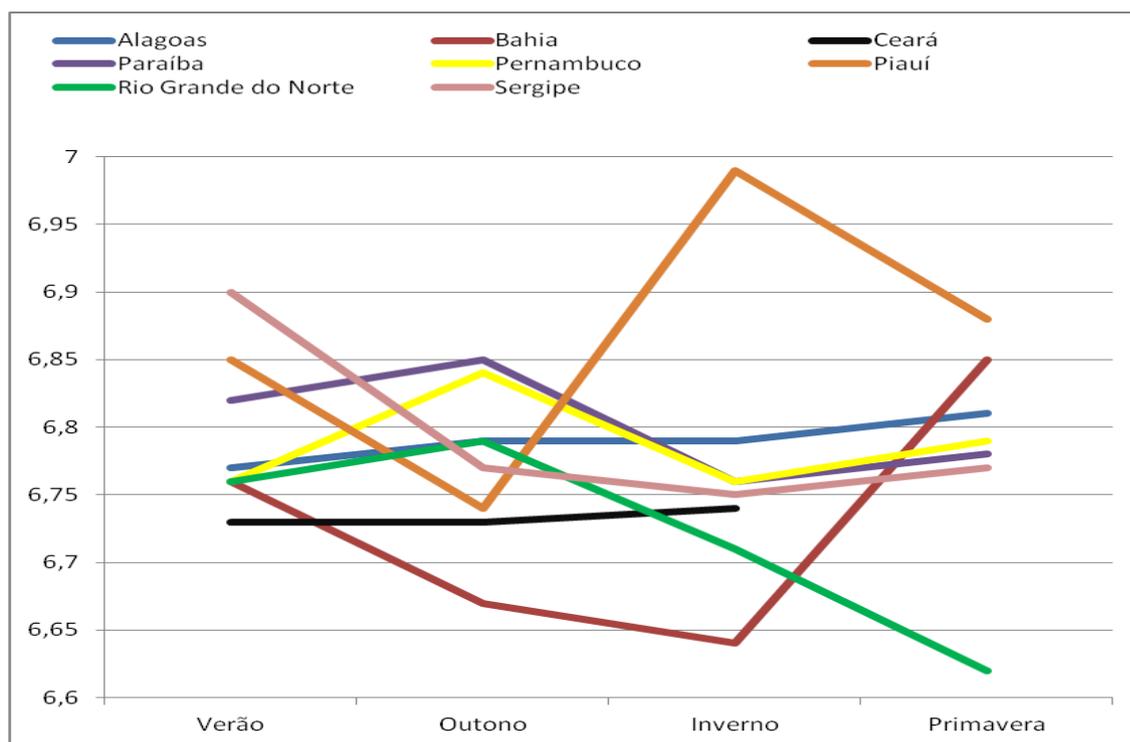


Figura 4 Valores médios pH em amostras de leite coletadas nos estados do Nordeste e nas diferentes estações do ano

Dentre as análises que podem identificar alterações na composição e nas propriedades físico-químicas do leite, o pH pode ser considerado um parâmetro importante, principalmente como ferramenta para diagnosticar a qualidade sanitária do leite. O pH do leite recém ordenhado de bovinos pode variar entre 6,4 a 6,8, sendo que em casos graves de mastite, o pH pode chegar a 7,5 e na presença de colostro, pode cair a 6,0.

Neste sentido, as amostras de leite coletadas no estado do Piauí apresentou elevação do pH nas estações consideradas mais críticas na incidência de mastites, entre outono e inverno. Como já dito anteriormente, a alta umidade pode provocar excesso de sujidades nas tetas dos animais podendo resultar em mastite. Neste mesmo período do ano, foi detectado elevada concentração de CCS (figura 1) com valores acima de 600.000 células/mL, o que pode ter provocado aumento do pH do leite resultando a valores próximos aos 6,9.

Alterações na estrutura e fisiologia da glândula mamária podem ser responsáveis pelas alterações na composição e nas propriedades físico-químicas do leite. Sendo assim, a mastite pode ser considerada um agente responsável pela alteração do pH do leite. A destruição do epitélio secretor, as alterações na permeabilidade vascular e o impedimento do transporte dos íons nas células danificadas observadas durante os processos inflamatórios na glândula mamária são responsáveis pelo aumento de íons de bicarbonato, determinando o aumento do pH do leite (BIRGEL JUNIOR, 2006).

Para as amostras de leite dos demais estados analisados, houve pequenas alterações de pH ao longo das estações. Entretanto, todas as amostras encontravam-se na faixa considerada como leite normal, com o pH variando de 6,6 a 6,8 de acordo com Brito (2012).

Na figura 5 estão expressos os valores de acidez das amostras de leite coletadas nas diferentes estações do ano e em todos os estados do Nordeste.

A acidez do leite pode ser considerada um importante fator para a avaliação de seu estado higiênico-sanitário e sua forma de conservação. Observa-se comportamento com certa semelhança em relação a acidez do leite ao longo do ano para todos os estados. Onde na estação do outono ocorre o pico de acidez no leite com posterior queda durante a chegada do inverno.

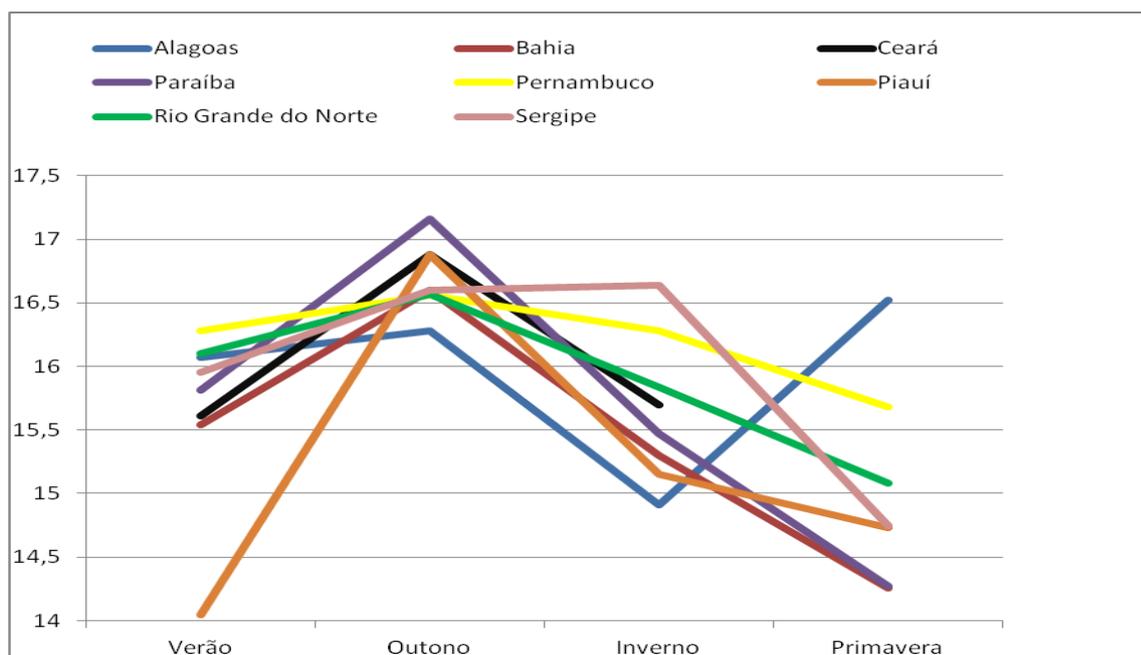


Figura 5 Valores médios acidez titulável em amostras de leite coletadas nos estados do Nordeste e nas diferentes estações do ano

Para Pancotto, (2011) fatores ligados a manipulação do leite, como temperatura e a higiene empregada influenciam diretamente neste aspecto, pois em condições de manejos inadequados, os microrganismos multiplicam-se e suas enzimas quebram a lactose, formando o ácido lático e compostos secundários. A conversão de lactose em ácido lactato (considerado um ácido forte), através da ação de enzimas microbianas, é responsável pela redução do pH e conseqüentemente ocorre a elevação da acidez no leite (chamada de acidez desenvolvida do leite) (SILVA, 1997).

Em animais que apresentam mastite, mais comum na estação úmida, a composição do leite pode ser alterada, com tendência ao aumento dos componentes provenientes do sangue. O conteúdo de sódio no sangue é maior do que o de potássio. O pH do sangue é de 7,3 a 7,5 e o teor de cálcio é menor do que o do leite. Desta forma, o leite de animais com mastite possui maior teor de sódio e menores teores de cálcio, fósforo e potássio; o pH tende a ficar alcalino e, portanto, com menor acidez titulável.

Para os valores de proteínas observa-se comportamento semelhante ao longo do ano, sendo que nas estações de primavera e verão encontram-se os menores valores da maioria dos estados (Figura 6). O Nordeste brasileiro caracteriza-se por possuir clima quente e seco, com duas estações bem definidas: seca e a úmida. Desta forma durante um período do ano a irregularidade da precipitação pluviométrica afeta de forma negativa a disponibilidade e qualidade de forragens e conseqüentemente o aporte de nutrientes para síntese de componentes da glândula mamária.

Rosa (2012) avaliando o efeito da estação do sobre a produção de leite, encontrou menor teor de proteína nas estações da primavera e verão em relação ao outono e inverno. Para o autor a maior disponibilidade e qualidade das forrageiras nesta época seria o fator primordial para estas alterações.

