

PAULA DE OLIVEIRA LIMA

**TÉCNICA DE ATP-BIOLUMINESCÊNCIA COMO ALTERNATIVA  
PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE LEITE CRU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA,  
MINAS GERAIS- BRASIL,  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L732t  
2015  
Lima, Paula de Oliveira, 1987-  
Técnica de ATP-bioluminescência como alternativa para  
avaliação da qualidade de leite cru / Paula de Oliveira Lima. –  
Viçosa, MG, 2015.  
xi, 59f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Nélio José de Andrade.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.52-59.

1. Leite cru - Análise. 2. Leite cru - Qualidade. 3. Leite -  
Microbiologia. 4. Adenosina trifosfato. 5. Luminescência -  
Técnica. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. II. Título.

CDD 22. ed. 664.07

PAULA DE OLIVEIRA LIMA

**TÉCNICA DE ATP-BIOLUMINESCÊNCIA COMO ALTERNATIVA  
PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE LEITE CRU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de dezembro de 2015.

---

Ana Clarissa Santos Pires  
(Coorientadora)

---

Leandro Licursi de Oliveira  
(Coorientador)

---

Patrícia Érica Fernandes

---

Nélio José de Andrade  
(Orientador)

## DEDICO

*À minha amada e guerreira mãe,  
Eliana.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida. Sem Ele, nada seria possível.

À Universidade Federal de Viçosa, pelas inúmeras oportunidades de crescimento e aprendizado.

À Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da pesquisa realizada.

Ao professor Nélio José de Andrade por viabilizar a execução deste trabalho. Agradeço, ainda, pela credibilidade depositada em minha pessoa assim como pela orientação, dedicação e exemplo.

À minha família pelo apoio e compreensão em mais essa etapa da minha vida. Especialmente a minha mãe Eliana, pelo amor incondicional. Minha eterna gratidão por nunca ter desistido dos meus sonhos e ter sonhado junto comigo.

Ao meu pai Oswaldo, pela força, suporte e confiança.

À minha irmã Júlia, por compartilhar o dia-a-dia de Viçosa comigo.

Ao Felipe, pelo companheirismo e amor.

À minha tia Dilene, pelo carinho.

À professora Ana Clarissa dos Santos Pires, pelos valiosos conselhos e orientação.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira, pela disponibilidade, ensinamentos e orientação.

À professora Mônica de Oliveira Leite por disponibilizar as análises no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG).

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior pelos ensinamentos estatísticos e sugestões.

Ao Bernardo Magalhães Martins por disponibilizar o estábulo da Zootecnia.

Ao Du, por me ajudar na coleta das amostras durante a ordenha.

A todos os meus colegas do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHMA) pela convivência agradável durante esses anos.

Às colegas, Roberta e Daiene pelos risos diários. À Patrícia Erica, pelo incentivo.

Às amigas que ganhei na Pós-Graduação, Andressa, Nayara, Lucas.

À Gabriela e à Luana, velhas amigas.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálises e do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

A todos, que diretamente ou indiretamente, contribuíram para desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada.

*"Mesmo que o futuro lhe pareça distante  
ele está começando neste exato  
momento". Mattie*

## **BIOGRAFIA**

PAULA DE OLIVEIRA LIMA, filha de Oswaldo de Souza Lima Filho e Eliana de Fátima Silvana de Oliveira Lima, nasceu em Cataguases, Minas Gerais.

Em março de 2008, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios, na Universidade Federal de Viçosa, graduou-se em maio de 2013, e, em agosto do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-graduação, em nível de mestrado, em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa.

## CONTEÚDO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
ABSTRACT.....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1. Objetivos específicos.....	3
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1. Produção brasileira e mundial de leite.....	4
3.2. Legislação brasileira.....	5
3.3. Parâmetros utilizados para avaliação da qualidade de leite.....	7
3.3.1. Contagem bacteriana total (CBT).....	8
3.3.2. Contagem de células somáticas (CCS).....	9
3.3.3. Composição centesimal.....	12
3.3.4. Contagem celular diferencial (CCD).....	15
3.4. ATP-bioluminescência.....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
4.1. Seleção.....	22
4.2. Amostragem.....	22
4.3. Contagem de células somáticas (CCS).....	23
4.4. Contagem bacteriana total (CBT).....	24
4.5. Contagem celular diferencial (CCD).....	26
4.6. Análise por ATP-bioluminescência.....	26
4.7. Análises estatísticas.....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
5.1. Qualidade das amostras de leite cru.....	32
5.2. ATP-bioluminescência.....	40
5.2.1. Leite cru.....	40
5.2.2. Equipamentos de ordenha e mão de manipuladores.....	46
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>52</b>

## RESUMO

LIMA, Paula de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2015. **Técnica de ATP-bioluminescência como alternativa para avaliação da qualidade de leite cru.** Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Ana Clarissa dos Santos Pires e Leandro Licursi de Oliveira.

A ATP-bioluminescência é uma técnica com grande potencial para avaliação rápida da qualidade de alimentos. Entretanto, não se sabe ao certo a relação entre o ATP e os constituintes dos alimentos. O presente trabalho teve como objetivo determinar o conteúdo de ATP presente no leite cru por meio da bioluminescência e avaliar a sua correlação com a qualidade do leite. Foram realizadas a Contagem de Células Somáticas (CCS), a Contagem Bacteriana Total (CBT), Contagem celular diferencial (CCD) e composição centesimal de 15 amostras compostas de leite cru em equipamentos eletrônicos baseados na citometria de fluxo. O conteúdo de ATP do leite foi avaliado utilizando kits para a avaliação da quantidade de ATP total para amostras líquidas e a leitura da bioluminescência foi realizada em luminômetro comercial, com os resultados expressos em Unidades Relativas de Luz (URL). Para a avaliação do procedimento de higienização dos equipamentos e mão de manipuladores, os kits empregados foram para determinação de ATP total em superfícies. Os resultados demonstraram que 9 amostras de leite apresentaram baixa CCS ( $\log$  de  $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1} \leq 5,0$ ), 2 amostras apresentaram média CCS ( $5,0 < \log$  de  $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1} \leq 5,7$ ) e 4 amostras apresentaram alta CCS ( $\log$  de  $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1} > 5,7$ ), indicando aproximadamente uma prevalência de 27% de vacas com mastite no rebanho. Entretanto, 93% das amostras de leite apresentaram valores de CBT abaixo do limite ( $\log$  de  $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1} \leq 5,5$ ), atualmente estabelecido pela Instrução Normativa nº 62, evidenciando qualidade microbiológica satisfatória das amostras em estudo. Em relação ao perfil celular das amostras, observou-se que a CCD boa correlação ( $r=0,83$ ) com a contagem de células somáticas e que os animais com processo infeccioso na glândula mamária foram aqueles que além de possuírem alta CCS, apresentaram porcentagem de macrófagos acima de 26%. Os resultados da bioluminescência, demonstraram que o conteúdo médio de ATP, em  $\log$  de  $\text{URL}\cdot\text{mL}^{-1}$ , nas amostras de leite foi 4,22,

variando de 3,58 a 4,87. Em relação aos efeitos da bioluminescência sobre os constituintes do leite, observou-se que um aumento no valor de ATP acarreta em um acréscimo da porcentagem de CCS ( $r= 0,720$ ). O mesmo pode ser visualizado para a porcentagem de CBT ( $r= 0,614$ ). Entretanto, para a porcentagem de lactose, foi encontrada correlação negativa ( $r= -0,570$ ). Da mesma maneira, com base em regressão não linear, observou-se correlação positiva entre o aumento de ATP ( $\log$  de URL  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) e o incremento nos valores de CBT ( $R^2=0,61$ ) e CCS ( $R^2=0,81$ ). Assim, constatou-se resposta para qualidade microbiológica e celular do leite em função da ATP-bioluminescência, quando o conteúdo de ATP ( $\log$  de URL  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) foi acima de 4,21 e 4,44 para CCS e CBT, respectivamente. No que se refere a avaliação da higienização dos equipamentos e mão de manipuladores, constatou-se uma redução significativa ( $P<0,05$ ) nos valores de URL após a limpeza e sanitização dos mesmos. Os resultados podem no futuro contribuir para o desenvolvimento e aplicação de ATP-bioluminescência na avaliação da qualidade de leite cru.

## ABSTRACT

LIMA, Paula de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2015. **ATP-bioluminescence technique as an alternative to assessing the quality of raw milk.** Adviser: Nelio José de Andrade. Co-Advisers: Ana Clarissa dos Santos Pires and Leandro de Oliveira Licursi.

ATP-bioluminescence is a technique with great potential for rapid assessment of the quality of food. However, no one knows for sure the relationship between the ATP and the constituents of food. This study aimed to determine the ATP content present in raw milk by means of bioluminescence and evaluate their correlation with the quality of milk. We performed a Somatic Cell Count (SCC), the Total Bacterial Count (TBC), Count differential cell (CCD) and chemical composition of 15 composite samples of raw milk in electronic equipment based on flow cytometry. The ATP content of the milk was assessed using kits for evaluating the total amount of ATP for liquid samples and reading the bioluminescence was performed on a commercial luminometer, with the results expressed in Relative Light Units (URL). For the evaluation of the cleaning procedure of the equipment and manipulators hand, the kits were used to determine ATP full surfaces. Results showed that 9 samples showed low SCC milk ( $\text{cel log} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 5.0$ ), 2 samples showed an average CCS ( $5.0 < \text{cel log} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 5.7$ ) and 4 samples had high SCC ( $\text{cel log} \cdot \text{mL}^{-1} > 5.7$ ), approximately indicating a prevalence of 27% of cows with mastitis in the herd. However, 93% of milk samples showed CBT values below the limit ( $\text{CFU log} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 5.5$ ), currently established by Instruction No. 62, indicating a satisfactory microbiological quality of samples analyzed. Regarding the cellular profile of the samples it was observed that the CCD good correlation ( $r = 0.83$ ) with somatic cell count and the animals with infectious process in the mammary gland were one that besides having high SCC, presented percentage macrophage above 26%. The results of bioluminescence show that the average ATP content, URL  $\text{log} \cdot \text{ml}^{-1}$  in the milk samples was 4.22, ranging from 3.58 to 4.87. In relation to the effects of bioluminescence on the milk constituent, it was observed that an increase in the amount of ATP causes an increase in the percentage of CCS ( $r = 0.720$ ). The same can be displayed for the percentage of CBT ( $r =$

0.614). However, for the percentage of lactose, found a negative correlation ( $r = -0.570$ ). Similarly, based on non-linear regression, there was a positive correlation between increased ATP ( $\text{URL log} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) and the increase in CBT ( $r^2 = 0.61$ ) and CCS ( $R = 0.81$ ). Thus, it was found answer to microbiological quality of the milk and cell function in the ATP-bioluminescence, when the content of ATP ( $\text{URL log} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) was above 4.21 and 4.44 for SCC and TBC, respectively. As regards This evaluation of the cleanliness of equipment and manipulators hand, we found a significant reduction ( $P < 0.05$ ) values for the URL after cleaning and sanitizing the same. The results may eventually contribute to the development and application of ATP-bioluminescence in assessing the quality of raw milk.

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por novos métodos rápidos, precisos e de baixo custo para determinação da qualidade do leite e seus derivados têm sido discutida tanto no âmbito industrial quanto no âmbito acadêmico. Além do mais, os consumidores estão cada vez mais exigentes e conscientes em relação à qualidade e segurança dos alimentos.

Para avaliação da qualidade do leite cru, os métodos exigidos pela legislação brasileira para detecção e enumeração de micro-organismos e células somáticas são relativamente caros. A contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS) são baseadas na citometria de fluxo e demandam mão de obra qualificada, além de estarem disponíveis apenas nos laboratórios credenciados pelo governo e nas indústrias de grande porte.

Outros métodos, como por exemplo, a contagem de mesófilos aeróbios é empregada na indústria com o intuito de avaliar a qualidade microbiológica do leite, entretanto esse método quando comparado a técnica de ATP-bioluminescência, é demorado e trabalhoso. Já para avaliação da qualidade celular do leite, o California Mastitis Test (CMT) é amplamente usado no campo, porém é um teste qualitativo e necessita da interpretação individual do analisador, podendo comprometer os resultados.

Uma alternativa propícia para aprimorar e acelerar as análises de leite cru é a ATP-bioluminescência que pode ser utilizada tanto no chamado “*cow-side*” quanto na recepção de leite cru nas indústrias. A técnica de ATP-bioluminescência é baseada na emissão de luz visível proveniente da liberação química de fótons produzidos pela oxidação da molécula de adenosina trifosfato (ATP) por meio do complexo luciferina/luciferase. A quantificação da concentração de ATP é realizada com o auxílio de um luminômetro e os resultados são dados em URL (Unidades Relativas de Luz).

A ATP-bioluminescência fornece estimativas em tempo real do conteúdo de ATP que pode estar associado com a carga microbiana e celular presente no leite cru, uma vez que a molécula de ATP é o nucleotídeo encontrado em todas as células vivas.

Assim, acredita-se que pesquisar a correlação entre o conteúdo de ATP e a qualidade celular e microbiológica do leite cru é estratégico do ponto de vista científico e tecnológico, visando o desenvolvimento de uma nova técnica para aplicação na indústria de laticínios.

## **2. OBJETIVOS**

Determinar o conteúdo de ATP presente no leite cru por meio da bioluminescência e avaliar a sua correlação com a qualidade do leite cru.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Avaliar a qualidade das amostras de leite cru em relação à contagem bacteriana total (CBT), à contagem de células somáticas (CCS) e à composição química.
- Determinar o conteúdo de ATP presente nas amostras de leite cru.
- Relacionar a contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS) com o conteúdo de ATP encontrado no leite cru bovino.
- Avaliar o efeito da variação nos níveis de ATP com os constituintes (proteína, gordura, lactose, sólidos totais, CBT e CCS) do leite.
- Determinar a contagem celular diferencial (CCD) das amostras de leite cru.
- Relacionar a alta CCS com a presença de linfócitos e macrófagos por meio da CCD.
- Avaliar a concentração de ATP em superfícies de teteiras e de mão de manipuladores do

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Produção de leite brasileira**

A demanda mundial de lácteos aumentou consideravelmente nos últimos anos e esse cenário, conseqüentemente, tem impulsionado a produção global de leite. No Brasil, o leite está entre os produtos mais importantes da agropecuária brasileira e é produzido em todo o território nacional, uma vez que as condições climáticas do país permitem a adaptação da atividade às peculiaridades regionais.

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em 2012, o Brasil foi o quinto maior produtor de leite do mundo. A região Sudeste, possui maior parcela participativa na aquisição de leite, apresentando 39,7% de participação e Minas Gerais ainda é o principal estado em aquisição de leite, 26,2% do total nacional, seguido pelo Rio Grande do Sul (13,0%), pelo Paraná (12,1%) e por Goiás (11,2%) (IBGE, 2015).

