

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA – PPGZOO

GIAN RICARDO ZUFFO

**ESPECTROSCOPIA POR BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA: ANÁLISE EM TEMPO REAL PARA
A DETERMINAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE BOVINO**

CHAPECÓ

2021

GIAN RICARDO ZUFFO

**ESPECTROSCOPIA POR BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA: ANÁLISE EM TEMPO REAL PARA
A DETERMINAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE BOVINO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Luiza Bachmann Schogor

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Zampar

CHAPECÓ

2021

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Zuffo, Gian Ricardo
ESPECTROSCOPIA POR BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA:
ANÁLISE EM TEMPO REAL PARA A DETERMINAÇÃO DA
CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE BOVINO /
Gian Ricardo Zuffo. -- 2021.
65 p.

Orientadora: Ana Luiza Bachmann Schogor
Coorientador: Aline Zampar
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2021.

1. análise em tempo real. 2. citometria de fluxo. 3. contagem
diferencial. 4. mastite. 5. microscopia óptica. I. Schogor, Ana Luiza
Bachmann. II. Zampar, Aline. III. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

GIAN RICARDO ZUFFO

**ESPECTROSCOPIA POR BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA: ANÁLISE EM TEMPO REAL PARA
A DETERMINAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE BOVINO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Luiza Bachmann Schogor

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Zampar

BANCA EXAMINADORA

Membros:

Ana Luiza Bachmann Schogor, Doutora
UDESC - Campus UDESC Oeste

Adriana de Souza Martins, Doutora
UEPG

Diego Soares Machado, Doutor
IFF - Campus Alegrete

Chapecó, 04 de outubro de 2021.

A minha mãe Lerides de Queirós Zuffo, uma verdadeira leoa que não abandona a cria. Eu te amo e agradeço por toda paciência, ensinamentos e dedicação. Sei que teve de abrir mão de muitas coisas na vida para me ajudar e quase sempre não entende o que estou fazendo, mas agradeço por nunca ter negado apoio. A senhora é minha heroína!

Ao meu pai Genoir Hilário Zuffo, você é o cara. Um conglomerado de sentimentos trancados numa caixinha e que à medida que o bigode vai ficando mais branco está sendo mais fácil de achar a chave. O senhor transcende todo o carinho e segurança que eu preciso. Confesso que eu dei mais trabalho do que o senhor esperava, mas com o pulso firme de sempre soube me direcionar novamente e olha onde estamos: juntos!

AGRADECIMENTOS

À UDESC e toda a família construída nesses nove anos de convivência e aprendizado.

À minha família. O apoio e compreensão de vocês em todas as etapas foi imprescindíveis.

Às Professoras/orientadoras e acima de tudo amigas Ana Luiza Bachmann Schogor e Aline Zampar, a palavra incrível dedico a vocês. O sentimento é de honra por ter dividido/adquirido tanto conhecimento, meu eterno obrigado.

Ao mestre Patrik Breitenbach, foi muito bom ter dividido essa jornada contigo. Valeu alemão!

À Empresa Bionexus, e toda sua equipe, pela disponibilidade e oportunidade, de se avaliar cientificamente, uma técnica de análise da qualidade do leite. Esperamos juntos, contribuir com a cadeia leiteira por meio de novas técnicas e tecnologias. E, se for comendo um X-calota melhor ainda (risos). Obrigado, amigos!

À Prof. Mayra Teruya Eichemberg, pelo auxílio em toda a parte de microscopia ótica realizada sob sua supervisão e apoio. Sem seus conhecimentos, uma enorme parte deste trabalho não teria sido realizada.

Agradecimentos à FAPESC, pelo auxílio financeiro de apoio a infraestrutura do Grupo de Pesquisa em Bioclimatologia, etologia, ambiência e produção animal (2019TR704) e Programa de Apoio à Pesquisa Aplicada da UDESC (2019TR729). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À todos expesso meu respeito e gratidão.

RESUMO

Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

ESPECTROSCOPIA POR BIOIMPEDÂNCIA ELÉTRICA: ANÁLISE EM TEMPO REAL PARA A DETERMINAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS NO LEITE BOVINO

AUTOR: Gian Ricardo Zuffo

ORIENTADORA: Ana Luiza Bachmann Schogor

CO-ORIENTADORA: Aline Zampar

Chapecó, 04 de Outubro de 2021.