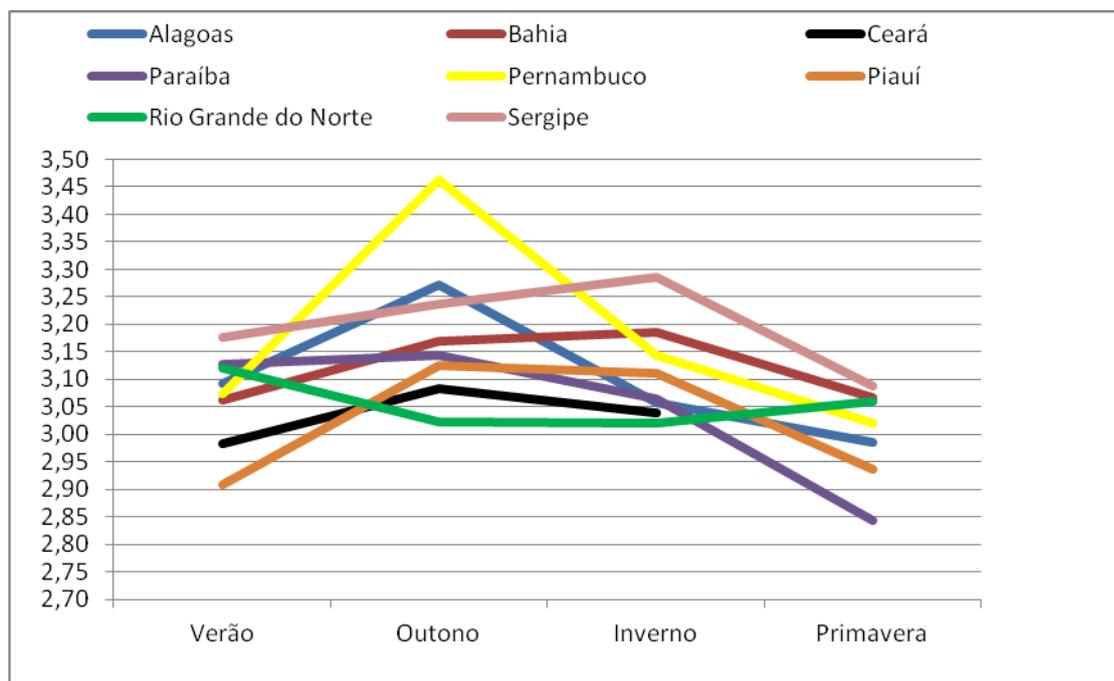


Figura 6 Valores médios de proteína em amostras de leite coletadas nos estados do Nordeste e nas diferentes estações do ano

Levando em consideração a baixa qualidade de grande parte dos leites analisados, devido a alta concentração de CCS e CBT, o aumento do teor de proteína observados nos períodos de outono e inverno, podem não estar apenas relacionado a maior disponibilidade e qualidade do alimento ofertado ao animal. A maior concentração de CCS, e por conseguinte de mastite, observada neste mesmo período pode aumentar a concentração de proteína no leite. Em leite mastítico ocorre aumento na concentração de proteínas de origem sanguínea, devido ao aumento da permeabilidade vascular, resultando em alterações na concentração da proteína total do leite.

Entretanto, esse aumento da concentração de proteína que pode ser observado, deve-se ao aporte de proteínas plasmáticas para a glândula a fim de combater a infecção, portanto, não deve ser considerada favorável a qualidade do leite (PEREIRA et al., 1999). Santos & Fonseca (2006) citam que ocorre também a diminuição na caseína, pela sua degradação por proteases bacterianas e leucocitárias e pela diminuição de sua síntese, o que constitui efeito indesejável.

Na figura 7 e 8 estão expressos os valores de gordura das amostras de leite coletadas em todos os estados do Nordeste e nas diferentes estações do ano respectivamente.

A gordura do leite, é um dos componentes mais importantes da qualidade nutricional do leite (CHILLIARD et al., 2003), uma vez que, este nutriente apresenta importante impacto na indústria de lácteos, onde contribui para o rendimento dos produtos e influencia nas características sensoriais, como odor e sabor. O leite proveniente do estado de Sergipe apresentou maior valor em relação aos demais, com média de 3,78% sendo o leite coletado no estado do Piauí com a menor média de gordura (3,36%). É importante salientar, que o estado de Sergipe apresentou amostras de leite com melhor qualidade em

relação aos demais, já o Piauí apresentou alta concentração de CCS nas amostras de leite provenientes do mesmo.

Dados encontrados na literatura sobre os efeitos da mastite e concentração de gordura são conflitantes. Santos (2002) afirma que infecções no úbere causam redução no teor de gordura do leite, pois interferem na síntese de triclicerídeos na glândula mamária. Todavia, Pereira et al. (1999) ressaltam que as mudanças nos níveis de gordura causadas pela mastite são pequenas e que são relevantes somente em casos de CCS muito elevadas.

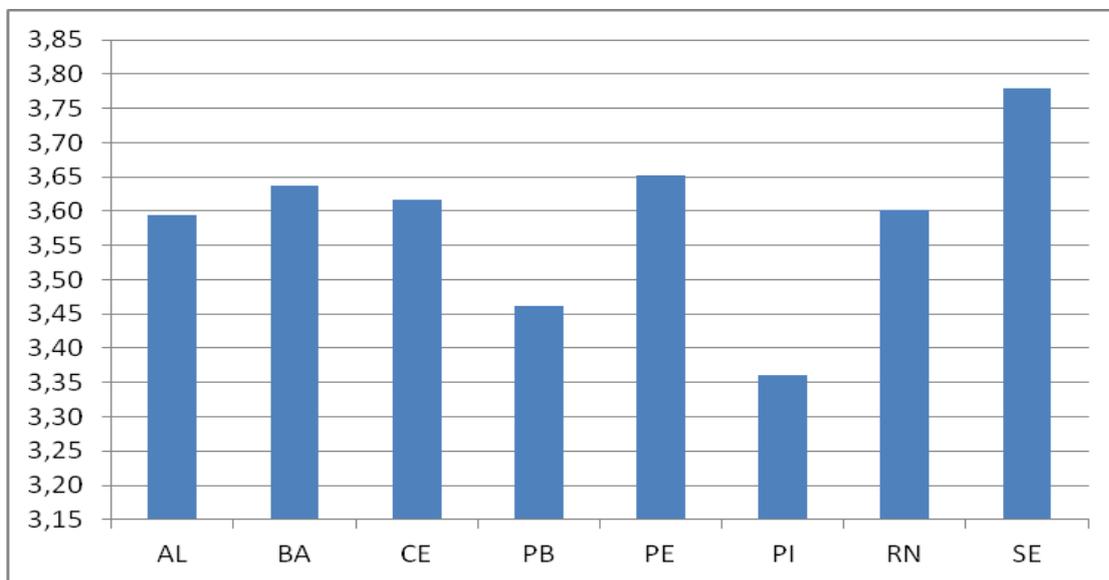


Figura 7 Valores médios de gordura em amostras de leite coletadas nos estados do Nordeste

Ao longo das estações ocorreram alterações no teor de gordura dos leite analisados (figura 8). As estações de outono e inverno proporcionaram valores médios de gordura no leite superiores aos encontrados nas amostras de leite coletadas durante a primavera e verão. Assim como para a concentração de proteína, a maior disponibilidade e qualidade das forrageiras nas estações de outono e inverno podem ter proporcionado este aumento no teor de gordura no leite.

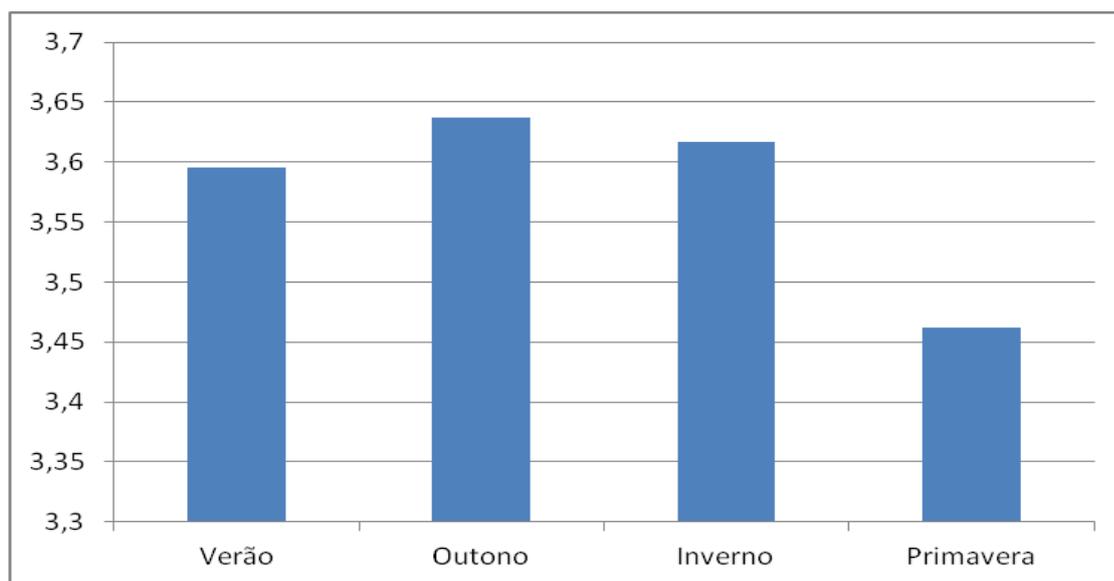


Figura 8 Valores médios de gordura em amostras de leite coletadas nas diferentes estações do ano

Além disso, o fator clima pode exercer influência sobre a produção e composição do leite. Nas estações mais quentes (primavera e verão) as elevadas temperaturas podem acarretar em alterações comportamentais e fisiológicas. Essas alterações compreendem no aumento dos parâmetros fisiológicos, diminuição da ingestão de alimentos e consequentemente, redução na produção de leite e de seus componentes (PIRES e CAMPOS, 2004).

Apesar desta variação, os valores médios encontrados em ambas as estações, neste trabalho, estão dentro dos limites estabelecidos na Instrução Normativa nº 51 (IN51), que é no mínimo 3,0%, para leite cru refrigerado Tipo A (MAPA, 2002).

4. Conclusão

Os leites analisados nos estados do Nordeste apresentam alta carga bacteriana, sendo em sua grande maioria acima dos limites mínimos preconizado pela Instrução

Normativa 62. Fatores fisiológicos e ambientais podem exercer influencia direta sobre qualidade do leite.

5. Referências Bibliográficas

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóxicas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, 2008.