Apesar de destacar-se no ranking dos maiores produtores, o Brasil apresenta déficit na balança comercial de leite industrializado (EMBRAPA, 2010).

A pequena parcela exportada é destinada, em sua maior parte, a países africanos e da América Latina, possivelmente em virtude da não conformidade aos padrões de qualidade quando comparado aos padrões americanos e europeus (LABOISSIÈRE, 2010; BAPTISTA; PINTO, 2013).

Um dos obstáculos para ampliar a exportação de leite brasileira está relacionado à qualidade do produto, considerada inferior às da Argentina, do Uruguai, dos Estados Unidos e de países europeus (CAMPOS; PIACENTI, 2007).

A má qualidade do leite brasileiro é atribuída a fatores como o baixo nível tecnológico e a heterogeneidade dos produtores; o alto custo de produção; a baixa produtividade e produção do rebanho; as importações erráticas e a falta de política para o setor lácteo (BAPTISTA; PINTO, 2013).

### **3.2. Legislação Brasileira**

Atualmente no Brasil, a legislação vigente sobre a qualidade do leite cru é estabelecida pela Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011 (IN 62), que aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel (BRASIL, 2011).

A Instrução Normativa nº 62, foi aprovada com o intuito de substituir a Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002 (IN 51), pelo fato de que os produtores não conseguiram se adaptar ao que a legislação exigia no tempo previsto (BRASIL, 2011).

Em relação à qualidade do leite, a IN 62 prevê que até 2016 o máximo de contagem de células somáticas (CCS) seja de 400 mil células por mililitro de leite cru e de 100 mil UFC por mililitro de leite para contagem bacteriana total (CBT) no Centro-Sul. Já no Norte e Nordeste esta mudança deve ocorrer até 2017 conforme observado na Tabela1:

Tabela 1: Metas para contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) estipuladas pela rede brasileira de laboratórios de controle de qualidade do leite cru para as regiões norte (N), nordeste (NE), sul (S), sudeste (SE) e centro-oeste (CO) do Brasil.

Regiões		Parâmetros	
N, NE	S, SE, CO	CBT (UFC·mL)	CCS (cel·mL)
01/07/2010 a 31/12/2012	01/01/2008 a 31/12/2011	$7,5 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$
01/01/2013 a 30/06/2015	01/01/2012 a 30/06/2014	$6 \times 10^5$	$6 \times 10^5$
01/07/2015 a 30/06/2017	01/07/2014 a 30/06/2016	$3 \times 10^5$	$5 \times 10^5$
A partir de 01/07/2017	A partir de 01/07/2016	$1 \times 10^5$	$4 \times 10^5$

Fonte: Adaptado de MAPA, 2011.

As regiões Norte e Nordeste possuem um tempo maior para se adequarem gradualmente aos novos limites estabelecidos, visto que o sistema de ordenha mecânica e tanque de resfriamento foram implantados recentemente quando comparados às regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (BRASIL, 2011).

A IN 62, bem como a IN 51, mantém a exigência do controle diário de qualidade do leite cru refrigerado no estabelecimento industrial sendo necessárias as seguintes análises: temperatura; teste do álcool /alizerol na concentração mínima de 72% v/v (setenta e dois por cento volume/volume); acidez titulável; índice crioscópico; densidade relativa à 15°C; teor de gordura; pesquisa de fosfatase alcalina (quando a matéria-prima for proveniente de Usina e ou Fábrica); pesquisa de peroxidase (quando a matéria-prima for proveniente de Usina e ou Fábrica); porcentagem de sólidos totais (ST) e de sólidos não gordurosos (SNG) e outras quando forem necessárias.

Inúmeras medidas necessárias para alcançar os objetivos apresentados pela IN 62 foram propostas: facilidade de acesso ao crédito para financiamento

da produção de leite; estabelecimento pelas indústrias lácteas de programas de pagamento baseado em indicadores de qualidade do leite; criação de programas de incentivo de consumo de produtos lácteos e sensibilização do consumidor quanto à sua importância na exigência por produtos com qualidade; proposição e realização programas de capacitação para os produtores e transportadores de leite, com foco em educação sanitária e qualidade do leite, dentre outras (PAULA; SALGADO, 2012).

A obtenção de um leite de boa qualidade é um trabalho árduo que requer treinamento, monitoramento, capacitação, qualificação e tempo, tornando um desafio para a toda cadeia produtora de leite. No Brasil, ainda existe um longo caminho a percorrer para a obtenção de um leite de boa qualidade mesmo com a instituição das Instruções Normativas 51 e 62, sendo necessário um maior envolvimento de todo setor, principalmente do governo, incentivando os produtores e indústrias a se adequarem nos prazos previstos (PAULA; SALGADO, 2012; TURCO et al., 2007).

### **3.3. Parâmetros utilizados para avaliação da qualidade de leite**

#### **3.3.1. Contagem bacteriana total (CBT)**

Inicialmente, o leite ao ser sintetizado e secretado no lúmen alveolar é isento de micro-organismos, todavia ao ser retirado, manuseado, armazenado e transportado pode se contaminar com micro-organismos provenientes do próprio animal e do ambiente, podendo incluir tanto micro-organismos patogênicos como deterioradores (TRONCO, 2008; APARECIDA et al., 2002)

Em boas condições de manuseio e conservação a microbiota do leite cru é predominantemente gram-positiva. O leite cru mantido em temperaturas de refrigeração pode apresentar os seguintes gêneros de bactérias: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskivia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, assim como alguns representantes de pelo menos um gênero dos coliformes (JAY, 2009).

Diversos estudos demonstram que a má qualidade microbiológica do leite é influenciada basicamente por quatro fatores: doenças decorrentes da glândula mamária do animal; falhas na limpeza do úbere e na higienização de equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha, má qualidade da água do estábulo e inadequado resfriamento do leite (GUERREIRO et al., 2005; JÚNIOR; BELOTI, 2012; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

Os principais micro-organismos contaminantes do leite são divididos em três grupos principais: os mesófilos, os termodúricos e os psicotróficos. As bactérias psicotróficas, na maioria, são mesófilas, isto é, a temperatura ótima de multiplicação é entre 25°C a 35°C. Entretanto, possuem a capacidade de se multiplicar em baixas temperaturas, embora de forma mais lenta. Os principais gêneros são: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Lactobacillus* e *Flavobacterium* (JAY, 2009; TRONCO, 2008).

As bactérias termodúricas são resistentes à pasteurização suportando temperaturas relativamente altas (menos de 100°C) e algumas possuem a capacidade de produzir esporos que são formas de resistência contra condições adversas. Exemplos de gêneros com espécies esporuladas são *Clostridium* e *Bacillus* (JAY, 2009).

O principal parâmetro utilizado para se verificar a qualidade do leite é o seu perfil microbiológico, determinado principalmente pela sua forma de obtenção, armazenamento e transporte. Grupos específicos de microrganismos são pesquisados para esse fim, como os aeróbios mesófilos, coliformes e psicotróficos (NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009).

No Brasil, em atendimento a IN 62, a avaliação microbiologia é realizada por meio da contagem eletrônica, utilizando equipamentos baseados na citometria de fluxo que fazem a contagem total de bactérias (CBT) (SENA et al., 2006).

A CBT é o número de bactérias contidas no leite, cujo valor numérico é expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro de leite ( $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Entretanto esses equipamentos são caros e estão disponíveis nas indústrias de grande porte e nos laboratórios oficiais (LEITE, 2006).

Além da CBT, existem outros métodos que são utilizados para avaliar a qualidade microbiológica do leite como, por exemplo, análise de micro-organismos mesófilos, redutase, contagem com incubação preliminar, contagem de coliformes totais, contagem de bactérias psicrófilas e outros. Cada uma dessas avaliações é realizada com o intuito de obter informações gerais ou pontuais sobre um determinado grupo de micro-organismos (TRONCO, 2008).

A alta CBT pode causar vários prejuízos para a cadeia do leite, como alterações no sabor e odor dos produtos e alterações no tempo de validade do leite *in natura* e dos derivados lácteos, tendo, portanto, um importante impacto na segurança dos alimentos (BOZO; SILVA; OKANO, 2013).

De forma geral, as principais fontes de contaminação direta de bactérias para o leite cru são do próprio animal: quartos mamários infectados (mastite), úbere e pele dos tetos sujos; do meio ambiente: utensílios e/ou equipamentos sujos que entrem em contato com o leite e do pessoal responsável pela obtenção e manipulação do leite (SILVEIRA; BERTAGNOLLI, 2014).

O leite produzido sem os devidos preceitos de higiene tem qualidade inferior ou mesmo inadequada para consumo, mesmo que lhe dispensem posteriormente os maiores cuidados e melhores tratamentos. A presença dos micro-organismos varia qualitativa e quantitativamente em função das condições de higiene existentes (QUEIROGA et al., 2007; SILVEIRA; BERTAGNOLLI, 2014).

### **3.3.2. Contagem de células somáticas (CCS)**

A contagem de células somáticas (CCS) também é um dos parâmetros utilizados para avaliar a qualidade do leite, a saúde do úbere do animal e em alguns países também é usada como indicador da qualidade higiênico-sanitária do leite (PERES NETO & ZAPPA, 2011; MARTINS, 2013).

O aumento da CCS está associado à mastite, que por definição geral é a inflamação da glândula mamária de bovinos possuindo etiologia ampla,

relacionada com a presença de micro-organismos e suas toxinas, traumas físicos e agentes químicos. Nos rebanhos leiteiros, a mastite é uma das enfermidades de maior ocorrência e na maioria dos casos é resultante da invasão de micro-organismos patogênicos através do canal do teto (BRITO; BRITO; VERNEQUE, 2000; COLDEBELLA et al., 2004; PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010)

A reação inflamatória que ocorre na glândula mamaria é decorrente da resposta imunológica contra os agentes infecciosos, que se multiplicam e desencadeiam danos ao epitélio mamário, acionando o sistema imune que passa a liberar células de defesa com a finalidade de destruir e/ou neutralizar os agentes infecciosos e suas toxinas, permitindo que a glândula retome sua função normal (MARTINS, 2013; BRITO et al., 1997).

Entende-se por células somáticas, todas as células presentes no leite, incluindo as células provenientes da corrente sanguínea como os leucócitos e células de descamação do epitélio mamário. Os neutrófilos constituem a maior porcentagem dos leucócitos durante a mastite e são responsáveis pela fagocitose e liberação de enzimas que destroem os micro-organismos. Além dos neutrófilos, monócitos, linfócitos (células T e células B) e outros granulócitos (basófilos e eosinófilos), também são reunidos a fim de eliminar os patógenos (PØDENPHANT et al., 2014).

De acordo com o processo inflamatório, a mastite pode apresentar duas formas de manifestação: mastite clínica e mastite subclínica (BRADLEY, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007; EMBRAPA, 2014).

A mastite clínica é caracterizada pela presença de sinais clínicos explícitos no leite e no úbere do animal. Os sintomas apresentados compreendem a reação ao toque em razão da dor; aumento da temperatura e edemas no quarto mamário afetado; secreção de pus, grumos e filamentos de sangue no leite; sintomas sistêmicos como depressão, desidratação e além de sintomas gerais como a redução no consumo alimentar e conseqüentemente diminuição da produção de leite (LE MARÉCHAL et al., 2011; NASCIF JR., 2001; EMBRAPA, 2014).

A forma subclínica da doença apresenta maior importância epidemiológica, pois é disseminada silenciosamente pelo rebanho, não apresentando sinais visíveis no leite ou na glândula mamária que evidenciem o processo inflamatório, contudo, ocorre queda na produção e mudança na composição do leite como, aumento de CCS, íon  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  e de proteína sérica, e diminuição de caseína, lactose e gordura. A mastite subclínica é a forma mais recorrente nos rebanhos e é responsável por 90 a 95% dos casos de mastite, apresenta uma prevalência 15 a 40 vezes maior que a forma clínica da doença (CARLOS, 2007; PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010)

Quando classificada de acordo com os micro-organismos, a mastite pode ser denominada como contagiosa ou ambiental. Os casos de mastite contagiosa são caracterizados pela maior incidência da forma subclínica. São geralmente de longa duração, de alta CCS e são causados por micro-organismos que têm como habitat a própria glândula mamária e a pele dos tetos (JÚNIOR; BELOTI, 2012).

A mastite ambiental é causada por agentes cujo reservatório é o próprio ambiente onde há acúmulo de esterco, urina, barro e camas orgânicas. Esse tipo de mastite é caracterizado pela maior incidência da forma clínica da doença, geralmente de curta duração e com manifestação aguda (EMBRAPA, 2014; SANTOS; FONSECA, 2007).

A mastite provoca uma série de alterações físico-químicas no leite: modificações do pH (geralmente alcalino), diminuição do extrato seco total (caseína, gordura, lactose), aumento de minerais como sódio e cloro, diminuição do cálcio e fósforo, aumento de algumas enzimas (catalases, fosfatase ácida, entre outras), além de gerar problemas relacionados ao sabor (salgado), fermentações anormais, demora de coagulação, dificuldade de sinérese dos queijos, diminuição do rendimento, que constituem os principais defeitos tecnológicos observados na indústria, decorrentes do uso do leite mastítico (TRONCO, 2008).

O aumento da CCS favorece a diminuição no teor de gordura do leite, pois ocorre uma alteração na formação da membrana que envolve o glóbulo de gordura e este se torna mais susceptível a ação de enzimas lipolíticas. A

síntese de lactose também é reduzida devida, em parte, as lesões nas células alveolares, no entanto, outros fatores como a passagem de lactose para o sangue também podem estar envolvidos (COELHO et al., 2014).

O efeito da mastite sobre a concentração total de proteínas do leite é relativamente variável, uma vez que ocorre uma redução na síntese de proteínas nas células epiteliais (caseína, lactoalbumina e lactoglobulina) e um aumento do influxo de proteínas séricas (imunoglobulina e soroalbumina), proporcionando a manutenção do nível de proteína total. Entretanto a caseína é a proteína que apresenta menor redução em leites mastíticos (ALMEIDA et al., 2013; ELIAS et al., 2005)

Quanto aos minerais, ocorre um aumento nas concentrações de sódio e cloretos e uma redução nos níveis de cálcio, fosforo, magnésio e potássio (TRONCO, 2008).

As perdas econômicas, decorrente da mastite estão relacionadas principalmente à queda da produção de leite em função da mastite subclínica, custo dos casos de mastite clínica e descarte e morte prematura dos animais e os prejuízos da indústria por redução na qualidade e rendimento industrial de derivados lácteos (EMBRAPA, 2014).