O monitoramento da qualidade do leite demanda laboratórios credenciados à Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite (RBQL). Nestes são utilizados equipamentos de precisão que, por sua vez, possuem um alto custo de compra e de manutenção, tornando-se inviáveis para a utilização fora desses laboratórios como, por exemplo, para o controle da qualidade do leite em nível de rebanho ou em plataformas de laticínios. Devido ao crescente número de amostras a serem analisadas nas indústrias, bem como ao aumento do interesse de produtores rurais para com as novas tecnologias aplicadas à produção animal, torna-se necessária à utilização de métodos analíticos rápidos e seguros. Dessa forma, o objetivo deste projeto foi explorar o potencial do uso da espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE) na determinação da contagem de células somáticas (CCS) no leite bovino. Cinquenta amostras de leite oriundas individualmente de animais e 50 amostras oriundas de tanques de expansão foram submetidas às análises por citometria de fluxo, ou seja, análises por métodos de referência baseados nas normas ISO, e análise por EBE. Ambas foram correlacionadas entre si e entre dados de composição do leite, diferenciação celular e índices zootécnicos dos animais avaliados, por correlação linear de Pearson. Os linfócitos (LIN) foram encontrados em menor proporção celular média em relação aos demais tipos celulares, tanto para amostras de tanque como de animais individuais. Com relação à determinação da CCS por diferentes metodologias (ou oriundas de diferentes laboratórios), os laboratórios credenciados para RBQL (LAB1 e LAB2) apresentaram os maiores coeficientes de correlação e de determinação, assim como menor bias e raiz quadrada média do erro de predição (RMSEP) em relação ao método de referência, para ambos os tipos de amostras analisadas. Todas as versões avaliadas para a EBE se correlacionaram positivamente e foram significativas, em relação ao método de referência. Ainda, todas as versões apresentaram valores similares de coeficientes de correlação e de determinação entre si. Não foram observadas correlações significativas entre a CCS e os dados zootécnicos, assim como entre a CCS e os componentes do leite analisados. Com relação a diferenciação celular, observaram-se correlações significativas e positivas entre LIN e macrófagos + células epiteliais (MAC+EPI), LIN e polimorfonucleados (PMN) e, entre PMN e MAC+EPI. Não foram observadas correlações significativas entre os componentes do leite e os diferentes tipos celulares componentes da CCS. E finalmente, foram observadas correlações significativas e positivas entre CCS e diferentes tipos celulares, a saber, entre CCS e LIN, CCS e MAC+EPI e entre CCS e PMN. A espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier foi à técnica que apresentou correlação mais alta com o método de referência para CCS. Todavia, a espectroscopia de bioimpedância elétrica

apresentou resultados que apontam seu potencial de uso para análise de CCS no leite, uma vez que foram encontradas correlações significativas e positivas entre este método de análise e o método de referência ($\rho=0,48$, $p=0,0004$). A CCS não influenciou os resultados de qualidade do leite, observados tanto em amostras de animais quanto advindas de tanques de expansão. A CSS foi correlacionada entre os tipos celulares, com predominância de PMN para amostras de animais individuais e para amostras de tanques de expansão.

Palavras-chave: análise em tempo real, citometria de fluxo, contagem diferencial, mastite, microscopia óptica.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

ELECTRICAL BIOMPEDANCE SPECTROSCOPY: REAL TIME ANALYSIS FOR SOMATIC CELL COUNT DETERMINATION IN BOVINE RAW MILK

AUTHOR: Gian Ricardo Zuffo

ADVISER: Ana Luiza Bachmann Schogor

CO-ADVISER: Aline Zampar

Chapecó, October 4th, 2021.

Milk quality monitoring requires laboratories accredited to the Brazilian Network of Milk Quality Control (RBQL), which use precision equipment that have a high purchase and maintenance cost, making them unfeasible for use outside these laboratories, for example, for milk quality control at herd level or on the dairy platform. Due to the increasing number of samples to be analyzed in the industries, as well as the increasing interest of rural producers in new technologies applied to animal production, the use of rapid and safe analytical methods becomes necessary. Thus, the objective of this project was to explore the potential of using electric bioimpedance spectroscopy (EBE) for somatic cell counts (SCC) in bovine milk. Fifty samples from animals and 50 samples from bulk tanks were analyzed by flow cytometry, reference methods based on ISO standards, and EBE analysis, which were correlated among themselves and between milk composition data, cell differentiation, and zootechnical indices of the animals evaluated, by Pearson's linear correlation. As for the cell proportion, lymphocytes (LIN) were found in a lower average proportion concerning the other cell types, both for the bulk tank and animal samples. Regarding the determination of SCC by different methodologies (or from different laboratories), the RBQL accredited laboratories (LAB1 and LAB2) showed the highest correlation and determination coefficients, as well as lowest bias and root mean square error of prediction RMSEP about the reference method, for both types of samples analyzed. All versions evaluated for SCC correlated positively and were significant for the reference method. Furthermore, all versions presented similar values of correlation and determination coefficients. No significant correlations were observed between SCC and zootechnical data, as well as between SCC and the milk components analyzed. For cell differentiation, significant and positive correlations were observed between lymphocytes (LIN), LIN and macrophages + epithelial cells (MAC+EPI), LIN and polymorphonucleates (PMN) and, between PMN and MAC+EPI. No significant correlations were observed between milk components and the different cell types components of SCC. And finally, significant and positive correlations were observed between SCC and different cell types, namely, between SCC and LIN, SCC and MAC+EPI and, between SCC and PMN. Flow cytometry was the technique that showed the highest correlation with the reference method for SCC. However, the electric bioimpedance spectroscopy presented results that point to its potential use for milk SCC analysis, since significant and positive correlations were found between this analytical method and the reference method ($\rho=0,48$, $p=0,0004$). The SCC did not influence the milk quality results, observed both in samples from animals and bulk tanks. The SSC was correlated between the cell types, with a predominance of PMN for samples from animals and samples from expansion tanks.