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

BIRGEL JUNIOR, E. H. **Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de bovinos das raças Holandesa, Gir e Girolando criados no Estado 996 de São Paulo**. 2006. Tese. (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária 997 e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BRASIL. Instrução normativa n.62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF: **Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal**, 2003, 123p.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 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. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.51. Diário Oficial da União**. Brasília: MAPA, 2002;

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

- BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O compromisso da qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF Editora, 2004. cap.26, p.317-333.
- BUENO, V. F. F. et al. Contagem bacteriana total 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.
- 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.
- CASSOLI, L. D; MACHADO, P. F.; RODRIGUES, A. C. O. et al. Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw Milk total bacterial count. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.1, p.44-48, 2008.
- CASSOLI, L.D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. 2005. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1751-1770, 2003.
- COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMÉTRIO, C. G. B. et al. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.12, p.1451-1457, 2003.
- FONSECA, L. F. L.; PEREIRA, C. C.; CARVALHO, M. P. Qualidade microbiológica do leite. In: Interleite - Simpósio Internacional Sobre Produção Intensiva De Leite, 4, 1999, Caxambu. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 1999. p. 1044 36-43.
- GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas

- profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216 – 222, 2005.
- GUNASEKERA, T.S. et al. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1228-1232, 2000.
- JATOBÁ, R.B. **Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipamento Bactocount para monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado**. 2009, 48f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2009.
- KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 11, p. 1383 – 1387, 2007.
- LACERDA, L. M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J. Contagem de células somáticas, composição e contagem bacteriana total do leite de propriedades leiteiras nos municípios de Miranda do Norte, Itapecurú – Mirim e Santa Rita, Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 209-215, 2010.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SILVA, L. F. P.; SARRIÉS, G. A. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 359 – 361, 2000.
- MEDEIROS, L.F.D.; VIEIRA, D.H. **Bioclimatologia Animal**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 126 p, 1997.
- NERO, L, A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. Leite e cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191 – 195, 2005.
- OLIVEIRA, L. F. T.; SILVA, S. P. Mudanças institucionais e produção familiar na cadeia produtiva do leite no Oeste Catarinense. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, Brasília, v. 50, n. 4, p. 705- 720, 2012.
- PANCOTTO, A. P. **Análise das características físico-químicas e microbiológicas do leite produzido no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio**

- Grande do Sul** – campus Bento Gonçalves. 2011. 34 f. TCC (Trabalho de Conclusão em Tecnologia em Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2011.
- PAULA, M. C. de et al. Contagem de células somáticas em amostras de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 5, p. 1303-1308, 2004.
- PEREIRA, A. R. 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, 1999.
- 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. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Ciência Animal**, v.36, n.3, p.121-124, 1999.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645 – 651, 2006.
- PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T. **Modificações ambientais para reduzir o estresse calórico em gado de leite**. Comunicado Técnico 42, 6p. 2004.
- ROSA, D. C.; TRENTIN, J. M.; PESSOA, G. A. et al. Qualidade do leite em amostras individuais e de tanque de vacas leiteiras. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.79, n.4, p.485-493, 2012.
- ROSA, L.S.; QUEIROZ, M.I. Avaliação da qualidade do leite cru resfriado mediante aplicação de princípios do APPCC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 27, n.2, p. 422-430, 2007;
- SANTOS, M. V. Efeitos da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: Congresso Panamericano De Qualidade Do Leite E Controle De Mastite, 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, 2002. p. 179-188.
- SAS INSTITUTE. **The SAS System for Windows 9.0** (compact disc). Cary, 2002.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite cru refrigerado. Uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 21 – 27, 2000.

CAPÍTULO 2

**Estabelecimento de uma curva de conversão de contagem bacteriana individual em
contagem padrão em placa**

**Establishment of a conversion curve of individual bacterial score in standard plate
count**

Resumo: O experimento foi conduzido no Laboratório de Qualidade do Leite, Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste – PROGENE, situado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco e na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição (DN). Objetivou-se estabelecer uma curva de calibração para o equipamento Bactocount IBC, que realiza contagem individual de bactérias (CIB) no leite, o qual deverá expressar os resultados em unidade formadora de colônia (UFC), preconizado pela IN 51 (MAPA, 2002). Foram coletadas aproximadamente 800 amostras de leite de tanques de expansão e de latões de quatro Estados da região Nordeste e, em seguida, acondicionadas em recipientes estéreis com capacidade para 100 mL e conservadas a 4°C (± 1) até a realização das análises, que não ultrapassou 48 horas. Após a análise no equipamento Bactocount IBC, as amostras foram encaminhadas para determinação de UFC utilizando a norma ISO 4833:2003. A curva de calibração foi construída com dados obtidos do contador individual de bactérias (CIB) comparando-os com os resultados do método de referência em UFC. Foi aplicada uma análise de correlação e posteriormente de regressão linear simples. Após a obtenção das equações referentes as quatro estações, observou-se que não houve efeito de estação do ano sobre a equação linear para conversão de CIB em CPP. Com o resultado encontrado, sugere-se a utilização de uma única equação de conversão durante todo ano. O alto grau de associação entre os métodos de contagem bacteriana em placa padrão e citometria de fluxo, é possível concluir que o equipamento Bactocount pode ser utilizado como método alternativo para contagem bacteriana total em leite cru refrigerado.

Palavras-chave: citometria de fluxo, contagem bacteriana total, contagem padrão em placa, qualidade do leite cru

Abstract: The experiment was conducted in the Milk Quality Laboratory, Management of Dairy Herds of Northeast Program (*PROGENE*, *Portuguese initials*), localized in the Animal Science Department of the Federal Rural University of Pernambuco (*UFRPE*) and in the Federal University of Pernambuco (*UFPE*), in the Experimentation and Feed Analysis Laboratory (*LEAAL*) of the Nutrition Department (*DN*). It is aimed established a calibration curve to the Bactocount IBC equipment, that realize an individual score of bacterias (ISB) on milk, which should express the results on unit form colony (UFC), preconized by IN (*Normative Instruction*) n. 51 (MAPA, 2002). Was collected approximately 800 milk samples of expansion tanks and of milk cans too arising from four Brazilian States of Northeast Region and, following, conditioning in sterile recipients with 100 mL of volume capacity and conserved at 4°C (± 1) until the analysis proceed, made it maximum in 48 hours. After the analysis in the Bactocount IBC, the samples were conducted to UFC determination using the ISO normative n. 4833:2003. The calibration curve was constructed with data obtained from individual counter bacteria (ICB) and was compared with the results of the reference method in colony forming unit (CFU). Was applied a correlation analysis and after of simple linear regression. After equations obtained of the four seasons, it was observed that not occur effect of season on the linear equation to conversion ICB to standard plate count (SPC). With the result found, it suggests that the utilization of only one conversion equation during all the year. With the high degree of association between bacterial count methods in standard plate and flow cytometry, is possible concluded that the Bactocount equipment can be utilized like alternative method to bacterial total count in the refrigerated raw milk.

Keywords: flow citometry, total bacterial counter, standard plate counter, raw milk quality

1. Introdução

Devido ao seu alto valor biológico, o leite sempre ocupou um papel de destaque na alimentação, uma vez que apresenta diferentes tipos de moléculas com funções importantes para o organismo. Sendo assim o leite é utilizado como fonte de nutrientes, bem como, na ativação e desenvolvimento do sistema imunológico (o colostro) para os neonatos, além de desempenhar papel importante na dieta dos adultos, decorrente da sua constituição em proteínas, lipídeos, glicídios, minerais e vitaminas.

Apesar da síntese dos componentes do leite ocorrer de forma semelhante entre as diferentes espécies de mamíferos, a composição físico-química analisada no leite destes animais pode ser bastante variável, até mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Fatores que afetam a produção e composição do leite estão relacionados aos animais (raça, sanidade, nutrição, reprodução e estágio de lactação), ao ambiente de criação e ao manejo alimentar. Essas alterações que são observadas na composição final do leite tornam-os importantes para o consumo humano, o que se deve a fatores como a presença de proteínas de alto valor biológico, gordura de elevada digestibilidade, presença de componentes desejáveis para o processamento do leite e seus derivados.

A crescente relevância dada a variação da composição nutricional do leite, surge em resposta as tendências de um mercado consumidor cada vez mais informado e exigente na busca por alimentos saudáveis e de boa qualidade. Além disso, a fim de atender as exigências impostas pelo mercado, as indústrias buscam matéria-prima de qualidade, que seja capaz de fornecer maior rendimento e segurança na fabricação do leite e dos seus derivados.

Uma série de fatores pode influenciar na qualidade do leite cru, entre os quais se destacam os fatores de caráter zootécnico como: o manejo, a saúde da glândula mamária, a

alimentação e o potencial genético dos rebanhos, e outros relacionados à obtenção e armazenamento do leite recém-ordenhado (GUERREIRO et al., 2005). Segundo Oliveira et al. (1999), os fatores zootécnicos, os associados ao manejo, à saúde da glândula mamária, à alimentação e ao potencial genético dos rebanhos são responsáveis pelas características de composição do leite e, também, pela produtividade do rebanho. A obtenção e o armazenamento do leite *in natura*, por outro lado, relacionam-se com a qualidade microbiológica do produto, inclusive determinando o seu prazo de vida útil.

Mesmo apresentando uma série de benefícios para saúde do homem devido aos componentes presentes em sua composição, o leite é, também, um bom meio de cultura para muitos microrganismos. Em função do número e do tipo de microrganismo, alterações indesejáveis podem ser observadas na aparência, sabor ou odor do leite ou de seus derivados. Além das alterações nas características organolépticas do leite, provocada por microrganismos, alguns deles podem representar risco à saúde do consumidor (FONSECA; SANTOS, 2000). Outras alterações não são tão facilmente observadas e devem ser verificadas utilizando-se métodos físico-químicos e microbiológicos.