O diagnóstico da mastite clínica é realizado por meio da observação de alterações no leite pelo teste do caneco de fundo escuro e pelos sinais visíveis na glândula como dor, edema, inchaço. Para o diagnóstico da forma subclínica da mastite são utilizados dois tipos de teste: o California Mastitis Test (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) (ALMEIDA, 2004).

### **3.3.3. Composição centesimal**

A composição centesimal do leite é outro parâmetro fundamental para caracterização da sua qualidade e é muito utilizado pela indústria de laticínios por ser fator decisivo no rendimento de produtos lácteos como: queijo, manteiga, leite em pó, creme de leite, requeijão e outros (LEITE, 2006).

O leite é composto por diversos tipos de moléculas, o que lhe confere um alto grau de complexidade, pois cada uma destas moléculas apresenta uma função específica, propiciando nutrientes ou proteção imunológica para o neonato (LEITE, 2001).

Em razão à sua diversidade de constituintes em meio aquoso o leite pode ser caracterizado como uma suspensão coloidal de micelas de caseína ligadas ao cálcio (Ca) e fósforo (P), emulsão de glóbulos de gordura e vitaminas lipossolúveis, solução de lactose, sais minerais e vitaminas hidrossolúveis (SANTOS & FONSECA, 2007).

O componente do leite que se apresenta em maior proporção é a água, sendo os demais formados principalmente por gordura, proteínas, carboidrato, todos sintetizados na glândula mamária. A composição média de um litro de leite de vaca esta especificada na Tabela 2:

Tabela 2 - Composição centesimal do leite.

<b>Constituinte</b>	<b>Teor (g/Kg)</b>	<b>Variação (g/Kg)</b>
Água	873	855-887
Lactose	46	38-53
Gordura	39	24-55
Proteínas	32,5	23-44
Substâncias Minerais	6,5	5,3-8,0
Ácidos orgânicos	1,8	1,3-2,2
Outros	1,4	-

Fonte: Adaptado de Walstra e Jennes, 1984.

. A gordura é o constituinte que mais sofre variações em razão de alimentação, raça, estação do ano e período de lactação e está presente principalmente na forma de triglicerídeos e corresponde a aproximadamente 98 % da gordura do leite. Os 2% consistem em diglicerídeos, monoglicerídeos, colesterol, fosfolipídios, ácido graxo livre e outros (WALSTRA; JENNESS, 1987; SILVA, 1997).

A gordura está presente na forma de glóbulos, constituídos por um núcleo, composto principalmente de triglicerídios, protegido por uma membrana lipoprotéica, sendo que a maioria dos ácidos graxos encontrados, saturados e insaturados, contém de 2 a 20 átomos de carbono em suas cadeias. Outros

lipídios presentes incluem fosfolipídios, colesterol, ácidos graxos livres, mono e diglicerídios (COSTA; JIMÉNEZ-FLORES; GIGANTE, 2009).

O leite de vaca possui aproximadamente 440 ésteres de ácidos graxos e os principais são o ácido palmítico e o ácido oleico. A gordura é o constituinte que mais sofre variações em razão de alimentação, raça, estação do ano e período de lactação. As vantagens nutritivas da gordura do leite é o fornecimento de energia ao filhote (SILVA, 1997).

A porção proteica do leite bovino contém cerca de 80% de caseína e 20% de proteínas do soro. A micela de caseína é constituída por quatro frações principais de proteína:  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína, representando cerca de 40%, 10%, 35% e 15%, respectivamente, as quais são constituídas por 199, 207, 209 e 169 resíduos de aminoácidos, com massas moleculares de 23, 25, 24 e 19 kDa, respectivamente (VEGA, 2009). Além disso, cerca de 6% da massa, em base seca, da micela de caseína é composta por fosfato de cálcio coloidal (DALGLEISH, 2011).

As proteínas do soro do leite apresentam uma estrutura globular contendo pontes de dissulfeto, que conferem certo grau de estabilidade estrutural. As frações, ou peptídeos do soro, são constituídos de: beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glico-macropéptídeos (GMP). (HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006).

A lactose é o açúcar exclusivo do leite e é um dissacarídeo redutor formado por uma molécula de glicose e outra de galactose onde se encontra em solução no leite. Esta proporciona ao leite um sabor adocicado e constitui a principal fonte de carbono da maioria dos micro-organismos que se multiplicam no leite (GUIZANI, 2007; WALSTRA; JENNESS, 1987).

Os minerais do leite são principalmente sais inorgânicos, onde uma parte se encontra ionizada e outra em forma de sais complexos. Nem todos os sais encontram-se em solução, as micelas de caseína contêm fosfato de cálcio não dissolvido e traços de citrato, o primeiro se denomina de fosfato de cálcio coloidal. Alguns cátions como o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Mg}^{2+}$  se associam às proteínas

carregadas negativamente, também podem ser encontradas pequenas quantidades de outros íons, como  $Cl^-$ . Quase todos os sais do leite se encontram no soro e nas micelas de caseína e uma quantidade mínima unida aos glóbulos de gordura. O leite possui ainda na composição fósforo, na forma de ortofosfato e enxofre (WALSTRA; JENNESS, 1987).

A composição do leite pode variar de acordo com a estação do ano; raça, idade, e número de lactações do animal; com o tipo de alimentação fornecida ao animal; e principalmente com a saúde do animal (NORO et al., 2006).

### **3.3.4 Contagem celular diferencial (CCD)**

O perfil celular do leite é determinado por vários fatores, dentre eles número de lactações, condições climáticas, raça e idade do animal, época do ano, manejo e nutrição, porém a mastite é considerada o principal fator que eleva e modifica o nível de células do leite (MIRA; SOUZA; BLAGITZ, 2013).

Na glândula mamária saudável, o tipo de célula predominante são macrófagos (35-79%), seguida por linfócitos (16-28%), leucócitos polimorfonucleares (PMNL) (3-26%) e células epiteliais (2-15%) (LINDMARK-MÅNSSON et al., 2006).

Os métodos comumente utilizados para CCS não permitem a diferenciação celular, somente a contagem. Entretanto, a percentagem de cada tipo celular é uma ferramenta valiosa na detecção de doenças infecciosas como a mastite (PØDENPHANT et al., 2014).

A contagem celular diferencial é considerada uma técnica emergente na identificação precoce de processos inflamatórios na glândula mamária de bovinos. Ainda que possua alto custo e a necessidade de mão de obra capacitada, a técnica é rápida, automática e utiliza um grande número de células por amostra, sendo menos trabalhosa que a citologia convencional (PIEPERS et al., 2009; (BLAGITZ et al., 2015; PILLA et al., 2013).

)

A CCD, assim como a CCS e CBT é baseada na citometria de fluxo e favorece o estudo de uma linhagem celular específica em um meio contendo tipos celulares diferentes, permitindo a diferenciação e quantificação das células por meio da sua complexidade, além de analisar a intensidade de fluorescência (NAKAGE et al., 2005).

As células em suspensão são introduzidas no centro de uma câmara de fluxo que se encontra preenchida por um fluido envolvente (*sheathfluid*) que apresenta velocidade superior a da amostra. Por meio de um fenômeno físico designado focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas a moverem-se em um fluido laminar, uma a uma, no centro do fluxo. Cada partícula suspensa intersecta um feixe de luz, proveniente de uma ou mais fonte de iluminação (laser(s)) (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

Cada célula é avaliada com relação ao tamanho (dispersão de luz anterior) e granulosidade (dispersão de 90°) e pela intensidade de fluorescência para detecção de antígenos de superfície diferentes (imunofenotipagem). A vibração do fluxo celular provoca o rompimento em gotículas que podem ser carregadas eletricamente e, a partir daí, dirigidas por placas de deflexão eletromagnética para serem coletadas em diferentes populações celulares de acordo com os parâmetros medidos, sob controle de um computador (NAKAGE et al., 2005).

A combinação da luz dispersa e fluorescente é ajustada pelos detectores e por meio da análise das flutuações de brilho de cada detector é possível conhecer informações sobre a estrutura física e química de cada partícula individual. FSC, (“Forwardscatter – FSC”), correlaciona-se com o volume celular e SSC, (“SideScatter – SSC”), é dependente da complexidade interna da partícula (forma do núcleo, quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e rugosidade da membrana) (LOUREIRO; SANTOS, 2004).

A CCD por meio da citometria de fluxo detecta mudanças relativas nas proporções de células, que podem ser usados para diferenciar a glândula saudável de uma glândula inflamada ou infectada (MATTAR et al., 2010; PILLA et al., 2013).

### 3.4. ATP-bioluminescência

Nas últimas décadas, a técnica de ATP-bioluminescência tem se destacado em várias áreas, incluindo a área de processamento de alimentos (ANDRADE, 2008). Sua origem é baseada no fenômeno da bioluminescência, ou seja, na emissão de luz visível derivada da liberação química de fótons produzidos por diversos organismos; marinhos (peixes, moluscos e cnidários) e terrestres (fungos, bactérias e insetos) (FRAGA, 2008).

Adenosina trifosfato (ATP) é o principal fornecedor de energia para todos os organismos vivos, independentemente da sua fonte, seja por oxidação química ou a captura de luz, exigido para a manutenção de processos vitais da célula (SHAMA; MALIK, 2013).

Para que a reação de ATP-bioluminescência (Figura 1) ocorra é necessário um complexo genericamente conhecido como luciferina-luciferase na presença de moléculas de ATP (adenosina trifosfato) (OLIVEIRA et al., 2013).



Figura 1 - Reação de ATP-bioluminescência na presença de luciferina-luciferase.

O ATP é um nucleotídeo utilizado pelas células como fonte energética, sendo sua quantidade geralmente constante, desaparecendo 2 h após a morte celular. O uso desta molécula para medir a qualidade bacteriológica fundamenta-se no fato de que todas as células vivas contêm ATP, o que não ocorre com células não viáveis e esporos bacterianos por serem metabolicamente inertes. Como as moléculas de ATP estão presentes em quaisquer células vivas, a técnica é capaz de detectar o ATP presente em micro-organismos, resíduos de sangue, pele, vegetais, entre outros materiais (ANDRADE, 2008; 3M DO BRASIL LTDA.; CUNHA et al., 2013.)

O complexo enzimático, luciferina-luciferase, é extraído de insetos da ordem *Coleóptera*, sendo as famílias *Phengodidae*, *Elateridae*, *Lampyridae* as mais representativas. Os insetos das últimas duas famílias, respectivamente, são comumente conhecidos como vaga-lumes e emite luz variando de 460 nm a 650 nm, requerendo energia de ativação em torno de 40-70 Kcal (PRADO,2012).

Na visão química, o substrato usado na reação de ATP-bioluminescência é a D-luciferina, um composto benzotiazólico comum às espécies de lampirídeos, elaterídeos e fengodídeos. A luciferase catalisa a oxidação da luciferina na presença de ATP,  $Mg^{2+}$  e  $O_2$ , produzindo luz em uma reação de duas etapas (McELROY, 1978).

Na primeira etapa a luciferina é adenilada através de ATP formando adenilato de luciferina com a liberação de pirofosfato (Figura 2A). Na segunda etapa, o adenilato de luciferina é oxidado (Figura 2B) produzindo uma dioxetanona que rapidamente se cliva gerando dióxido de carbono e oxiluciferina em um estado singlete (Figura 2C) eletronicamente excitado que decai emitindo um fóton de luz visível (Figura 2D) (PRADO,2012; DAY, et al., 2004).

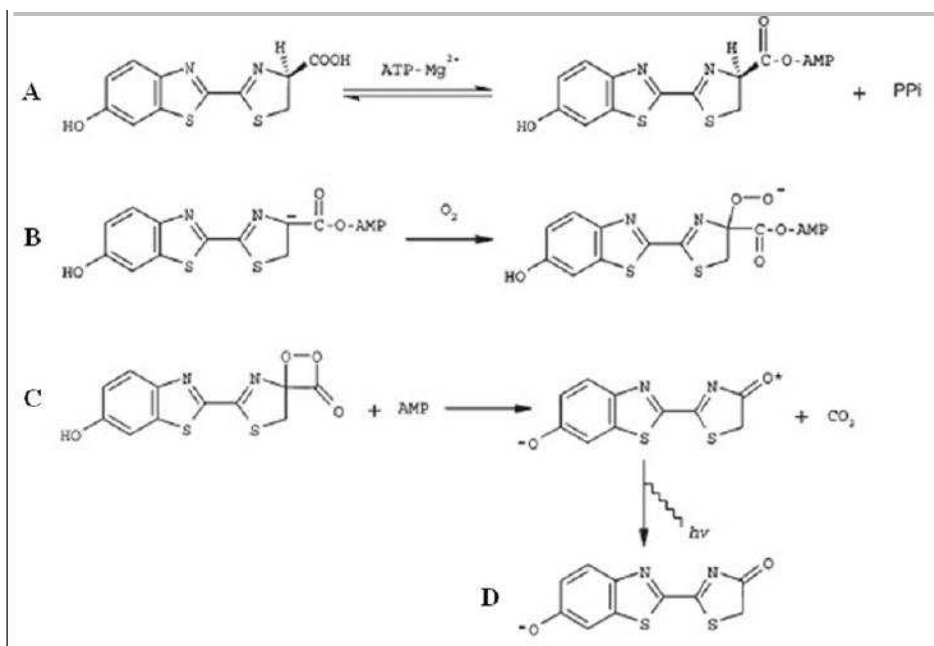


Figura 2 - Etapas da reação bioluminescente catalisada pela luciferase de coleópteros. (A) Inicialmente, a luciferina, ATP-Mg<sup>2+</sup> e luciferase formam um

complexo ternário levando a adenilação da luciferina (adenilato de luciferina) e liberação de pirofosfato, (B) em seguida este adenilato de luciferina é oxidado, (C) levando a formação de um peróxido cíclico que se cliva com a formação de CO<sub>2</sub> e oxiluciferina excitada, (D) que decai emitindo um fóton de luz visível (Fonte: DAY, et al., 2004).

Na indústria de alimentos, a técnica de ATP-bioluminescência tem sido utilizada para avaliar as condições microbiológicas de carnes, leite cru, além de verificar a qualidade da higienização das superfícies, utensílios e equipamentos utilizados durante as etapas de processamento dos produtos (BELL et al., 1996; BÜLTE; REUTER, 1985).

Devido aos rápidos resultados, o uso da técnica de ATP-bioluminescência permite tomar uma medida corretiva imediata no caso de um resultado inaceitável. As superfícies podem ser limpas novamente antes da utilização, assegurando um bom saneamento e o controle da contaminação (3M do BRASIL LTDA).

A ATP bioluminescência fornece estimativas em tempo real de contaminação de superfície total. Esta técnica tem se mostrado particularmente útil em grandes fábricas onde o monitoramento regular e frequente pode fornecer gestão com dados sobre a evolução dos níveis de higiene, proporcionando resultados rápidos (CARRASCOSA et al., 2012).

Vários estudos foram realizados comparando os métodos tradicionais com a técnica de ATP-bioluminescência. Oliveira & Canettieri (2010), avaliaram a relação entre os métodos quantitativos microbiológicos (contagem padrão em placas, placas RODAC®) e a técnica de ATP-bioluminescência e obtiveram uma relação positiva entre as técnicas, assim como PIRES et al. (2005) que avaliaram as condições higiênico-sanitárias de fatiadores de frios (OLIVEIRA; CANETTIERI, 2010; PIRES et al., 2005).

Na indústria de laticínios, o uso da técnica de ATP-bioluminescência foi empregado a fim de avaliar as condições dos tanques de transporte de leite (BELL et al., 1994); superfícies de aço inoxidável que entram em contato com o produto (COSTA et al., 2006); condições microbiológicas do leite cru

(CĂPRIȚĂ; CĂPRIȚĂ, 2008) e também para a eficiência da higienização do úbere de vacas durante a ordenha (FINGER; SISCHO, 2001).

A aplicação da ATP-bioluminescência em hospitais também tem sido reportada em diversos estudos. Lewis et al. (2008), avaliaram a eficiência da higienização de locais e superfícies de hospitais que entram em contato constante com pacientes e funcionários, como por exemplo, cama, maçanetas, porta-toalhas e outros e obtiveram resultados satisfatórios (LEWIS et al., 2008).

Ferreira et al. (2011) também aplicaram a técnica para verificar a contaminação microbiológica de superfícies de leitos de tratamento intensivo em hospitais brasileiros.

Ainda que a ATP-bioluminescência não identifique e diferencie a quantidade de micro-organismos ou as espécies contaminantes, a técnica é utilizada como um meio para o controle e verificação da higiene em superfícies e em amostras de água (CARRASCOSA et al., 2012; COSTA et al., 2006; SHAMA; MALIK, 2013).

O princípio da técnica consiste na extração de ATP oriundo de superfície ou de amostra líquida, utilizando para isto um kit contendo um *swab* e agentes químicos. O *swab* contendo a amostra é colocado em contato com o complexo enzimático luciferina/luciferase ocorrendo a reação de bioluminescência com a emissão de luz. Para a leitura de emissão de luz é necessário um fotômetro simples, denominado luminômetro (Figura 3).



Figura 3 - Luminômetro modelo Clean Trace 3M.

O luminômetro converte a luz emitida em unidade relativa de luz (URL), sendo que para cada molécula de ATP um fóton de luz é emitido (GRIFFITHS, 1993; VELÁSQUEZ e FEIRTAG, 1997).

Em relação à sensibilidade dos luminômetros comumente utilizados, é exigido um número mínimo entre  $10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup> e  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> para que a presença de ATP seja detectada. O conteúdo intracelular de ATP em todas as bactérias é em média 1 fentograma ( $10^{-15}$ g) de ATP por bactéria, podendo variar de 0,1 a 5,5 fentogramas. (COSTA et al., 2006; SIMM et al., 2008).

O conteúdo de ATP celular é influenciado por diversos fatores tais como: fase do crescimento celular, onde há baixo conteúdo na fase estacionária em relação às outras fases; mudanças na taxa metabólica; situações subótimas e de estresse; pela maneira de extração do próprio nucleotídeo (CARRICK et al., 2001).

Por ser uma reação enzimática, a técnica de ATP-bioluminescência é afetada por parâmetros como pH e temperatura. O pH ótimo da reação é de 7,75 e a temperatura ótima é de 25 °C. Valores acima ou abaixo destes podem

inativar a luciferase ou retardar a velocidade da reação. Além desses parâmetros, a turbidez e a cor, no caso de análise de amostra líquida, podem influenciar diretamente os resultados (SHAMA; MALIK, 2013).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Seleção dos animais**

Foram utilizadas amostras de leite cru de 15 animais, selecionados ao acaso, provenientes do rebanho leiteiro do estábulo do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

A propriedade possui cerca de 90 vacas das raças Holandesa e Pardo-Suíço. A sala de ordenha é do tipo espinha de peixe, duplo 6, com sistema de ordenha mecânica e canalizado. A ordenha é realizada 2 vezes por dia, com intervalo de 9 horas. O manejo da ordenha é compreendido de quatro etapas: pré-dipping, teste da caneca para identificação de mastite clínica, ordenha e pós-dipping.

O período de realização das coletas foi de abril a junho de 2015. As amostras de leite foram coletadas de vacas de diferentes raças, idades e estágio de lactação.

Os animais foram mantidos durante este período sob o manejo correspondente da propriedade e foi feito o acompanhamento da sanidade e dos tratamentos quando necessários, dos animais selecionados.

### **4.2. Amostragem**

A coleta das amostras de leite foi realizada uma vez por mês, durante os três meses do experimento, na segunda ordenha do dia.

Inicialmente, foi realizada a higienização dos tetos utilizando solução à base de iodo. Logo após, os primeiros jatos de leite foram descartados e coletaram-se amostras compostas (dos quatro quartos mamários) de leite de cada vaca para contagem bacteriana total (CBT), composição centesimal,

contagem de células somáticas (CCS), contagem celular diferencial (CCD) e contagem de ATP.

#### **4.2.1 Contagem de células somáticas (CCS) e composição centesimal**

As amostras de leite cru para análise de CCS e composição centesimal foram coletadas em frascos plásticos com capacidade de 50 mL, contendo uma pastilha de 10 mg de Bronopol® (Figura 4), devidamente identificadas com o número do animal e data da coleta.



Figura 4 - Frasco plástico com um comprimido de Bronopol®, utilizado para coleta destinada a análise de CCS e composição centesimal.

As amostras foram acondicionadas em uma caixa isotérmica e enviadas para o Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), certificado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Para a contagem de células somáticas foi utilizado o equipamento SomaScope (Delta Instruments®) (Figura 5), que tem como princípio a citometria de fluxo.



Figura 5 - Equipamento SomaScope, utilizado para contagem de células somáticas e determinação da composição centesimal das amostras de leite

A análise da composição centesimal foi realizada no equipamento infravermelho LactosScopeFTIR (Delta Instruments®) que é acoplado ao equipamento para CCS. Ambas as análises foram realizadas no LabUFMG.

#### 4.2.2. Contagem bacteriana total (CBT)

As amostras para CBT foram coletadas em frascos plásticos esterilizados com capacidade de 50 mL, contendo uma pastilha de 10 mg de Azidiol (Figura 6), devidamente identificadas com o número do animal e data da coleta.



Figura 6 - Frasco plástico esterilizado com um comprimido de Azidiol, usado para coleta de leite destinado a análise de CBT.

As amostras foram acondicionadas em uma caixa isotérmica, juntamente com as amostras para CCS e composição centesimal e também foram enviadas para Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG).

Para a contagem bacteriana total foi utilizado o equipamento BactoScan™ FC<sup>+</sup> (Foss Electric®) que também possui como princípio a citometria de fluxo (Figura7).



Figura 7 - Equipamento BactoScan™ FC<sup>+</sup> para contagem bacteriana total.

#### **4.2.3 Contagem celular diferencial (CCD)**

A separação das células do leite foi feita de acordo com Koess e Hammam (2008) com adaptações. Inicialmente 10 mL de leite foram centrifugados a 1000 g durante 15 min. Após a centrifugação, a camada de creme formada e o sobrenadante foram descartados, restando o sedimento de células no fundo do tubo.

Em seguida, foram adicionados 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS) e as células foram novamente centrifugadas a 400 g durante 10 min com o intuito de lavá-las minimizando a influência de resíduos, principalmente de gordura. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspensionado em 5 mL de PBS. Foi retirado 1 mL desta suspensão celular e levado para contagem.

A contagem celular diferencial foi feita por meio do citômetro de fluxo BDFACS Verse™ (BDBioscences ®) (Figura8). A aquisição das amostras foi realizada em velocidade alta (120µL/min), durante 1 min e com 250.000 eventos previamente determinados.



Figura 8 - Citômetro de Fluxo BDFACSVerse™, utilizado para CCD e análise do perfil celular das amostras de leite cru.

Não foi empregado nenhum tipo de anticorpo e marcador de DNA. Os tipos celulares, macrófagos e linfócitos, foram localizados apenas pelas características celulares: tamanho e granulosidade (SSC x FSC). A análise foi realizada no Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa.

Os dados obtidos da leitura da citometria de fluxo foram analisados pelo software FlowJo vX.07 (Versão 1.6 para Windows). Foram excluídos os eventos abaixo de 50 K (FSC-A).

#### **4.2.4 Análise por ATP-bioluminescência**

##### **4.2.4.1. Leite cru**

A determinação de ATP foi realizada utilizando um kit de avaliação de ATP em amostras líquidas (3M Clean-Trace™ Water Total ATP) (Figura9).



Figura 9 - Kit para contagem de ATP total em amostra líquida.

Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de leite foi diluída em 1 mL de solução salina 0,85 %. Com o auxílio do swab, foi recolhida uma alíquota desta solução, aproximadamente 0,1 mL, que foi novamente introduzida na cápsula que contém os reagentes para a emissão de luz. A leitura da emissão de luz foi obtida por meio do luminômetro (UNI-LITE®Xcel (Biotrace®) (Figura 10). Os resultados foram expressos em URL (unidade relativa de luz).



Figura 10 - Luminômetro UNI-Lite®.

#### 4.2.4.2 Equipamentos da ordenha e mão de manipuladores.

Foram colhidas por meio de um kit de avaliação de ATP em superfícies (3M Clean-Trace™ Surface ATP) (Figura 11) amostras dos seis conjuntos de teteiras do estábulo da Universidade Federal de Viçosa e da mão direita de quatro manipuladores da ordenha.



Figura 11 - Kit para contagem de ATP total em superfície

A metodologia para teteiras foi adaptada de Carrascosa e colaboradores (2012). Foram colhidas amostras das teteiras posterior esquerda e anterior direita dos seis conjuntos de teteiras do estábulo.

Os swabs foram friccionados no interior dos bocais das teteiras, por toda extensão que entra em contato com o teto do animal, no sentido anti-horário, num total de dez voltas partindo do mesmo ponto de onde o swab foi introduzido pela primeira vez (Figura 12).



Figura 12 - Movimento anti-horário com o swab para coleta de amostras das teteiras.

Foram coletadas amostras da mão direita de dois manipuladores da ordenha do estábulo do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Para as mãos de manipuladores, a coleta das amostras foi correspondente à área das superfícies das palmas e bordas das mãos, partindo da região dos punhos (Figura 13).

De forma angular, o swab foi passado com movimentos giratórios da parte inferior das palmas até a extremidade dos dedos e voltando ao punho, repetindo três vezes o movimento. (ANDRADE, 2008).

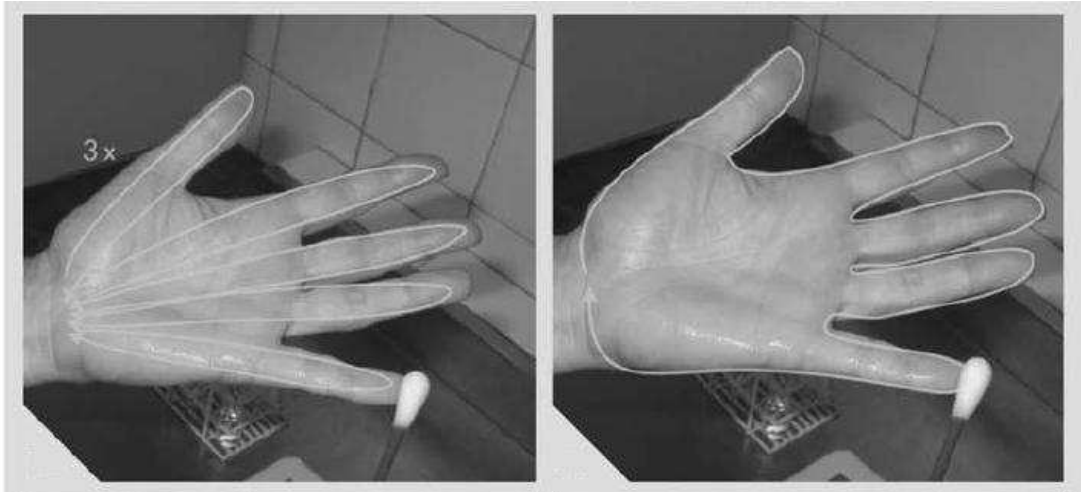


Figura 13 - Movimento realizado com swab para coleta da amostra das mãos de manipuladores. (Fonte: Andrade, 2008).

Em seguida os swabs, tanto os com amostras para teteiras quanto os das mãos de manipuladores, foram reintroduzidos em suas correspondentes cápsulas e realizou-se a leitura da emissão de luz no luminômetro (UNI-LITE®Xcel (Biotrace®)).

#### 4.2.5. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, foram empregados diferentes procedimentos do Programa Statistical Analysis System –SAS/2015- licenciado para Universidade Federal de Viçosa:

- ✓ Para a avaliação da qualidade das amostras de leite cru, as variáveis dependentes relacionadas (Gordura, Proteína, Lactose, Sólidos totais, CBT e CCS), em delineamento inteiramente casualizado, foram submetidas a análise de variância univariada e comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de confiança de 95 % ( $P < 0,05$ ).
- ✓ Foi realizada análise de correlação linear simples de CCS e de ATP com as variáveis da qualidade do leite (GORD, PROT, LACT, ST, CBT, CCS). Também foi efetuada análise de correlação linear simples de CCD com as variáveis celulares do leite (CCS, ATP).

- ✓ O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida de associação linear entre duas variáveis. Os valores deste coeficiente variam de -1 a 1. O sinal do coeficiente indica a direção da relação e seu valor absoluto, a intensidade desta relação. Valores absolutos maiores significam relação mais “forte” entre as variáveis.
- ✓ A fim de prever a relação entre ATP e variáveis resposta CCS e CBT, foi realizada análise de regressão não linear. Os parâmetros de ATP considerados para ambas as regressões foram:  $b_0=4$ ;  $b_1=4$ ;  $\text{int}=4,1$ .