De acordo com Rosa e Queiroz, (2007) a existência de falhas durante os processos de obtenção, manipulação e conservação vem sendo considerada como uma das principais razões para a perda de qualidade do leite. Além disso, o leite pode torna-se um veículo de transmissão de doenças, caso não haja um conjunto de ações preventivas, desde a sua produção até a chegada ao consumidor final (GRACINDO e PEREIRA, 2009). Com o aumento com a preocupação na alimentação e principalmente com a segurança alimentar por parte dos consumidores, tornou o mercado mais exigente em relação a qualidade de todos alimentos, inclusive os produtos lácteos, que sejam seguros, nutritivos e tenham sabor de um produto fresco (MITTELMANN et al, 2009).

Medidas de profilaxia, manejo nutricional, bem estar animal, qualificação da mão de obra, higiene dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha, bem como o transporte adequado até a indústria, são considerados fatores essenciais na qualidade do produto final. Medidas de controle de qualidade do leite torna-se uma ferramenta para valorização dos produtos comercializados, a fim de permitir a sua diferenciação e escolha por parte do consumidor. Esses atributos podem ser medidos pelo valor sensorial (sabor, aparência, odor, textura), nutricional (composição) e grau de segurança (qualidade microbiológica, presença de resíduos etc) (ALVES et al., 2008).

A cadeia produtiva do leite pode demonstrar sua responsabilidade com a sociedade, assumindo o compromisso com a saúde do consumidor fornecendo produtos seguros, saudáveis e competitivos (BRITO, 2008). Neste sentido, o setor leiteiro brasileiro vem passando por um intenso processo de modernização com significativas mudanças no sistema de produção, armazenamento e transporte para garantir a qualidade do produto final.

As propriedades químicas do leite são determinadas a partir da sua composição nutricional. Em geral, na composição do leite são avaliados o teor de água, gordura, lactose, proteína, minerais, entre outros, sendo secretado como uma mistura desses componentes. É importante salientar que esta composição varia de acordo com diversos fatores como a espécie e raça do animal, idade, alimentação, estágio de lactação (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006). A composição físico-química do leite apresenta relação direta com sua composição nutricional, mas também podem está relacionada ao manejo sanitário aplicado durante todo o processo de produção e manipulação do leite.

A boa qualidade do leite é definida, entre outros aspectos, pelo baixo número de microrganismos deteriorantes, ausência ou pequeno número de patógenos, baixa contagem

de células somáticas, ausência de resíduos químicos variados e os teores dos constituintes do leite. O conhecimento da composição do leite é essencial para a determinação de sua qualidade, pois define diversas propriedades sensoriais e industriais. Os parâmetros de qualidade são cada vez mais utilizados para detecção de falhas nas práticas de manejo, servindo como referência na valorização da matéria-prima.

De todos os microrganismos presentes no leite, as bactérias são as mais representativas. No leite cru, encontra-se uma população bacteriana bem heterogênea, incluindo as psicotróficas, que podem se desenvolver a 7°C ou menos; independente de sua temperatura ótima de crescimento, as termodúricas; que podem sobreviver ao tratamento térmico; as lácticas, que possuem a capacidade de acidificar rapidamente o leite cru sem refrigeração; os coliformes e; as bactérias patogênicas, principalmente as envolvidas com a mastite (HAYES & BOOR, 2001).

Verifica-se ainda que, no leite com baixa CBT ocorre predominância de bactérias gram-positivas e um leite com contagens elevadas prevalece às gram-negativas (SUHREN & REICHMUTH, 2000). Dentre as gram-negativas podemos destacar as bactérias dos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Aeromonas sp.* e *Alcaligenes sp.*, que podem causar maior preocupação, pela capacidade que possuem de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas de grande resistência térmica, ocasionando problemas durante o processamento do leite (TRONCO, 1997).

Acompanhando toda a modernização do setor, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) no ano de 2000 decidiu implementar medidas para melhorar a qualidade do leite no País, através da elaboração do Plano Nacional da Qualidade do Leite (PNQL). Entre as missões do PNQL destacam-se a melhoria da qualidade do leite e derivados, garantindo segurança a população e o aumento da competitividade de produtos lácteos em novos mercados (BRASIL, 2002). Logo após a implementação do PNQL, com

o objetivo de padronizar e fixar requisitos mínimos para a qualidade do leite, o MAPA, por meio da Instrução Normativa nº 51(IN 51), de 18 de setembro de 2002, estabeleceu normas de produção, identidade e qualidade do leite, visando adequar as exigências mínimas de qualidade do leite cru e industrializado previstas na legislação internacional (BRASIL, 2002).

Entre os padrões de qualidade da IN 51 encontram-se: regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), composição química e caracterização física (BRASIL, 2002; RIBEIRO et al., 2009). A CBT é um método de referência usado como indicador da qualidade do leite cru (PANTOJA et al., 2009).

Para atender a demanda por análises destes novos parâmetros, o MAPA criou a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), composta atualmente por oito laboratórios centralizados, distribuídos estrategicamente por todo País. Esses laboratórios possuem equipamentos automatizados, modernos, que oferecem capacidade analítica de realizar 150 análises por hora para CBT. Possuem também boa estabilidade analítica, simplicidade de operação e um excelente desempenho analítico. Empregam metodologias que permitem o tratamento dos componentes do leite que podem interferir nos resultados analíticos. Esses equipamentos utilizam marcadores celulares, como o brometo de etídio (corante específico de DNA e RNA) ao leite, para lisar as células somáticas, solubilizar os glóbulos de gordura e as proteínas, tornar a parede bacteriana permeável e corar o DNA e RNA das bactérias, sendo assim determinado o número de bactérias presentes na amostra, sendo expresso em contagem individual de bactérias (CIB).

Esses equipamentos são desenvolvidos tendo como base os métodos de referências para garantir a qualidade analítica, e reproduzir fielmente os resultados das amostras de leite cru analisadas. A velocidade analítica permite que os resultados cheguem mais

rápidos aos produtores, possibilitando, dessa forma, rapidez no processo de tomadas de decisões e facilidade na correção de possíveis variações na qualidade do leite, além de reduzir os prejuízos futuros aos produtores.

Embora estes equipamentos apresentem uma série de vantagens, em relação ao tempo de análise e a precisão, eles demandam alguns cuidados para a padronização de resultados, sobretudo a CBT por citometria de fluxo. Nessa técnica contam-se bactérias individuais, diferentemente do método de referência que estima, a partir da enumeração de microrganismos viáveis, apenas um grupo, mesófilos ou psicotróficos, distribuídos em colônias, que podem ser formadas por inúmeras bactérias, subestimando o valor real de bactérias presentes na amostra avaliada.

Apesar deste efeito, o padrão definido na IN 51 para CBT foi estabelecido em UFC/mL. Contudo, para expressar os resultados em UFC/mL, torna-se necessário desenvolver uma curva de linearização, transformação estatística dos resultados por meio de uma equação de regressão, a qual permite analisar o leite em contagem bacteriana individual (CBI) e expressar o resultado em UFC/mL.

Atualmente, os laboratórios brasileiros credenciados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para realizar as análises de leite exigidas pela IN-51, utilizam distintas curvas de conversão, uma vez que, o Brasil ainda não possui uma curva padrão. Na Europa diferentes estratégias de adequações têm sido adotadas, por exemplo, na Alemanha uma única equação de calibração foi elaborada para todos os laboratórios. Entretanto, países como Bélgica, França e Holanda desenvolveram equações individuais para cada laboratório (BROUTIN, 2004), o que, segundo Cassoli et al., (2010), pode gerar diferenças nos resultados finais em UFC/ml.

Alguns países não mais utilizam transformações de dados de contagem bacteriana, pois os limites de CBT foram definidos em CBI, como é o caso do Reino Unido, Noruega

e Canadá (BROUTIN, 2004; LESLIE et al., 2001). Isso remete a uma adequação dos limites de CBT destes países, já que a CBI pode apresentar resultados duas a três vezes superior que as contagens em UFC (GUANSAKERA et al., 2000).

Atualmente, o Brasil está em processo de obtenção de suas curvas de calibração de forma padronizada, a princípio regionalmente. Esta padronização é mais um passo importante para o PNMQL, uma vez que, os resultados de CBT serão mais consistentes e confiáveis.

Diante do exposto, o objetivo da presente pesquisa foi estabelecer uma equação de regressão que converta os valores obtidos pela técnica de citometria de fluxo em UFC utilizando os dados de contagem de bactérias de amostras de leite oriundas de tanques de expansão e latões de vários Estados da região Nordeste e determinar o grau de associação entre os métodos de referência do MAPA (UFC) e o de citometria de fluxo (CIB).

2. Material e Métodos

O trabalho foi conduzido na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no laboratório PROGENE do Departamento de Zootecnia (DZ) e na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no Laboratório de Microbiologia do Instituto Tecnológico de Pernambuco-ITP. O período de coleta das amostras ocorreu de novembro/2011 a agosto/2013, para que a amostragem fosse representativa de todas as estações do ano.

Foram coletadas 904 amostras de leite bovino (100 ml) de todos os estados do Nordeste, oriundas de tanques de expansão e latões, provenientes de indústrias de laticínios, cooperativas e fazendas leiteiras cadastradas no PROGENE. A coleta e transporte das amostras eram responsabilidade do PROGENE, seguindo o Procedimento Operacional Padrão desenvolvido pelo Ministério de Agricultura, Abastecimento-MAPA.

Foram coletados 200 mL de leite em recipientes de polipropileno estéreis e acondicionados em caixas térmicas com gelo até que chegassem ao laboratório no DZ/UFRPE.

No PROGENE, as amostras foram divididas em duas parcelas, uma para análise utilizando o Bactocount IBC® e a segunda parcela seguiu para no Laboratório de Microbiologia do Instituto Tecnológico de Pernambuco-ITP onde as bactérias foram enumeradas pelo método de contagem em placa padrão.

Para determinação da contagem bacteriana individual pelo método eletrônico, foi utilizado o equipamento Bactocount IBC (Bentley Instruments ®, 2004), que emprega a técnica de citometria de fluxo. Esta técnica consiste em: sistema óptico, tubos fotônicos, laser (luz verde visível a um comprimento de onda de 532 nm e infravermelho de 800-1100 nm), um detector de pulsos, conversor do sistema analógico para o digital e um computador para processamento dos dados.

As amostras foram homogeneizadas manualmente e alinhadas no rack da esteira do equipamento, em seguida, cada amostra passou por agitação automática e aquecimento (50°C).

Na sequência, uma alíquota de leite succionada pelo equipamento passando por dois períodos de homogeneização (sonificação). Por conseguinte, foi necessário 10 minutos para que a solução de incubação destruísse os interferentes da amostra e para que ocorresse a adesão do corante ao DNA bacteriano. Então, as células coradas eram injetadas em um capilar por processo de hidrodinâmica (Figura 1), passando pela câmara de fluxo (Figura 2) que alinha as partículas coradas, submetendo-as continuamente à incidência da luz do laser.

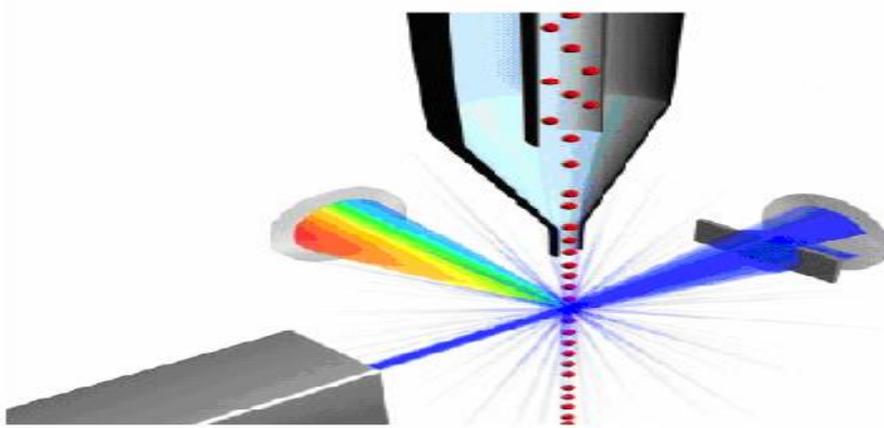


Figura 1. Processo hidrodinâmico de passagem e alinhamento da amostra de leite na câmara de fluxo

FONTE: www.invitrogem.com.br

Ao passar por esse feixe de luz, cada partícula corada emite fluorescência e tubos fotônicos captam a luz (Figura 3). A luminescência gera pulsos que são captados pelo sistema óptico sendo reconhecido como uma unidade individual. Os pulsos são convertidos em sinais, mediante transformação do sistema analógico para o digital, possibilitando a avaliação dos resultados automaticamente na tela do computador (BARRIENTOS et al., 2000; BROUTIN, 2004; GUNASEKERA et al., 2000).

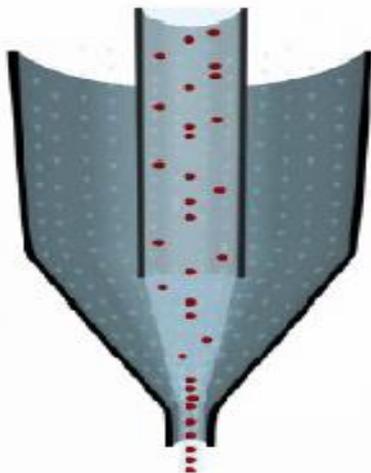


Figura 2. Alinhamento da amostra de leite na câmara de fluxo do equipamento Bactocount

FONTE: www.invitrogem.com.br

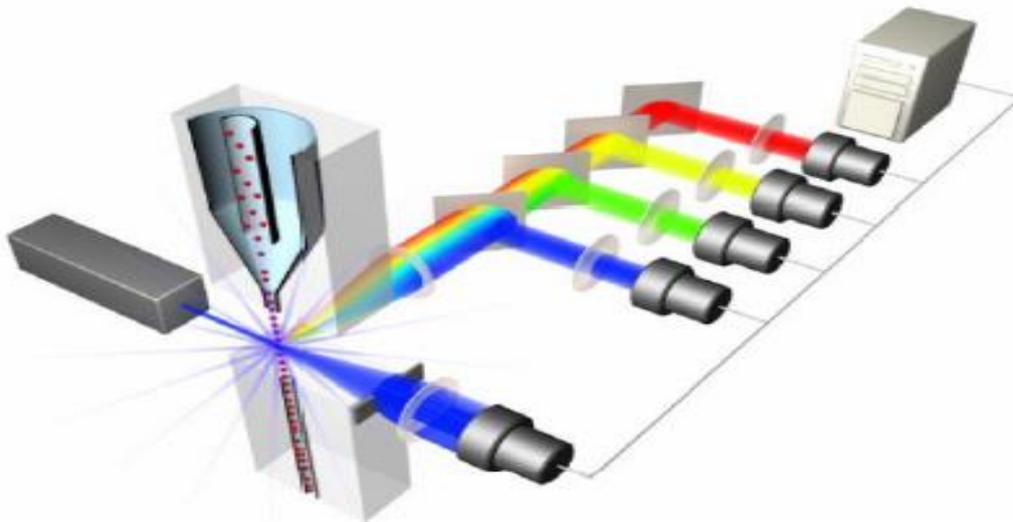


Figura 3. Luz do laser incidindo sobre a partícula da amostra de leite corada e detecção da luminescência

FONTE: www.invitrogem.com.br

Segundo Bertho (2001), a intensidade e largura dos pulsos fluorescentes são registrados e utilizados como parâmetro de contagem (Figura 4). Estes pulsos por sua vez, foram convertidos em sinais, mediante transformação do sistema analógico para o digital, possibilitando a avaliação dos resultados em CBI automaticamente na tela do computador (BARRIENTOS et al., 2000; JATOBÁ, 2009; GUNASEKERA et al., 2000).

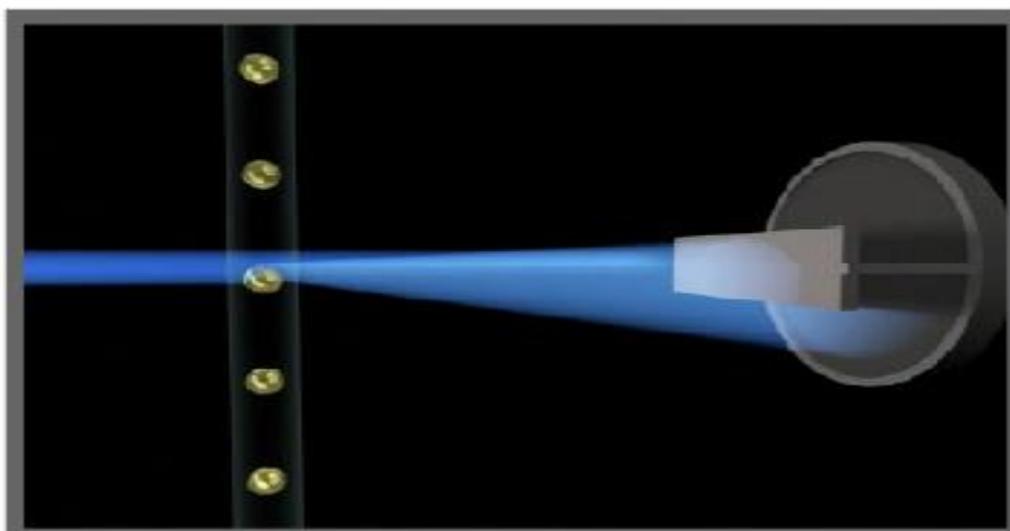


Figura 4. Detecção da luminescência emitida pela partícula da amostra de leite corada

FONTE: www.invitrogem.com.br

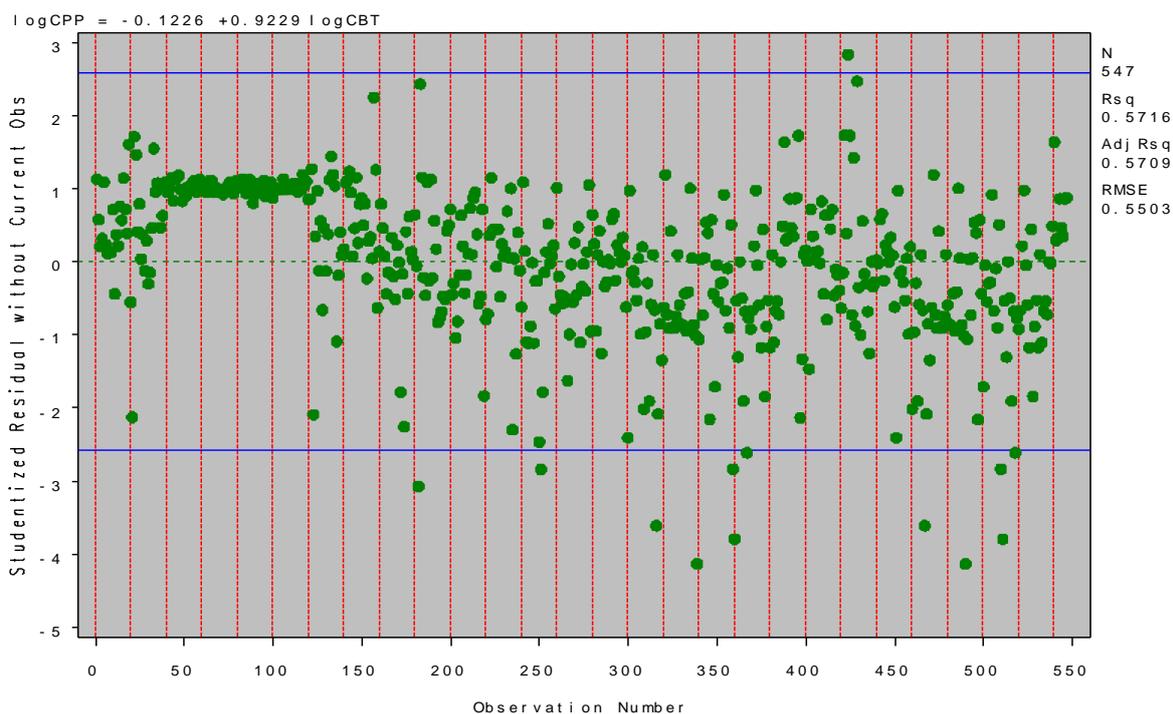
As análises realizadas por este método seguiram a norma ISO 4833:2003, como descrita a seguir:

Foram pipetados $25 \pm 0,2$ ml de cada amostra, em seguida foi adicionado 225 ml de solução salina peptonada 0,1%, com posterior homogeneização durante 60 segundos. Sendo esta a diluição 10⁻¹, as demais diluições necessárias foram efetuadas a partir desta, com base nos resultados expressos em CBI após análise pelo Bactocount IBC®.