## 5. Resultados e Discussão

Os dados de CBT, CCS, CCD e ATP obtidos neste trabalho, apresentaram alta variabilidade, não seguindo uma distribuição normal, apresentando valores extremos e dispersão de dados, portanto para auxiliar as comparações e análises de CBT, CCS, CCD e ATP, tais dados foram submetidos à transformação logarítmica na base 10 ( $\log X$ ), a fim de obter uma distribuição normal e homocedástica. Assim, os resultados foram expressos da seguinte forma:

- **$\text{CCS} = \log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$**
- **$\text{CBT} = \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$**
- **$\text{ATP} = \log \text{ URL} \cdot \text{mL}^{-1}$**
- **$\text{CCD} = \log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$**

Foi encontrado resultado zerado em aproximadamente 53% (8/15) dos dados de CCS, assim somou-se uma unidade a todos os valores de resposta medidas de CCS:

- **$\text{CCS} = (0 + 1) \times 10^3 = 1000 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$**

Com o intuito de auxiliar a análise dos resultados os dados de CCS foram divididos em três classes, determinados de acordo com os valores regulatórios exigidos pela IN 62. As classes avaliadas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Divisão das classes de CCS (contagem de células somáticas) de acordo com os valores estabelecidos pela IN 62.

<b>Classes de CCS</b>	<b>CCS (cel·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>CCS (log cel·mL<sup>-1</sup>)</b>
Baixa (n=9)	$\leq 1,0 \times 10^5$	$\leq 5$
Média (n=2)	$1 \times 10^5 < \text{CCS} \leq 5 \times 10^5$	$5 < \log \text{cel} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 5,7$
Alta (n=4)	$> 5 \times 10^5$	$> 5,7$

### 5.1. Qualidade das amostras de leite cru

Neste trabalho, referente à CCS, observou-se que da totalidade das amostras de leite cru (n=15), nove amostras apresentaram log de cel·mL<sup>-1</sup> ≤ 5,0, duas apresentaram log de cel·mL<sup>-1</sup> entre 5,0 a 5,7 e quatro apresentaram log cel·mL<sup>-1</sup> > 5,7 indicando aproximadamente uma prevalência de 27% (4/15) de vacas com mastite no rebanho estudado (Tabela 4).

Tabela 4 - Média (n=5) do logaritmo da contagem de células somáticas (log cel·mL<sup>-1</sup>) e do logaritmo da contagem bacteriana total (log UFC·mL<sup>-1</sup>) de 15 amostras de leite cru.

<b>Animais</b>	<b>CCS</b>	<b>CBT</b>
1	3,00	4,30
2	3,00	4,00
3	4,73	4,00
4	3,00	4,00
5	3,00	3,30
6	3,00	4,30
7	3,00	4,20
8	3,00	4,40
9	3,00	3,70
10	5,17	3,80
11	5,70	3,60
12	5,82	5,10
13	6,17	4,10
14	6,53	5,20
15	7,11	6,60

Os resultados para análise microbiológica, demonstraram que 93% (14/15) das amostras de leite cru apresentaram valores de CBT abaixo do limite atualmente estabelecido pela IN 62 (log UFC·mL<sup>-1</sup> ≥ 5,5 ), vigente nas

regiões Sudeste, Sul e Centro-oeste até 30/06/2016 e nas regiões Norte e Nordeste até 30/06/2017, indicando qualidade microbiológica satisfatória das amostras de leite cru (Tabela 4) (BRASIL, 2011).

Quanto à avaliação da qualidade do leite cru em relação aos requisitos químicos mínimos exigidos na legislação, os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Estatística descritiva dos valores percentuais da média, mínimos, máximos, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV) e valores mínimos exigidos pela legislação dos teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais nas amostras de leite cu.

<b>Variável</b>	<b>Legislação (% mínima)</b>	<b>Média (%)</b>	<b>Mínimo (%)</b>	<b>Máximo (%)</b>	<b>DP (%)</b>	<b>CV (%)</b>
Proteína	2,9	3,26	2,56	4,49	0,46	14,21
Gordura	3,0	2,93	1,29	4,58	1,00	34,16
Lactose	4,3	4,54	4,03	5,01	0,32	6,98
Sólidos Totais	11,4	11,69	9,43	13,48	1,22	10,47

Nota-se que no geral, a média percentual dos componentes químicos do leite apresentou-se acima dos limites exigidos pela legislação. Os valores médios globais da composição química do leite no rebanho estudado foram de 3,26% de proteína, 2,93% de gordura, 4,54% de lactose e 11,69% de sólidos totais (Tabela 5). Entretanto, somente a média percentual de gordura (2,93%) obteve valor ligeiramente abaixo do valor mínimo exigido por lei (3%) (MAPA, 2005; BRASIL, 2011).

A variabilidade dos componentes do leite proveniente de vacas saudáveis é muito bem definida e dependem de fatores intrínsecos como saúde, raça, individualidade e idade do animal; e de fatores extrínsecos como alimentação, número de ordenhas e estação do ano, entretanto a relação da

variação dos componentes do leite com o aumento da CCS não está totalmente elucidada (GIGANTE, M.L., COSTA, 2008).

Existem relatos na literatura, de aumento, redução e não alteração do teor desses constituintes frente às diferentes faixas de CCS.

Referente ao teor de proteína total do leite, Noro *et al.* (2006), Mazel *et al.* (2007) e Fernandes *et al.* (2007) relataram que o aumento na CCS, reflete diretamente na concentração de proteína total do leite

Outros autores também observaram um aumento na concentração de proteína total com a elevação da CCS no leite cru (BUENO *et al.*, 2008; VARGAS, 2014). Sendo assim, os estudos reportados são compatíveis com os resultados encontrados neste trabalho, em que, observou-se a elevação significativa ( $P < 0,05$ ) no teor de proteína com o incremento da CCS (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias dos teores (%) de proteína (Prot.), gordura (Gord), lactose (Lact), sólidos totais (ST), CBT ( $\log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e Volume de leite por vaca (L) em função das três diferentes classes de CCS.

<b>Classes CCS</b>	<b>Prot</b>	<b>Gord</b>	<b>Lact</b>	<b>ST</b>	<b>CBT</b>	<b>Volume</b>
Baixa	3,13 <sup>a</sup>	3,10 <sup>a</sup>	4,7 <sup>a</sup>	11,61 <sup>a</sup>	4,02 <sup>a</sup>	24,77 <sup>a</sup>
Média	3,17 <sup>ab</sup>	3,35 <sup>a</sup>	4,27 <sup>ab</sup>	11,42 <sup>a</sup>	3,69 <sup>a</sup>	14,70 <sup>a</sup>
Alta	3,74 <sup>b</sup>	2,33 <sup>a</sup>	4,21 <sup>b</sup>	11,97 <sup>a</sup>	5,27 <sup>b</sup>	19,18 <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey

Possivelmente, a explicação para o aumento do nível de proteína (Tabela 6) das amostras estudadas, está relacionada com a elevação da CCS, que promove alteração da permeabilidade dos capilares sanguíneos favorecendo o influxo de proteínas séricas (albumina sérica e imunoglobulinas) para o interior da glândula mamária e simultaneamente pode ocorrer diminuição da síntese de proteínas nas células epiteliais (caseína, lactoalbumina e lactoglobulina) (CUNHA *et al.*, 2008; OLIVEIRA; TIMM, 2006).

Entretanto, alguns estudos apontam que em animais com altas contagens de células somáticas, a porção de caseína é diminuída. Segundo Oliveira *et al.* (2006), a redução da fração de caseína é favorecida pela degradação enzimática de proteases bacterianas e leucocitárias, deste modo, no leite com elevada CCS, ocorre um aumento da atividade enzimática, promovendo maior ativação do plasminogênio em plasmina que intensifica a proteólise, principalmente na caseína e, mais especificamente, na  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ S2-caseína, alterando a composição proteica do leite e diminuindo o rendimento na fabricação de queijo. Além disso, a proteólise favorece o acúmulo de pequenos peptídeos, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento de sabor amargo e adstringente no leite (VARGAS *et al.*, 2014).

Assim como para proteína, a variação no teor de gordura com a elevação das faixas de CCS não é totalmente compreendida. Nesta pesquisa, observou-se que o teor de gordura não foi significativamente afetado ( $P < 0,05$ ) pelo aumento de CCS no leite (Tabela 6).

Divergindo dos resultados obtidos, Rangel *et al.* (2009) e Pereira *et al.* (2003), encontraram um acréscimo no teor de gordura do leite, que segundo Machado *et al.* (2001), pode ser favorecido pela redução na produção do leite, que é bem mais acentuada do que a redução da síntese de gordura, provocando a concentração da mesma. Todavia, Andrade *et al.* (2009), observaram a redução na concentração de gordura com a elevação de CCS, o que pode ter relação com a diminuição da sua síntese, uma vez que o epitélio da glândula mamária foi afetado pela mastite (CHEN *et al.*, 2003; HANUS *et al.*, 2008; VARGAS *et al.*, 2014)

Alterações no teor de lactose também foram observadas neste estudo. Houve redução significativa no teor de lactose ( $P < 0,05$ ) com a elevação de CCS (Tabela 6), observando-se diferença de 0,49% da classe Baixa ( $\log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 5$ ) para classe Alta ( $\log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1} \geq 5,7$ ), corroborando com os resultados obtidos de Bueno *et al.* (2008) e Vargas *et al.* (2014).

O decréscimo no teor de lactose, à medida que se elevaram os valores de CCS, possivelmente é resultante, em parte, das lesões nas células

alveolares devido à mastite, levando a menor biossíntese desse constituinte, no entanto, outros fatores também podem estar envolvidos, como por exemplo, a perda da lactose para corrente sanguínea que é favorecida pelo aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue (LEITNER; MERIN; SILANIKOVE, 2004)

Ainda, a infecção da glândula mamária pode contribuir de forma importante para elevação da contaminação bacteriana do leite e a diminuição dos teores de lactose pode ocorrer por ação direta desses patógenos mamários que utilizam esse carboidrato como principal substrato (VARGAS et al., 2014).

Portanto, variações nos componentes químicos do leite necessariamente não devem ser consideradas favoráveis, pois a elevação simultânea da CCS salienta a presença de inflamação na glândula mamária do animal (MACHADO et al., 2000; VARGAS et al., 2014).

Avaliando a CCS e seus efeitos nos constituintes do leite, notou-se que os valores de proteína e CBT apresentaram correlação positiva, ao passo que a lactose apresentou correlação negativa com a CCS (Tabela 7). No entanto, não houve correlação significativa entre CCS, gordura e sólidos totais (Tabela 7).

Tabela 7 - Coeficiente de correlação (r) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) dos teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais e logaritmo da contagem bacteriana total (CBT) com o logaritmo da contagem de células somáticas (CCS).

Variável	CCS (log cel·mL <sup>-1</sup> )	
	r <sup>(1)</sup>	R <sup>2</sup> (2)
Proteína (%)	0,501*	0,251
Gordura (%)	-0,282 <sup>ns</sup>	0,079
Lactose (%)	-0,737**	0,543
Sólidos Totais (%)	0,120 <sup>ns</sup>	0,014
CBT( log UFC·mL <sup>-1</sup> )	0,582*	0,338

<sup>ns</sup> Não significativo; \* P<0,05; \*\* P<0,01

<sup>1</sup> Coeficiente de correlação linear simples

<sup>2</sup> Coeficiente de determinação

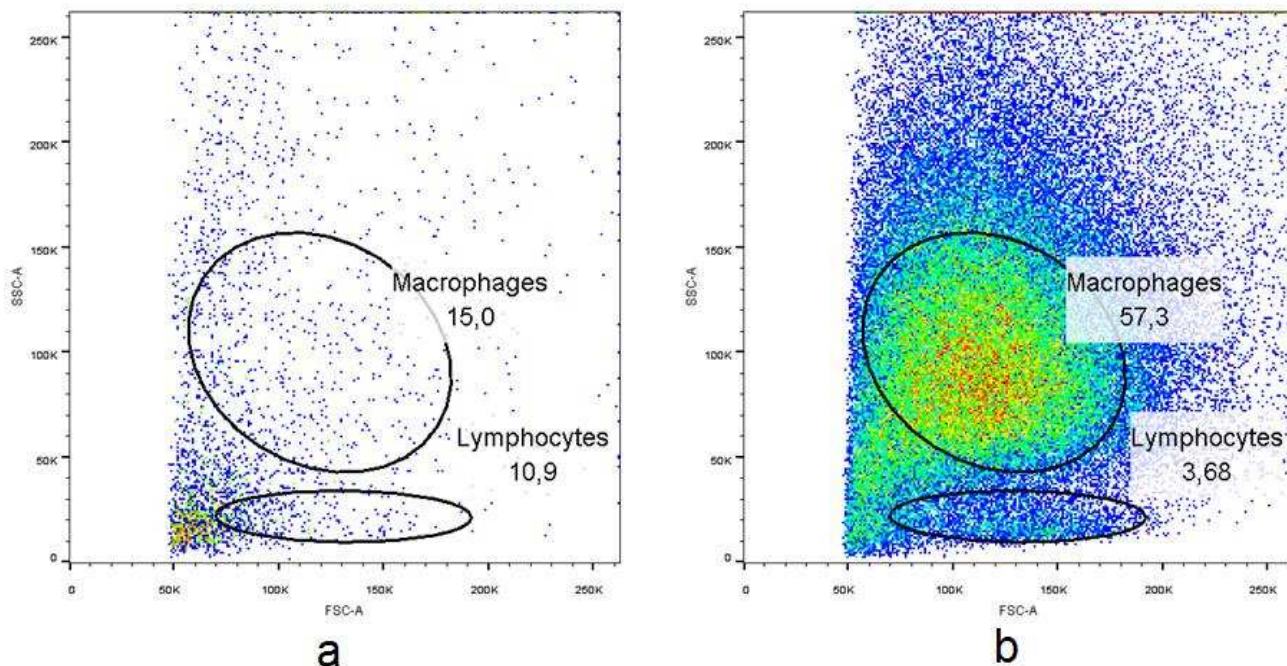
A variação dos constituintes em função da CCS atingiu no máximo 54,3% para lactose, seguido de 33,8% para CBT e 25,1% para proteína (Tabela 7).

A diminuição no teor de lactose com o aumento da CCS pode ser justificada pela perda de lactose da glândula mamária para o sangue, devido a mudanças na permeabilidade da membrana separatória. Além disso, a lactose é o mais importante constituinte osmótico do leite, por estar associada à secreção de água e ao volume de leite produzido (EIFERT et al., 2006).

Em relação ao perfil celular das amostras estudadas, foi possível observar que a contagem celular diferencial obteve boa correlação=0,83; ( $P<0,001$ ) com a CCS. Gunaskera et al. (2003), também obtiveram correlação positiva ( $r=0,98$ ) entre a CCS pelo método de contagem celular diferencial e pelo uso do equipamento *Fossomatic 400*, similar ao *SomaScope* utilizado nesse trabalho, em que ambos fazem a contagem de células somáticas (GUNASEKERA, 2003).

Observa-se na Figura 14 a diferença na densidade e nos tipos celulares entre duas das 15 amostras de leite estudadas. A amostra referente ao gráfico (a) é proveniente de um animal que apresentou valor baixo para  $\log \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  (1,00), enquanto a amostra do gráfico (b) apresentou valores altos para  $\log \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$  (5,11) .

Figura 14- Diferença na densidade e nos tipos celulares. 14a - gráfico de pontos da amostra de leite com baixa contagem de células somáticas. 14b- gráfico de pontos de amostra de leite com alta contagem de células somáticas.



Estudos relacionam a contagem de células somáticas e as porcentagens dos linfócitos (LYM), macrófagos (MAC) e polimorfonucleares (PMN) com a saúde da glândula mamaria de bovinos (WEVER; EMANUELSON, 1989; OSTENSSON, 1993; LEITNER ET AL., 2004).

Dosogne et al. (2003) elucidaram que um animal com a glândula mamaria saudável é aquele que possui  $CCS < 2 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ , ou seja,  $\log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1} < 5,30$ . Além disso, as porcentagens de cada tipo celular devem ser as seguintes: PMN: 28%; LYM: 58%; MAC: 9%. Já um animal com mastite apresenta  $CCS > 6 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ , ou seja,  $\log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1} > 5$ , e as porcentagens de seus tipos celulares devem ser: PMN: 73%; LYM: 8%; MAC: 5% (DOSOGNE et al., 2003).

Analisando conjuntamente os resultados de CCS, CBT e as porcentagens celulares, notou-se que os animais com processos infecciosos na glândula mamária foram aqueles que obtiveram porcentagem de macrófagos (MAC) acima de 26%. Como não houve diferenciação celular de polimorfonucleares e macrófagos, foi necessário levar consideração os valores

de CCS e de CBT para constatar se realmente o animal apresentava mastite (Tabela 8).

Tabela 8 - Média do log de CCS ( $\log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), log de CBT ( $\log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), log de CCD ( $\log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e a médias das porcentagens de linfócitos (LYM) e macrófagos (MAC).

<b>Animais</b>	<b>CCS</b>	<b>CBT</b>	<b>CCD</b>	<b>LYM (%)</b>	<b>MAC (%)</b>
1	3,00	4,28	4,77	6,40	18,80
2	3,00	4,00	4,61	8,90	25,50
3	4,73	3,95	5,08	29,50	15,50
4	3,00	4,04	4,64	8,10	23,90
5	3,00	3,30	4,68	14,90	23,30
6	3,00	4,34	4,43	10,90	15,00
7	3,00	4,18	4,89	18,10	12,70
8	3,00	4,41	4,85	12,20	14,50
9	3,00	3,70	4,53	10,40	22,70
10	5,17	3,78	5,02	6,80	21,10
11	5,70	3,60	5,36	11,80	26,60
12	5,82	5,13	4,68	22,80	38,90
13	6,17	4,08	5,73	16,80	36,10
14	6,53	5,18	5,36	17,00	37,30
15	7,11	6,55	5,91	3,70	57,30

Blagitz e colaboradores (2011), também identificaram apoptose e necrose de leucócitos polimorfonucleares em leite de cabras com alta contagem de células somáticas baseadas apenas na dispersão de luz das células.

Koess & Hamann, utilizaram anticorpos para identificação de macrófagos (CD14), linfócitos (CD3) e polimorfonucleares (CD11B), a fim de detectar mastite em estágio inicial na glândula mamária de bovinos e obtiveram correlação positiva ( $r=0,72$ ) com o método de microscopia direta. Outros

estudos também reportaram correlação positiva entre a contagem diferencial celular e a contagem de células somáticas.

## 4.2 ATP-bioluminescência.

### 4.2.1. Leite cru

A média do conteúdo de ATP, em  $\log \text{URL} \cdot \text{mL}^{-1}$ , encontrado nesse estudo foi igual a 4,22, e os valores mínimos e máximos da leitura de bioluminescência, foram iguais a  $\log \text{URL} \cdot \text{mL}^{-1}$  a 3,58 e 4,87, respectivamente, como mostrado na Tabela 09.

Tabela 09 - Valores de ATP em  $\log$  de  $\text{URL} \cdot \text{mL}^{-1}$  de das 15 amostras compostas de leite cru.

Amostras	ATP
1	4,25
2	4,16
3	4,27
4	4,26
5	3,91
6	4,04
7	4,21
8	3,58
9	3,72
10	3,64
11	4,44
12	4,53
13	4,72
14	4,74
15	4,87

Avaliando a bioluminescência e seus efeitos nos constituintes do leite cru, verificou-se que os valores de CCS e CBT apresentaram correlação positiva, ao passo que a lactose, correlação negativa com ATP (Tabela 10). No

entanto, não houve correlação significativa entre ATP e as concentrações de proteína, gordura e sólidos totais (Tabela 10).

Tabela 10 - Coeficiente de correlação ( $r$ ) e coeficiente de determinação ( $R^2$ ) dos teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais, CCS e CBT com o conteúdo de ATP.

Variável	ATP (log URL·mL <sup>-1</sup> )	
	$r^{(1)}$	$R^2$ (2)
Proteína (%)	0,412 <sup>ns</sup>	0,169
Gordura (%)	-0,256 <sup>ns</sup>	0,066
Lactose (%)	-0,570 <sup>*</sup>	0,327
Sólidos Totais (%)	-0,042 <sup>ns</sup>	0,002
CCS (log cel·mL <sup>-1</sup> )	0,720 <sup>**</sup>	0,518
CBT (log UFC·mL <sup>-1</sup> )	0,614 <sup>*</sup>	0,368

<sup>ns</sup> Não significativo; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

<sup>1</sup> Coeficiente de correlação linear simples

<sup>2</sup> Coeficiente de determinação

Assim, foi possível observar que um aumento no valor de ATP acarreta em um acréscimo da porcentagem de CCS ( $r = 0,720$ ). O mesmo pode ser visualizado para a porcentagem de CBT ( $r = 0,614$ ). Entretanto, para a porcentagem de lactose, foi encontrada correlação negativa ( $r = -0,570$ ) (Tabela 10).

Niza-Ribeiro e colaboradores (2000) compararam dois métodos de ensaio, com base na utilização de ATP-bioluminescência para a contagem de micro-organismos presentes no leite cru e obtiveram coeficientes de determinação ( $R^2$ ) semelhantes as encontradas neste trabalho: 38% para o método de quantificação direta do ATP-bacteriano presente no leite e 51% para o método que emprega a etapa de filtração antecedendo a quantificação do ATP.

Os animais que apresentaram alta CCS foram aqueles em que o resultado de ATP foi igual ou acima de 50.000 URL, dessa forma, com o intuito de facilitar as análises dos dados, os valores de ATP foram divididos em três níveis conforme leitura da bioluminescência, demonstradas na Tabela 11.

Tabela 11- Divisão dos níveis de ATP de acordo com os resultados da CCS (contagem de células somáticas).

<b>Níveis de ATP</b>	<b>ATP (URL·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>ATP (log URL·mL<sup>-1</sup>)</b>
A (n=10)	$\leq 2,0 \times 10^4$	$\leq 4,3$
B (n=2)	$2,0 \times 10^4 < \text{ATP} \leq 5,0 \times 10^4$	$4,3 < \log \text{URL} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 4,7$
C (n=3)	$> 5 \times 10^4$	$> 4,7$

A relação dos constituintes do leite com a bioluminescência ainda não está totalmente elucidada. Na literatura existem relatos que a bioluminescência pode sofrer ou não influência de substâncias orgânicas como proteínas, gordura e carboidratos.

Simm e colaboradores (2006) estudando a interferência de substâncias orgânicas na técnica de ATP-bioluminescência, verificaram que soluções e/ou suspensões, contendo apenas proteína, gordura e carboidratos pouco afetaram os resultados de bioluminescência. Entretanto, quando associadas a micro-organismos viáveis, os valores de URL aumentaram significativamente ( $P < 0,05$ ).

Em contrapartida, Richardson e colaboradores (1980) verificaram maior valor de URL para soluções com menores concentrações de substâncias orgânicas, o que evidencia a possibilidade da associação de moléculas orgânicas com as células que contêm ATP, impedindo-as de reagir com o complexo luciferina/luciferase.

Dessa forma, neste estudo, observou-se que com a elevação do conteúdo de ATP houve aumento significativo ( $P < 0,05$ ) no teor de proteína e redução na concentração de lactose (Tabela 12).

Tabela 12 - Médias dos teores (%) de proteína (Prot), gordura (Gord), lactose (Lact), sólidos totais (ST), CBT (log UFC·mL<sup>-1</sup>) e CCS (log cel·mL<sup>-1</sup>) em função dos três diferentes níveis de conteúdo de ATP(log URL·mL<sup>-1</sup>).

Faixas de ATP	Prot	Gord	Lact	ST	CBT	CCS
A	3,14 <sup>a</sup>	3,04 <sup>a</sup>	4,68 <sup>a</sup>	11,78 <sup>a</sup>	3,96 <sup>a</sup>	3,43 <sup>a</sup>
B	2,87 <sup>a</sup>	2,87 <sup>a</sup>	4,21 <sup>ab</sup>	9,61 <sup>b</sup>	4,36 <sup>ab</sup>	5,76 <sup>b</sup>
C	3,83 <sup>b</sup>	2,67 <sup>a</sup>	4,22 <sup>b</sup>	12,69 <sup>a</sup>	5,27 <sup>b</sup>	6,60 <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem (P<0,05) entre si pelo teste de Tukey

Observando-se o aumento no logaritmo de URL, foi possível constatar que houve um aumento significativo (P<0,05) nos valores de logaritmo de CBT e CCS (Tabela 12). Essa informação evidencia que os micro-organismos e as células somáticas influenciam diretamente nos resultados da quantificação de ATP, uma vez que todas as células vivas necessitam desse nucleotídeo para regulação do metabolismo energético, manutenção do sistema enzimático e na biossíntese celular (AMODIO; DINO, 2014; FRAGA, 2008; PACIELLO et al., 2013).

Griffths (1993), constatou que a concentração bacteriana requerida para detecção da bioluminescência é alta, em torno de  $1 \times 10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup> enquanto que no presente estudo observou alterações significativas (P<0,05) entre as faixas de ATP quando o log de UFC·mL<sup>-1</sup> foi igual a 5,27 e quando o log de URL·mL<sup>-1</sup> foi igual a 5,76, ou seja, quando a concentração bacteriana e celular foram acima  $1 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> e/ou URL·mL<sup>-1</sup> (Tabela 12). (GRIFFITHS, 1993)

Em relação a contagem de células somáticas, nota-se que houve um aumento significativo (P<0,05) com a elevação no conteúdo de ATP (Tabela 12).

Embora sejam poucos os trabalhos reportados utilizando ATP-bioluminescência para a detecção de mastite, Samuelson et al. (1987), verificaram que uma indicação de concentrações de células somáticas no leite

pode ser obtida a partir da concentração de ATP no leite após o tratamento com um detergente não iônico.

Malkamaki et al. (1986), também propuseram um método alternativo para a detecção de mastite por bioluminescência monitorando a multiplicação bacteriana no leite por medição da concentração de ATP e verificaram que no leite mastítico os valores de ATP aumentaram mais rapidamente do que nos leites não mastíticos. Tais informações podem ser utilizadas para futuros estudos utilizando a ATP-bioluminescência.

O aumento no valor de URL conseqüentemente está associado ao aumento nos valores de CBT e CCS, uma vez que células somáticas e micro-organismos dispõem em seu conteúdo intracelular o nucleotídeo adenosina trifosfato (ATP) para a realização de funções vitais a célula.

Esse aumento nos valores de CBT e CCS, como mostrado nesse trabalho, é favorecido pelo processo infeccioso da glândula mamária que alguns dos animais em estudo apresentaram.

Sendo assim, neste estudo corroborando com Whitehead et al. (2008) , evidenciou-se que a quantidade de bioluminescência é proporcional a complexidade e concentração das suspensões e/ou soluções das substâncias orgânicas adicionadas de micro-organismos.

A fim de prever os valores de CBT e CCS a partir dos resultados da leitura de ATP foram obtidas por meio de regressão não linear ( $P < 0,05$ ) as seguintes equações:

✓ Para CCS ( $R^2=0,81$ ):

$$(1) \log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1} = 4,357, \text{ para } 3,586 \leq \log \text{ URL} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 4,210$$

$$(2) \log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1} = -21,059 + 6,036^* \times \log \text{ URL} \cdot \text{mL}^{-1}, \text{ para } 4,210 < \log \text{ URL} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 4,868$$

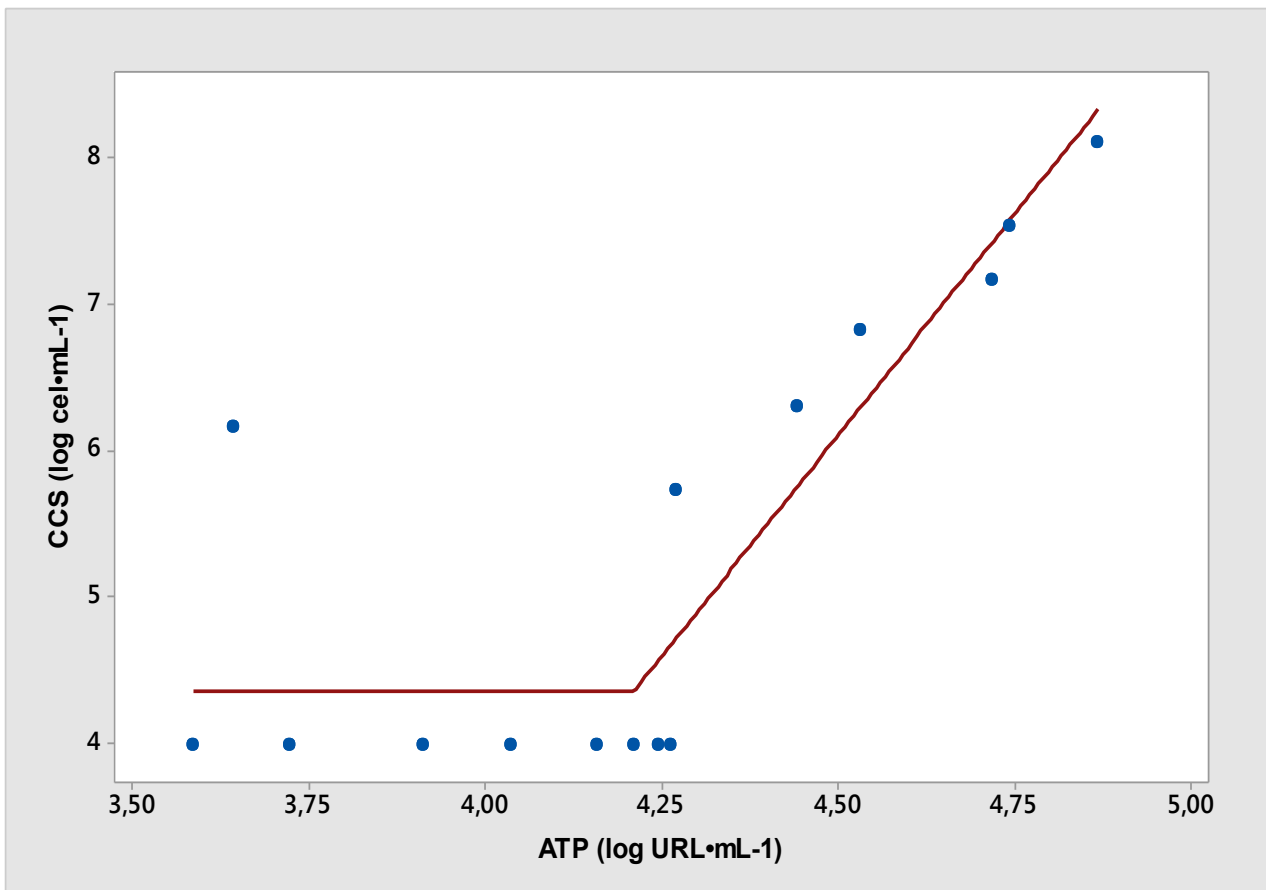
✓ Para CBT ( $R^2=0,61$ ):

$$(3) \log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1} = 4,016, \text{ para } 3,586 \leq \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 4,442$$