Para inoculação foi semeado 1 ml de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis (em duplicata), sendo adicionado de 15 a 20 ml de PCA fundido e mantido em banho-maria entre 46 e 48°C. Realizou-se a adequada homogeneização do ágar com o inóculo, seguindo-se da sua solidificação em uma superfície plana. Na sequência, as placas invertidas sendo incubadas aerobicamente a 30°C por 72h. Foram selecionadas as placas que continham entre 25 e 250 colônias, onde foram contadas todas as colônias presentes. A partir dos dados obtidos, foi calculado o número de microrganismos presentes na amostra, sendo este resultado expresso em UFC.

Os dados foram transformados em Logaritmo, na base 10, para se proceder a análise. Em seguida, foram avaliados para identificação de outliers, usando o Proc Reg do SAS (Figura 5). Após remoção dos outliers, os dados foram submetidos à análise de correlação (Proc Corr, SAS) e de variância (PROC MIXed, SAS).

Check for Outlying Observations



3. Resultados e Discussão

Inicialmente, foi realizada uma análise geral com todos os dados aptos para determinação da equação. A partir destes dados, foi determinada uma equação de regressão geral. Para melhor determinação da equação de regressão proposta neste estudo, foram excluídos os outliers baseados no resíduo padrão superior a 2,58. Essa medida visa aumentar a confiança dos dados analisados, uma vez que, Para os dados transformados em logaritmo, qualquer desvio pode alcançar uma grande dimensão dos valores reais, para mais ou para menos.

Jatobá (2009), seguindo a orientação determinada pelo fabricante, na qual só devem ser utilizados dados em que a diferença entre os logIBC e logUFC não sejam superiores a $\pm 0,44$. Os dados que ultrapassaram esse valor de diferença entre logaritmos foram

considerados *outlier*. E sua determinação foi realizada com base no erro do desvio-padrão ($s_{y,x}$) e multiplicado por $\pm 1,96$ (IDF 128, 2006).

Após as amostras sofrerem esta seleção, obtiveram-se as equações para cada estação do ano (primavera, verão, outono e inverno). É importante salientar, que apesar de passar por um processo de seleção, os dados utilizados encontravam-se em quantidades satisfatória para a obtenção da equação, sendo utilizado 99% da população.

Para Ninane et al., (2000), Gunasekera et al., (2000) e Broutin, (2004) embora exista uma boa correlação entre os métodos instrumentais (automatizados) e métodos de referência, todos são unânimes em afirmar a necessidade de se utilizar um grande número de amostras de leite da região a ser monitorada, devido a vários fatores que podem interferir nesta correlação. Os principais fatores citados por Suhren & Reichmuth (2000) são: características de agregação das células bacteriana, tamanho, forma e o tipo de microbiota predominante no leite, Gram-positiva ou negativa.

Suhren et al. (2000) ressaltam a importância de se utilizar um grande número de amostras em estudos de correlação entre os métodos, pois vários fatores podem interferir na correlação, como é o caso do nível de contaminação bacteriana. Em amostras de leite onde a contagem bacteriana é reduzida, há uma predominância de bactérias Gram-positivas, enquanto que em amostras de alta contagem, predominam bactérias Gram-negativas. Segundo os autores, os equipamentos automatizados subestimam a contagem de bactérias Gram-negativas e superestima as Gram-positivas, quando comparado ao método de referência.

Após a seleção dos dados com base no *outlier*, uma nova análise foi realizada para a determinação da equação de regressão: $\log\text{UFC} = 0,951x - 0,263 * \log\text{IBC}$ com coeficiente de determinação de 0,65. A correlação pode ser considerada elevada de acordo com a classificação preconizada por Sampaio, (2010) em que $r < 0,30$ (baixa), r entre 0,3 e

0,6 (moderada) ou $r > 0,60$ (elevada). Na figura 5 podemos observar a relação de dependência linear envolvendo os logs IBC e UFC.

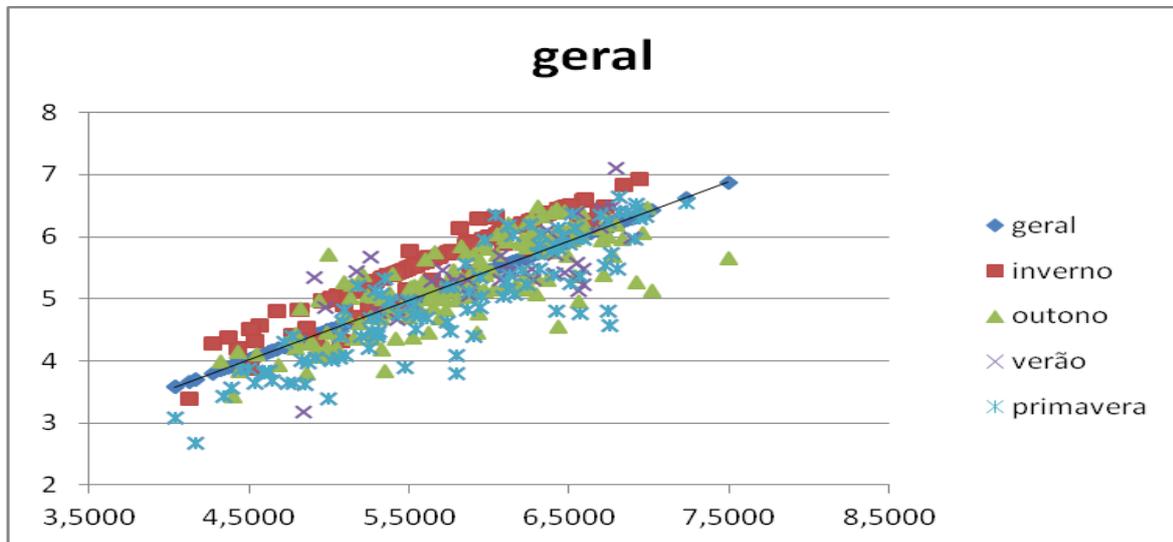


Figura 5 Regressão linear para conversão dos dados de contagem bacteriana total (CBT) para unidade formadora de colônia (UFC)

A transformação dos resultados obtidos por equipamentos de contagem eletrônica, baseados em citometria de fluxo é utilizada, também, em outros países. A equação de regressão para o citômetro de fluxo é variável de acordo com o local onde está sendo desenvolvido o trabalho. Gunasekera et al. (2000), em trabalho realizado na Austrália, obtiveram a equação $\log \text{UFC} = -0,9822 + 1,2913 * \log \text{IBC}$, enquanto Bolzoni et al. (2000), na Itália, obtiveram $\log \text{UFC} = -0,9078 + 0,495 * \log \text{IBC}$. No Brasil, Cassoli et al. (2008) e a EMBRAPA-CNPGL, analisando leite de tanque de expansão, obtiveram as seguintes equações: $\log \text{UFC} = 1,4617 + 0,7224 * \log \text{IBC}$ e $\log \text{UFC} = -1,9274 + 0,783 * \log \text{IBC}$, respectivamente.

Segundo Cassoli (2005), os países da Europa adotam diferentes estratégias para adequação desta nova metodologia. Por exemplo, a Alemanha, desenvolveu uma única equação de calibração para todos os laboratórios, baseada na contagem de microrganismos mesófilos. Já a Bélgica, França e Holanda, usaram o mesmo grupo bacteriano, no entanto,

cada laboratório desenvolveu a equação para seus equipamentos (BROUTIN, 2004). No Brasil, a exemplo destes países, também utilizou-se o grupo dos mesófilos e cada laboratório desenvolveu sua própria curva.

Apesar do método de referência ser utilizado pelo MAPA (BRASL, 2002), a aceitação de novas tecnologias que maximizam o rendimento das análises devem ser aceitas após sua devida validação. Isto ocorre com a técnica de citometria de fluxo empregada para contagem bacteriana total, que apresenta um alto grau de correlação com o método de referência. Entretanto, mesmo sendo evidenciada a alta correlação entre a técnica de citometria de fluxo empregada para contagem bacteriana total e o método de referência, a necessidade da conversão desses resultados tem sido questionada por pesquisadores.

De acordo com Leite (2006) alguns pesquisadores do RBQL tem questionado a metodologia de transformação dos resultados de contagem bacteriana individual (CBI) para UFC/m. uma vez que pode haver falta de precisão nos resultados finais, em virtude da variabilidade da microbiota presente no leite cru. Portanto, o autor considera que a metodologia de expressar resultado atualmente utilizada no Brasil, transforma um dado preciso e mais abrangente, obtido pela citometria de fluxo toda, em um dado estimado sujeito a erro.

Gunasekera *et al.* (2000) e Cassoli *et al.* (2007), observaram contagens mais elevadas em leite cru submetido ao método de citometria de fluxo. Holm *et al.* (2004) analisaram amostras de leite de tanques de expansão na Dinamarca métodos de citometria de fluxo e por análise microbiológica convencional. Para 92% das amostras, o método de citometria de fluxo resultou em contagens maiores do que o de contagem padrão em placas. Em média, a contagem pelo método de citometria de fluxo foi 3,8 vezes maior do que pelo método padrão de contagem em placas.