(4)  $\log \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1} = -15,310 + 4,349^* \times \log \text{ URL} \cdot \text{mL}^{-1}$ , para  $4,442 < \log \text{ URL} \cdot \text{mL}^{-1} \leq 4,868$

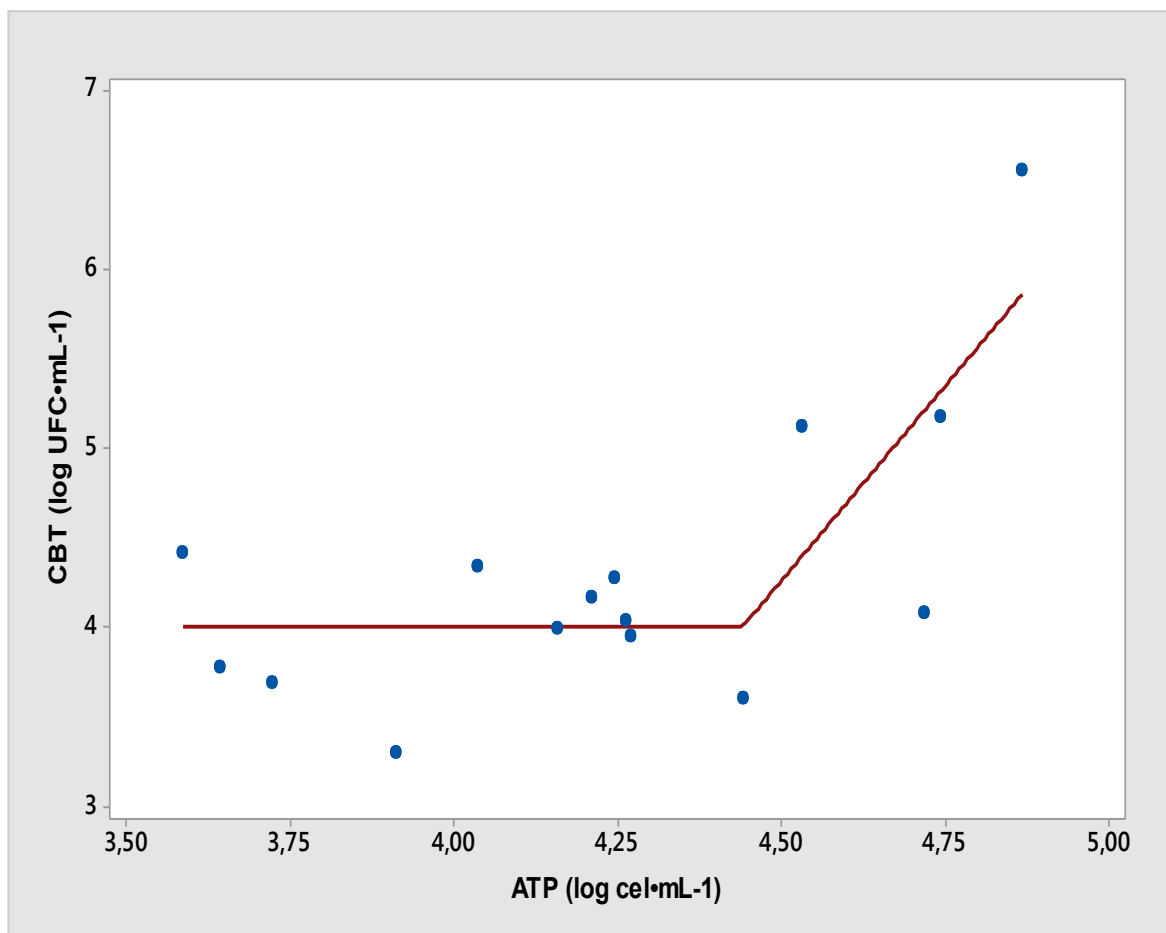
Com base na regressão não linear, foi possível observar que para a contagem de células somáticas só houve resposta em função do conteúdo de ATP, quando o valor de log URL foi acima de 4,210 para CCS (Figura 13).

Figura 13- Resposta da contagem de células somáticas (CCS) em função do conteúdo de ATP.



Para a contagem bacteriana total (CBT), a resposta em função do conteúdo do conteúdo de ATP foi acima de 4,44 log de URL como demonstrado na Figura 14.

Figura 14 - Resposta da contagem bacteriana total (CBT) em função do conteúdo de ATP nas amostras de leite cru.



#### 4.2.2. Equipamentos da ordenha e mão de manipuladores.

Avaliando a higienização das teteiras por meio da bioluminescência, observou-se que após a lavagem e sanitização das mesmas, houve redução ( $P < 0,05$ ) na medida  $URL \cdot cm^2$  em todos os seis conjuntos avaliados, tanto nas teteiras anteriores direita (AD) quanto nas posteriores esquerda (PE) (Tabela 15).

Tabela 15 – Média (n=5) do logaritmo de URL·cm<sup>2</sup> da teteira anterior direita (AD) e da teteira posterior esquerda (PE) dos seis conjuntos de teteiras avaliados antes e após higienização e suas respectivas condições higiênicas.

<b>Conjunto de Teteiras</b>						
Anterior Direita (AD)						
	1	2	3	4	5	6
Antes da Higienização	4,25 <sup>a</sup>	3,31 <sup>a</sup>	3,08 <sup>a</sup>	3,38 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	4,31 <sup>a</sup>
Depois da Higienização	2,57 <sup>b</sup>	2,67 <sup>b</sup>	2,30 <sup>b</sup>	2,77 <sup>b</sup>	2,89 <sup>b</sup>	2,70 <sup>b</sup>
Condição Higiênica*	N	N	A	N	N	N

Posterior Esquerda (PE)						
	1	2	3	4	5	6
Antes da Higienização	4,25 <sup>a</sup>	3,03 <sup>a</sup>	2,86 <sup>a</sup>	3,95 <sup>a</sup>	3,87 <sup>a</sup>	3,63 <sup>a</sup>
Depois da Higienização	2,79 <sup>b</sup>	2,02 <sup>b</sup>	2,26 <sup>b</sup>	2,56 <sup>b</sup>	2,61 <sup>b</sup>	2,62 <sup>b</sup>
Condição Higiênica*	N	S	A	N	N	N

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey..

\*S= satisfatória; A= alerta; N=Não satisfatória.

Segundo recomendações da Biotrace (2000), as superfícies de equipamentos e utensílios que apresentarem resultados menores que log de 2,18 URL devem ser consideradas em condições higiênicas satisfatórias. Quando a leitura estiver entre o intervalo de log 2,18 a 2,48 URL, serão consideradas em condição de alerta. Para resultados acima de log de 2,48 URL, serão consideradas em condições higiênicas insatisfatórias (SIMM, 2004).

De acordo com essas recomendações, nota-se que apenas a teteira posterior esquerda do conjunto dois apresentou-se em condições higiênicas satisfatórias após a higienização (Tabela 15). A teteira anterior direita e a posterior esquerda do conjunto três apresentaram condições de alerta pós-higienização e já as demais teteiras apresentaram-se em condições higiênicas insatisfatórias.

No entanto, é possível inferir que esses valores estipulados pelo fabricante são relativamente rígidos quando fazem referência a superfícies,

como por exemplo, as teteiras, com carga orgânica superior as superfícies usadas na indústria para manipulação de alimentos.

Finger e Sicho (2001) utilizaram a bioluminescência para avaliar a preparação do úbere de vacas para ordenha. Os resultados obtidos assemelham-se aos encontrados nesse estudo, visto que a bioluminescência não foi capaz de diferenciar os animais que passaram pelo procedimento de preparação dos tetos de acordo com os valores estipulados pelos fabricantes.

Resultado semelhante foi obtido para a avaliação das condições higiênicas das mãos de manipuladores por meio da bioluminescência. Após a limpeza e sanitização das mãos direita dos quatro manipuladores analisados, houve uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) na medida de URL·cm<sup>2</sup> (Tabela 14).

Tabela 14- Médias (n=5) do logaritmo de URL·cm<sup>2</sup> da mão direita de quatro manipuladores pré e pós-lavagem e suas referentes condições higiênicas.

<b>Mão de manipulador (log de URL·cm<sup>2</sup>)</b>				
Manipulador	1	2	3	4
Antes da Higienização	3,58 <sup>a</sup>	3,39 <sup>a</sup>	3,48 <sup>a</sup>	3,52 <sup>a</sup>
Após a Higienização	2,26 <sup>b</sup>	2,30 <sup>b</sup>	2,27 <sup>b</sup>	2,13 <sup>b</sup>
Condição Higiênica*	A	A	A	S

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey.

\*S= satisfatória; A= alerta; N=Não satisfatória.

Do mesmo modo, levando em consideração as recomendações da Biotrace (2000), somente a mão direita do manipulador quatro após a higienização, apresentou condições higiênicas satisfatórias ( $\log \text{URL} \cdot \text{cm}^2 < 2,18$ ). Já as mãos direitas dos manipuladores um, dois e três, após higienização, apresentaram condições de alerta ( $2,18 < \log \text{URL} \cdot \text{cm}^2 > 2,48$ ) (Tabela 14).

Takahashi e colaboradores (2013), avaliaram a eficiência do treinamento de manipuladores de alimentos em restaurantes comerciais por meio do ensaio

de ATP-bioluminescência e da mesma maneira, a maioria dos resultados para as mãos apresentaram-se acima da recomendação do fabricante.

Assim, evidencia-se que a técnica apresenta sensibilidade a alta carga orgânica das mãos e mesmo com a correta lavagem e higienização, não é possível verificar as condições higiênicas das mesmas.

## 6. CONCLUSÃO

A técnica de ATP-bioluminescência foi capaz de determinar o conteúdo de ATP presente no leite cru após o preparo das amostras. Constatou-se que determinadas características físico-químicas e microbiológicas utilizadas para a avaliação da qualidade do leite cru influenciaram na medida da bioluminescência.

A contagem celular diferencial apresentou correlação positiva com a contagem de células somáticas, porém a diferenciação celular não evidenciou processo infeccioso na glândula mamária. Se analisados conjuntamente com a CCS e a CBT, o animal com mastite apresenta uma contagem de macrófago acima de 26 %. O uso de anticorpos específicos seria interessante para melhorar os resultados quanto ao perfil celular de vacas com mastite.

Foi possível correlacionar os valores de URL com a contagem bacteriana total (CBT) e em especial com a contagem de células somáticas (CCS). A relação de URL, CCS e CBT apresentou uma função não linear. O aumento de CCS foi observado quando o valor ATP, em  $\log \text{URL} \cdot \text{mL}^{-1}$ , foi igual e ou acima de 4,12. Do mesmo modo, a resposta da contagem bacteriana total (CBT) em função do conteúdo de ATP nas amostras de leite cru só foi observada quando o valor de ATP, em  $\log \text{URL} \cdot \text{mL}^{-1}$ , foi igual e ou acima de  $\log 4,44$ .

Em relação à avaliação das condições higiênicas dos equipamentos de ordenha e das mãos de manipuladores, a técnica de ATP-bioluminescência mostrou redução significativa do conteúdo de ATP após o procedimento de lavagem e higienização das superfícies, entretanto a determinação da bioluminescência nas superfícies não deve ser a única técnica utilizada para monitorar as condições higiênico-sanitárias.

Sendo assim, a técnica de ATP-bioluminescência é eficiente para avaliar a qualidade do leite cru, levando em consideração como fonte de ATP os micro-organismos e células somáticas. A técnica de ATP-bioluminescência pode ser utilizada como alternativa para verificar a qualidade do leite tanto na indústria quanto no campo, uma vez que a técnica fornece estimativas em tempo real da alta contagem de células somáticas e da alta contagem

bacteriana total, permitindo tomar medidas corretivas imediatas no caso de amostras de leite não conformes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EMBRAPA, Gado de Leite. Importância econômica da atividade leiteira. 2009. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/sistemaproducao/book/export/html/182> . Acesso em: 21 de março de 2015.

IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasil em Desenvolvimento: Estado, planejamento e políticas públicas. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/bd/pdf/Livro BD vol2.pdf>. Acesso: 10 de outubro de 2015.

ISO 707: **Milk and milk products -- Guidance on sampling**, 2008.

3M do Brasil Ltda. Sistema de Luminescência Microbiana (MLS) 3M. Manual do usuário do instrumento MLS-USB, s.d.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2011.

ALMEIDA, J. F.; AQUINO, M.H.C; MAGALHÃES, H.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; FERREIRA, T.; BARRETO, M.L. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no. p. 13–18, 2013.

ALMEIDA, L. A. D. B. Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aureus* LESLIE AVILA DO BRASIL ALMEIDA Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aur*. 2004.

AMODIO, E.; DINO, C. Use of ATP bioluminescence for assessing the cleanliness of hospital surfaces: a review of the published literature (1990-2012). **Journal of infection and public health**, v. 7, n. 2, p. 92–8, 2014.

ANDRADE, U.V.C.; HARTMAN, W.; MASSON, M.L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **Arquivos de Veterinaria**, v. 25, n. 3, p. 129-135, 2009.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**.ed. Varela, São Paulo, 2008.

BAPTISTA, G.; PINTO, A. D. R. Produção leiteira no Brasil. 2013.

BELL, C.; STALLARD, P. A.; BROWN, S. E.; STANDLEY, J. T. E. Microbiology ATP-Bioluminescence techniques for assessing the hygienic condition of milk transport tankers. **International Dairy Journal**, v. 4, n. 7, p. 629–640, jan. 1994.