A maior contagem bacteriana observada na citometria de fluxo pode ser explicada pelo fato de que este método enumera a totalidade de bactérias viáveis, mas não cultiváveis assim como bactérias não viáveis; diferentemente da CPP, em que apenas bactérias viáveis que crescem em condições de cultivo em placas (nutrientes disponíveis no meio, tensão de oxigênio, temperatura e tempo de incubação) são contadas.

Segundo Gunasekera *et al.* (2000) e Cassoli *et al.* (2007), um outro aspecto negativo do método de referência é o de subestimar a quantidade total de bactérias no leite, uma vez que nem sempre uma colônia é originada de apenas uma única bactéria. Isso também é corroborado por outros pesquisadores, ao mencionarem que essa característica de agregação pode subestimar a contagem bacteriana, uma vez que uma colônia pode ter sido originada de várias bactérias (HILLERTON, 2000; BROUNTIN, 2004).

De acordo com Suhren & Walte (2000), devido a alguns fatores tais como a qualidade higiênica da ordenha, a estação do ano, as condições de estocagem, e as espécies microbianas contaminantes, torna-se inadequada a transformação dos resultados obtidos por citometria de fluxo pela equação de regressão armazenada no equipamento. Assim, os autores reportaram que muitos pesquisadores têm proposto a utilização de dados de contagem bacteriana total não transformados.

Países como o Canadá, Reino Unido e Noruega, estabeleceram em seus padrões a contagem individual de bactérias, realizada pelo método instrumental (automatizado) eliminando a necessidade do desenvolvimento de resultados e conferindo maior precisão nas informações geradas em decorrência das amostragens em propriedades leiteiras (LESLIE, 2001; BROUNTIN, 2004).

No Brasil esta transformação torna-se necessária em função dos limites legais para CBT, previstos na IN 51, terem sido estabelecidos em UFC. Isto implica na necessidade de se desenvolver uma equação de correlação entre o método de referência (CPP) e o

instrumental (citometria de fluxo) de modo que os resultados expressos em contagem individual de bactérias sejam transformados em UFC (CASSOLI, 2005). Devido ao seu vasto território, bem como, a sua variação climática observada ao longo do ano, a determinação de equações de correlação entre as metodologias de contagem bacteriana para as diferentes estações do ano tem sido defendida por vários pesquisadores.

Nas figuras 6; 7; 8 e 9 estão expressas as curvas de regressão linear entre a contagem bacteriana determinada por citometria de fluxo (CF) e contagem bacteriana padrão em placas para as quatro estações do ano (Primavera, Verão, Outono e Inverno).

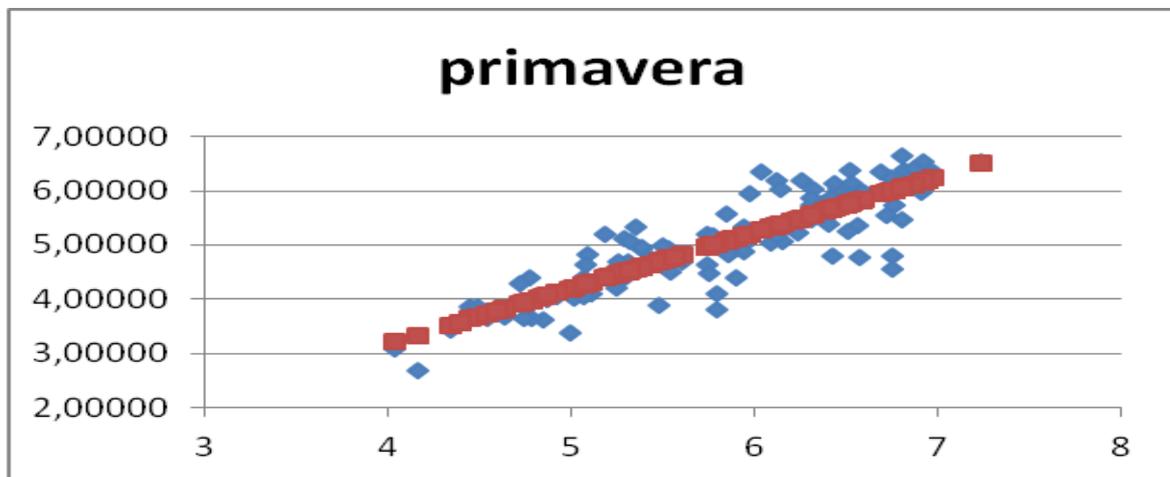


Figura 6 Regressão linear para conversão dos dados de contagem bacteriana total (CBT) para unidade formadora de colônia (UFC) em amostras de leite coletados na primavera

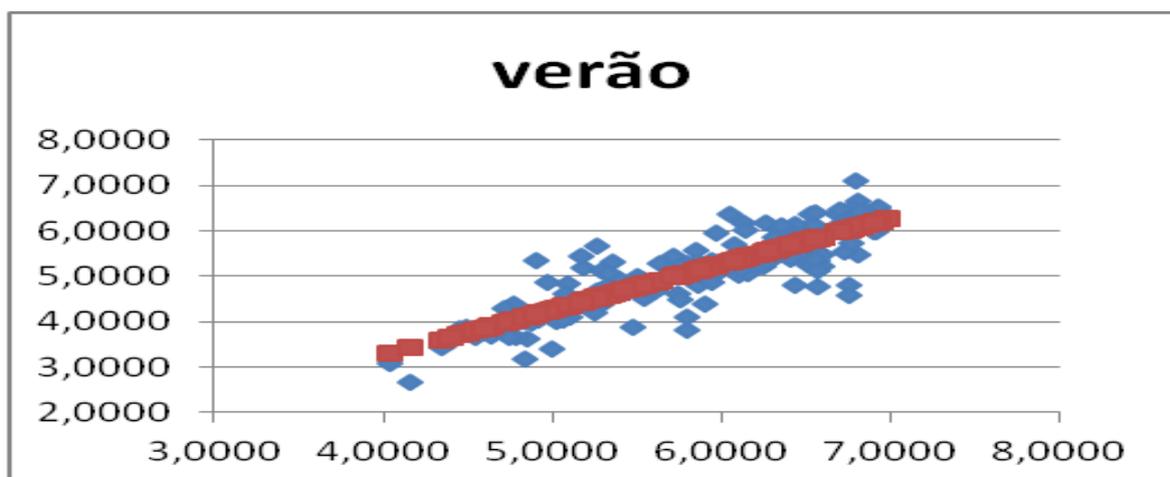


Figura 7 Regressão linear para conversão dos dados de contagem bacteriana total (CBT) para unidade formadora de colônia (UFC) em amostras de leite coletados no verão

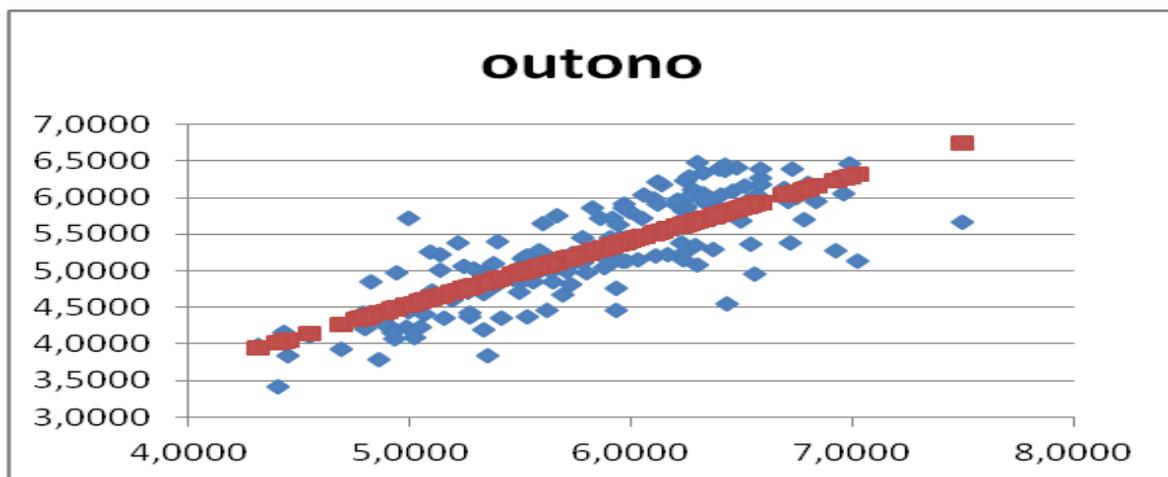


Figura 8 Regressão linear para conversão dos dados de contagem bacteriana total (CBT) para unidade formadora de colônia (UFC) em amostras de leite coletados no outono

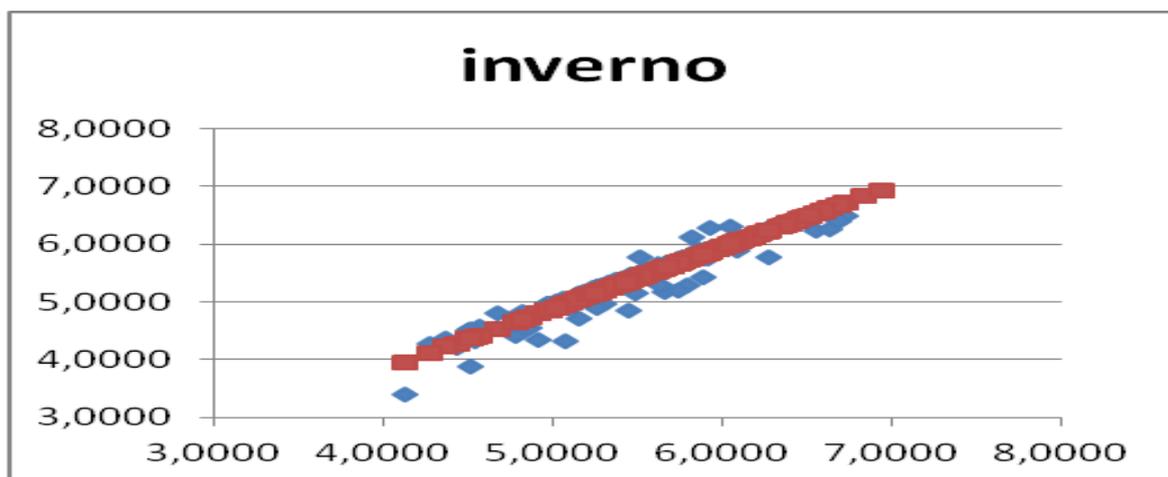


Figura 9 Regressão linear para conversão dos dados de contagem bacteriana total (CBT) para unidade formadora de colônia (UFC) em amostras de leite coletados no inverno

A *International Dairy Federation* (IDF) afirma que vários fatores podem influenciar a conversão dos resultados de CBT/mL para UFC/mL. Dentre eles estão o tipo de bactéria, o seu estado fisiológico, as características de agregação, entre outros. Além desses, fatores ligados ao manejo, a higiene e ao clima também exercem influência na contagem bacteriana. 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 (CEMPÍRKOVÁ, 2002;

DE GARNICA et al., 2013). Neste sentido, justifica-se a utilização de equações de regressão para as diferentes estações do ano.

Com base nos dados apresentados nas figuras 6; 7; 8 e 9, pode-se afirmar que independentemente da estação do ano, não houve efeito do log CBT e estação do ano ($p>0,05$), para as amostras de leite coletadas na região Nordeste. Apesar de ter ocorrido efeito da estação do ano em relação a contagem bacteriana total (dados citados no primeiro capítulo). Nesse caso, torna possível a utilização de uma única equação durante todo o ano. Mas, vale ressaltar que para isto, as boas práticas, devem ser motivo de preocupação no momento da obtenção do leite.

Entretanto, o valor encontrado demonstra haver uma tendência entre o LogCBT e as estações do ano ($p=0,07$), nesse caso, torna-se indispensável o monitoramento permanente, analisando-se amostras pelos dois métodos e efetuando ajustes na equação quando necessário (SUHREN et al. 2000).

Neves (2008) comparou o método referência ao método da citometria de fluxo, utilizando como parâmetro o grupo de microrganismos mais adequado para a calibração do equipamento (mesófilos e psicrotóxicos), o tipo de conservante da amostra (alídiol sólido ou líquido) e a época do ano (seca ou chuvosa). Para a variável estação do ano o coeficiente de determinação no período chuvoso ($R^2= 0,8134$) e seco ($R^2= 0,8153$), foram bastante semelhantes. Eles revelam a existência de alta relação entre os indicadores (CBI e contagem de mesófilos), independente do período. Sendo assim, pode-se afirmar que independentemente do período do ano, chuvas ou seca, não há diferença significativa ($p>0,05$), entre os resultados de CBI, CBT.

Cassoli (2005) relatou, em estudo realizado no Brasil, que não havia necessidade de utilizar duas equações de transformação ao longo do ano, em função do período das chuvas ($R^2= 0,727$) ou seca ($R^2= 0,824$).

Apesar da variação de informações sobre a elaboração e a utilização da equação de conversão nas diferentes estações do ano, principalmente entre o período seco e chuvoso, o seu estudo deve ser considerado um fator importante para conversão de CBI em CBT, uma vez que entres as estações do ano ocorre grande variação na concentração de microrganismo no ambiente e, por conseguinte no leite analisado. A não utilização das equações de regressão para diferentes regiões e estações do ano, pode levar à 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.

4. Conclusão

Não havendo efeito de estação do ano sobre a equação linear para conversão de CBI em CBT, sugere-se a utilização de uma única equação de calibração para o equipamento Bactocount.

Com alto grau de associação entre os métodos de contagem bacteriana em placa padrão e citometria de fluxo, é possível concluir que o equipamento Bactocount pode ser utilizado como método alternativo para contagem bacteriana total em leite cru refrigerado.

6. Referências Bibliográficas

- ALVES, R.N. et al. **Influência da qualidade do leite “in natura” sobre as características físico-químicas do leite pasteurizado na indústria de laticínios do CEFET-Bambuí.** I Jornada Científica e VI FIPA do CEFET Bambuí, Bambuí/MG – 2008;
- .BARRIENTOS, A. A. et. al. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.2, p.167-195, 2000.
- BERTHO, A. L. Citometria de fluxo, Rio de Janeiro. FIOCRUZ. Disponível em: <<http://www.fiocruz.com.br>> Acesso em: 15/12/15.
- BRASIL. Instrução normativa n.62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF: **Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal**, 2003, 123p.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 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. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.51. Diário Oficial da União.** Brasília: MAPA, 2002;
- BRITO, J. R. F. Boas Práticas Agropecuárias na Produção de Leite. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 3., 2008, Recife. **Anais...** Recife: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2008. p. 129-143.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; *et al.* **Biology of microorganisms.** 7 ed. New Jersey: Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1994. 909 p.
- BROUTIN, P. Contagem individual de bactérias no leite no manejo da qualidade. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O compromisso da qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: UPF Editora, cap.26, p.317-333. 2004.

- BUENO, V. F. F. et al. Contagem bacteriana total 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.
- 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.
- CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F.; RODRIGUES, A.C.O.; *et al.* Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw milk total bacterial count. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.1, p.44-48, 2007.
- CASSOLI, L. D; **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru.** 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP. 2005.
- CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. Total bacteria counts in bulk milk samples. **Vet. Med. – Czech**, v.47, p.227-233, 2002.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1751-1770, 2003.
- COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMÉTRIO, C. G. B. et al. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.12, p.1451-1457, 2003.
- DE GARNICA, M.L.; LINAGE, B.; CARRIEDO, J.A. Relationship among specific bacterial counts and total bacteria and somatic cell counts and factors influencing their variation in ovine bulk tank milk. *J. Dairy Sci.*, v.96, p.1021-1029, 2013.
- FONSECA, L. F. L.; PEREIRA, C. C.; CARVALHO, M. P. Qualidade microbiológica do leite. In: Interleite - Simpósio Internacional Sobre Produção Intensiva De Leite, 4, 1999, Caxambu. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 1999. p. 1044 36-43.

- FONSECA, L.F.L., SANTOS. M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. p. 49-58.
- GRACINDO, A.P.A.C.; PEREIRA, G.F. **Produzindo leite de alta qualidade**. Natal: Empresa de Pesquisa Agropecuária do RN (EMPARN), 1ed., 2009. 41p;
- GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216 – 222, 2005.
- GUNASEKERA, T.S. et al. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.1228-1232, 2000.
- HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E. H.; STEELE, J.L. (Eds.). **Applied Dairy Microbiology**, 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.59-76.
- HILLERTON, E. Contagem bacteriana no leite: importância para a indústria e medidas de controle. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: 2000. p.26-31.
- HOLM, C.; MATHIASSEN, T.; JESPERSEN, L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.5, p.935-941, 2004.
- JATOBÁ, R.B. **Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipamento Bactocount para monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado**. 2009, 48f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2009.
- KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 11, p. 1383 – 1387, 2007.
- LEITE, M.O. **Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol**. 62 f. Tese

- (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006.
- LESLIE, K.; KELTON, D.; DAY, K. A investigation of the relationship between the presence of Prototheca and Bactoscan counts in raw milk samples. In: International Symposium On Mastitis And Milk Quality, 2., Ithaca, 2001. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University Press, p.135-139. 2001.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SILVA, L. F. P.; SARRIÉS, G. A. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 359 – 361, 2000.
- MEDEIROS, L.F.D.; VIEIRA, D.H. **Bioclimatologia Animal**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 126 p, 1997.
- MITTELMANN, A. et al. **Noções sobre produção de leite** / editor-técnico: Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 172p.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. Leite e cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191 – 195, 2005.
- NEVES, R. B. S. **Influência do grupo de microrganismos – mesófilos, psicrotróficos – na linearização dos resultados do equipamento Bactoscan FC®**. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2008.
- NINANE, V.; REU, K.; OGER, R. et al. Évaluation du Bactoscan FC pour l'numeration des bactéries du lait cru. **Le Lait**, v.80, p.527-538, 2000.
- OLIVEIRA, L. F. T.; SILVA, S. P. Mudanças institucionais e produção familiar na cadeia produtiva do leite no Oeste Catarinense. **Rev. Econ. Sociol. Rural**, Brasília, v. 50, n. 4, p. 705- 720, 2012.
- OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v.13, n.62, p.10-16, 1999.

- PANCOTTO, A. P. **Análise das características físico-químicas e microbiológicas do leite produzido no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul** – campus Bento Gonçalves. 2011. 34 f. TCC (Trabalho de Conclusão em Tecnologia em Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2011.
- PANTOJA, J.C.F.; REINEMANN, D.J.; RUEGG, P.L. Associations among Milk quality indicators in raw bulk Milk. **Journal of Dairy Science**, vol. 92, n.10, p. 4978-4987, 2009;
- 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**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645 – 651, 2006.
- PIRES, M. F. A.; CAMPOS, A. T. **Modificações ambientais para reduzir o estresse calórico em gado de leite**. Comunicado Técnico 42, 6p. 2004.
- RIBEIRO, M.G. et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol. 29, n. 1, p. 52-58, 2009;
- ROSA, D. C.; TRENTIN, J. M.; PESSOA, G. A. et al. Qualidade do leite em amostras individuais e de tanque de vacas leiteiras. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.79, n.4, p.485-493, 2012.
- ROSA, L.S.; QUEIROZ, M.I. Avaliação da qualidade do leite cru resfriado mediante aplicação de princípios do APPCC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol. 27, n.2, p. 422-430, 2007;
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010. 264p.
- SAS INSTITUTE. **The SAS System for Windows 9.0** (compact disc). Cary, 2002.
- SUHREN, G. e REICHMUTH, J. Interpretation of quantitative microbiological results. **Milchwissenschaft**. v.55, p.18-22, 2000.

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

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite cru refrigerado. Uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 21 – 27, 2000.

TRONCO, V.M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. Santa Maria: UFSM, 1997. 166p

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**. Taylor e Francis Group, 2 ed. 2006. 808p.