BELL, C.; BOWLES, C. D.; TOSZEGHY, M. J. K.; NEAVEF, P. Development of a hygiene standard for raw milk based on the lumac ATP- bioluminescence method. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 7, p. 709–713, 1996.

BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C.F.; DINIZ, S. A.; AZEVEDO, L. F. F.; SILVA, M. X.; HADDAD, J. P.; HEINEMANN, M. M.; CERQUEIRA, O. P.; DELLA LIBERA, A. M. M. Apoptosis and necrosis of polymorphonuclear

leukocytes in goat milk with high and low somatic cell counts. **Small Ruminant Research**, v.100, p. 67-71,2011.

BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C.F.; DINIZ, S. A.; AZEVEDO, L. F. F.; SILVA, M. X.; HADDAD, J. P.; HEINEMANN, M. M.; CERQUEIRA, O. P.; DELLA LIBERA, A. M. M. Flow cytometric analysis: Interdependence of healthy and infected udder quarters. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 4, p. 2401–2408, 11 fev. 2015.

BOZO, G. A; SILVA, L. C.; OKANO, W. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 589–594, 2013.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v.164, p:116-128, 2002.

BRASIL. **Instrução Normativa n.62**, 2011. Disponível em: <[http://www.universidadedoleite.com.br/imagens/uploads/files/instru??o\\_normativa\\_62.pdf](http://www.universidadedoleite.com.br/imagens/uploads/files/instru??o_normativa_62.pdf)>

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. E.; VERNEQUE, R. D. S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 847–850, 2000.

BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNEQUE, R. S.; BRITO, M. A. V. P. Sensibilidade e especificidade do California Mastitis Test como recurso de diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Vol.17, p:49-53.1997.

BRITO, M.A.V.; PORTUGAL, J.A.B.; DINIZ, F.H.; FONSECA, P.C.; ANGELO, F.F.; PORTO, M. A. C. Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários. 2002.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; OLIVIERA, A. N.; NICOLAU, E. S.; NEVES, R. B. S. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v. 15, p. 40–44, 2008.

BÜLTE, M.; REUTER, G. The bioluminescence technique as a rapid method for the determination of the microflora of meat. **International Journal of Food Microbiology**,1985.

CAMPOS, K. C.; PIACENTI, C. A. Agronegócio do leite: cenário atual e perspectivas. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2007.

CĂPRIȚĂ, A.; CĂPRIȚĂ, R. Rapid methods for monitoring the microbiological quality of raw milk. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 14, p. 102–105, 2008.

CARRASCOSA, C. Monitoring of cleanliness and disinfection in dairies:

Comparison of traditional microbiological and ATP bioluminescence methods. **Food Control**, v. 28, n. 2, p. 368–373, dez. 2012.

CARRICK, B. K.; BARNEY, M.; NAVARRO, A.; RYDER, D. The comparison of four bioluminometers and their swab kits for instant hygiene monitoring and detection of microorganisms in the brewery. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 107, n. 1, p. 31–37, 2001.

COELHO, K. O.; MESQUITA, A. J.; Machado, P. F.; Lage, M. E.; Meyer, P. M.; Reis, A. P. Efeito da contagem de células somáticas sobre o rendimento e a composição físico-química do queijo muçarela. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 1260–1268, 2014.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMÉTRIO, C. G. B.; RIBEIRO, P. J. ; MEYER, P. M.; CORASSIN, C. H.; CASSOLI, L. D. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 623–634, 2004.

COSTA, M. D. R.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; GIGANTE, M. L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Alimentação e Nutrição**, v. 20, n. 3 p. 507–514, 2009.

COSTA, P. D.; ANDRADE, N. J.; BRANDÃO, S. C. C.; PASSOS, F. J. V.; SOARES, N. F. F. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 345–349, 2006.

CUNHA, A. F.; LAGE, A. D.; PEREIRA E ARAÚJO, M. M. SANTOS, R. D. P.; RESENDE, G. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Avaliação da qualidade microbiológica de bebida láctea e creme de leite uat por atp-bioluminescência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 595–600, 2013.

CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, P. M.; GENTILINI, M. B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 60, p. 19–24, 2008.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles -On the structural models of bovine casein micelles: review and possible improvements. **Royal Society of Chemistry**, v.7, p. 2265-2272, 2011.

DAY, J.C.; TISIL, L. C.; BAILEY, M. J. Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. **Luminescence**.v.19,p. 8–20, 2004.

DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; MEHRZAD, J.; MASSART-LEËN, A. M.; BURVENICH, C. Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 3, p. 828–34, mar. 2003.

EIFERT, E. D. C.; LANA, R. P.; LANNA, D. P. D.; LEOPOLDINO, W. M.; OLIVEIRA, M. V. M.; ARCURI, P. B.; CAMPOS, J. M. S.; LEÃO, M. I.;

VALADARES FILHO, S. C. Consumo, produção e composição do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e diferentes fontes de carboidratos na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 211–218, 2006.

ELIAS, A. O.; VICTORIA, C.; DA SILVA, A. V.; LANGONI, H. Características físico-químicas e contagem de células somáticas de leite proveniente de vacas naturalmente infectadas por *Streptococcus* spp. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8, n. 2, p. 165–169, 2005.

EMBRAPA. O mercado lácteo brasileiro no contexto mundial. p. 12, 2010.

FERNANDES, A.M.; OLIVEIRA, C.A.F.; LIMA, C.G. Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt. **International Dairy Journal**, v.17, p.111–115, 2007.

FERREIRA, A. M.; ANDRADE, D.; RIGOTTI, M. A.; FERREIRA, M. V. F. Condition of cleanliness of surfaces close to patients in an intensive care unit. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 19, n. 3, p. 557–564, 2011.

FINGER, R.; SISCHO, W. M. Bioluminescence as a technique to evaluate udder preparation. **Journal of dairy science**, v. 84, n. 4, p. 818–823, 2001.

FRAGA, H. Firefly luminescence: a historical perspective and recent developments. **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 7, n. 2, p. 146–58, mar. 2008.

GIGANTE, M.L., COSTA, M.R. Influência das células somáticas nas propriedades tecnológicas do leite e derivados. In: BARBOSA, S.B.P., BATISTA, A.M.V., MONARDES, H. III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008, v.1, p. 161-174.

GRIFFITHS, M. W. Applications of bioluminescence in the dairy industry. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 10, p. 3118–3125, 1993.

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**, v. 29, n. 1, p. 216–222, 2005.

GUNASEKERA, T. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 269–279, 25 ago. 2003.

HANUŠ, O.; VEGRICHT, J.; FRELICH, J.; MACEK, A.; BJELKA, M.; LOUDA, F.; JANŮ, L. Analysis of raw milk quality according to free fatty acid contents in the Czech Republic. **Czech Journal Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 17-30, 2008.

HARAGUCHI, F. K.; DE ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: Composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6.ed. New York: Chapman & Hall, 2009. 661 p.

JÚNIOR, J.; BELOTI, V. MASTITE BOVINA E SEU REFLEXO NA QUALIDADE DO LEITE—REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 02, n. 2, p. 1–12, 2012.

KOESS, C.; HAMANN, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. **The Journal of dairy research**, v.75,p. 225-232, 2008.

LE MARÉCHAL, C., THIÉRY, R., VAUTOR, E., LE LOIR, Y. Mastitis Impact on Technological Properties of Milk and Quality of Milk Products-A Review. **Dairy Science and Technology**. 2011.

LEITE, F. D. O. Fatores que afetam a composição e as características físico-químicas do leite \* 1. n. Vet 00036, p. 1–25, 2001.

LEITE, M. DE O. Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e Bronopol. **Tese (DOUTORADO em Ciência Animal)**-Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, 2006.

LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N. Changes in Milk Composition as Affected by Subclinical Mastitis in Goats. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 6, p. 1719–1726, 2004.

LEWIS, T. et al. A modified ATP benchmark for evaluating the cleaning of some hospital environmental surfaces. p. 156–163, 2008.

LINDMARK-MÅNSSON, H.; BRÄNNING, C.; ALDÉN, G.; PAULSSON, M. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 717–727, jul. 2006.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, n. Doležel 1991, p. 18–29, 2004.

McELROY W. D.; DeLUCA, M. Chemistry of firefly bioluminescence. In: HERRING, P. J. *Bioluminescence in Action*. New York.:Academic Press, 1978, p. 109-127.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRÍES, 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.

MALKAMAKI, M., T. Mattila, and M. Sandholm. 1986. Bacterial growth in mastitic milk and whey. **Journal Veterinary Medical Ser. B**. 33:174.

MATTAR, M. et al. Avaliação de mastite em vacas leiteiras via contagem de células somáticas no leite. n. 2003, p. 2003–2004, 2010.

MARTINS, T. Resíduos de gentamicina no leite de vacas com mastite clínica e

subclínica submetidas a tratamento intramamário. 2013. 91 f. **Dissertação (Mestrado em Produção Sustentável)** – Instituto de Zootecnia, APTA/SAA, Nova Odessa. 2013.

MAZAL, G.; VIANNA, P. C. B.; SANTOS, M. V.; GIGANTE, M. L. Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.630–636, 2007.

MIRA, C. S.; SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G. neutrófilos pela citometria de fluxo e pela técnica de citocentrifugação. p. 1403–1408, 2013.

NASCIF JR., I.A. Diagnóstico da mastite subclínica bovina pela condutividade elétrica do leite, cmt e contagem de células somáticas: influência das estações do ano, fases da lactação e ordenhas da manhã e da tarde. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2001. 47p. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** - Universidade Estadual Paulista, 2001.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966–973, 2005.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 386–390, 2009.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R.; DÜRR, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1129–1135, jun. 2006.

OLIVEIRA, A.G.; CARVALHO, R. P.; EUGENE, H.; VINICIUS, C. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz. Revisão. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 314–319, 2013.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 259–263, 2006.

OLIVEIRA, T. DE; CANETTI, A. C. V. Eficiência dos métodos microbiológicos e de ATP-bioluminescência na detecção da contaminação de diferentes superfícies. Efficiency of microbiological and ATP-bioluminescence methodologies for detecting contaminants on different surfaces. v. 69, n. 4, p. 467–474, 2010.

PACIELLO, L.; FALCO, F. C.; LANDI, C.; PARASCANDOLA, P. Strengths and weaknesses in the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability by ATP-based bioluminescence assay. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 3, p. 157–62, 5 mar. 2013.

PAULA, V. M.; SALGADO, L. M. Instrução Normativa 62: o que você está fazendo para 2016? Artigos técnicos. Rehagro, 2012. Disponível em: <http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=2488>. Acesso em: 20 de janeiro de 2015.

PEIXOTO, R.; MOTA, R.; COSTA, M. Mastite em pequenos ruminantes no

Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 754–762, 2010.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Graça, SP, a. 9, n. 16, 2011

PIEPERS, S. et al. Technical note: Flow cytometric identification of bovine milk neutrophils and simultaneous quantification of their viability. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 2, p. 626–631, 2009.

PILLA, R. PILLA, R.; MALVISI, M.; SNEL, G. G. M.; SCHWARZ, D.; KÖNIG, S.; CZERNY, C-P.; PICCININI, R. Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 3, p. 1653–60, 2013.

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

PIRES, A. C. DOS S.; ARAÚJO, E. A.; CAMILLOTO, G. P.; RIBEIRO, M. C. T.; SOARES, N. DE F.; ANDRADE, N. J. DE. Condições higiênicas de fatiadores de frios avaliadas por ATP-bioluminescência e contagem microbiana: sugestão de higienização conforme RDC 275 da Anvisa. **Alimentação e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 123–129, 2005.

PØDENPHANT, M.; MARIE, R.; OLESEN, T.; MATTEUCCI, M.; KRISTENSEN, A. Injection molded pinched flow fractionation device for enrichment of somatic cells in cow milk. **Microelectronic Engineering**, v. 124, n. April, p. 18–22, 2014.

PRADO, R. A. “Clonagem gênica e caracterização de uma enzima tipoluciferase de coleóptero s não bioluminescente e sua relação com a origem da atividade luminescente”. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)**-Universidade Federal de São Carlos, 2012.

RANGEL, A.; MEDEIROS, H. Correlação entre a contagem de células somáticas (CCS) e o teor de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado do leite. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.4; p. 57-60, 2009.

QUEIROGA, R. D. C. R. D. E. et al. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 8, 2007.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria na Qualidade do Leite**. Barueri: Manole, p.314, 2007.

SENA, M. J. DE.; MOTA, R. A.; MENDES, E. S.; ALMEIDA, C. C. DE. Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru tipo c produzido na na região agreste do estado de pernambuco. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.73, n.1, p.89-95, p. 89–95, 2006.

SHAMA, G.; MALIK, D. J. International Journal of Hygiene and The uses and

abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 2, p. 115–125, 2013.

SILVA, P. H. F. DA. Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. **Química e Sociedade**, n. 6, p. 3–5, 1997.

SILVEIRA, M. L. R.; BERTAGNOLLI, S. M. M. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 2, n. 2, p. 75–80, 2014.

SIMM, E. M.; DE ANDRADE, N. J.; MENDONÇA, R. C. S.; PASSOS, F. J. V.; CHAVES, J. B. P. Interference of Some Organic Substances and Microorganisms Adhered to Stainless Steel in ATP-bioluminescence Measurement. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 51, n. June, p. 587–593, 2008.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 3ed. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2008.

TURCO, C. DE P.; COSTA, G. M.; PAIVA, H. A. B. DE.; BARROSO, M. F. GI.; CÔNSOLI, M. A.; NOGUEIRA, M. P.; ROSSI, R. M.; SILVA, R. DE O. P.; TORGLER, S. P.; NETO, S. B. **Planejamento e gestão estratégica para o leite em São Paulo**. 1ed. São Paulo: SEBRAE, 2007.

VARGAS, D. P. DE.; NÖRNBERG, J. L.; MELLO, R. DE O.; SHEIBLER, R. B.; MILANI, M.; MELLO, FERNANDA. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 241-247, 2013.

VELASQUEZ, M. AND FEIRTAG, J. M. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. *Journal of Food Protection*, v.60, p. 799-803, 1997.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y fisicalactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987.

WEVER, P., U. EMANUELSON .Effects of systematic influences and intramammary infection on differential and total somatic cell counts in quarter milk samples of dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 30,p .465–474,198.

WHITEHEAD, K. A.; SMITH, L. A.; VERRAN, J. The detection of food soils and cells on stainless steel using industrial methods: UV illumination and ATP bioluminescence. **International journal of food microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 121–8, 30 set. 2008.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.577-585, 2009.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. **Journal Animal Science**, v. 86, n.1, p.57–65,2008.