Keywords: real-time analysis, flow cytometry, differential counting, mastitis, optical microscopy.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre as diferentes metodologias de preparo de lâmina e técnica de contagem para quantificação do número de células somáticas no leite bovino.50
- Tabela 2:** Médias, desvio-padrão (DP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx) para as variáveis de contagem de células somáticas (CCS) pelos diferentes métodos e versões de calibração dos equipamentos avaliados, diferenciação celular, composição e dados zootécnicos.51
- Tabela 3:** Médias, bias, raiz quadrada média do erro de predição (RMSEP), coeficientes de correlação de Pearson e de determinação entre os métodos de referência baseados em normas ISO (REF), metodologia de citometria de fluxo (determinadas em dois laboratórios, LAB 1, LAB 2) e espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE, considerando cinco versões do equipamento), das amostras advindas de tanques de expansão de animais para contagem de células somáticas (CCS, mil céls/mL).52
- Tabela 4:** Coeficientes de correlação linear de Pearson entre dados zootécnicos, constituintes do leite, contagem de células somáticas (CCS, céls/mL) obtidas pelos métodos de referência, e contagem diferencial de células (linfócitos (LIN), macrófagos+células epiteliais (MAC+EPI) e polimorfonucleados (PMNs), de amostras advindas de animais, individualmente (hachuradas em verde) e de tanques de expansão (hachuradas em azul).53
- Tabela 5 (Complementar):** Coeficientes de correlação linear de Pearson entre tipos celulares (linfócitos, LIN; macrófagos somados à células epiteliais, MAC+EPI e polimorfronucleares, PMN) e análises de contagem de células somáticas (CCS) obtidas pelos métodos de referência (CCS_ref), citometria de fluxo realizada em dois laboratórios (LAB 1 e LAB 2) e espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE) com versões de calibração (cinco para amostras individuais e três para tanques de expansão). Correlações para amostras de animais individuais hachuradas em verde, e para e tanques de expansão hachuradas em azul.54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCBRH	Associação Paranaense e Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
CAA	Células Apresentadoras de Antígeno
CCS	Contagem de Células Somáticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CS	Células Somáticas
CB	Contagem Bacteriana
CBT	Contagem Bacteriana Total
CPP	Contagem Padrão em Placas
DEL	Dias em Lactação
EBE	Espectroscopia de Bioimpedância Elétrica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPI	Células Epiteliais
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HE	Hematoxilina Eosina
Hz	Hertz
IF-TF	Espectroscopia de Infravermelho na Região Média
IN	Instrução Normativa
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LAB	Laboratório
LIN	Linfócitos
MAC	Macrófagos
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MHz	Megahertz
NUL	Nitrogênio Ureico do Leite
PMN	Polimorfonucleados
RBQL	Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite
RMSEP	Raiz Quadrada Média do Erro de Predição
SNG	Sólidos Não Gordurosos
UDESC	Universidade do Estado de Estado Catarina
UHT	Ultra High Temperature

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	13
1.1	LEITE: LEGISLAÇÕES E A CADEIA LÁCTEA.....	13
1.2	METODOLOGIAS DE ANÁLISE.....	15
1.2.1	Espectroscopia de infravermelho na região média (IF-TF).....	15
1.2.2	Citometria de fluxo.....	16
1.2.3	Microscopia ótica.....	18
1.2.4	Espectroscopia por bioimpedância elétrica (EBE).....	20
1.3	RESPOSTA IMULÓGICA E DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	21
1.3.1	Resposta imune inata e/ou inespecífica.....	21
1.3.2	Imunidade adaptativa e/ou específica.....	23
1.3.3	Mastite bovina.....	24
1.4	OBJETIVOS.....	27
1.4.1	Objetivo geral.....	27
1.4.2	Objetivos específicos.....	27
2	CAPÍTULO II.....	28
	ARTIGO I.....	29
	RESUMO.....	29
	ABSTRACT.....	29
	INTRODUÇÃO.....	30
	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
	RESULTADOS.....	37
	DISCUSSÃO.....	40
	CONCLUSÕES.....	46
	REFERÊNCIAS.....	46
	REFERÊNCIAS (DISSERTAÇÃO).....	56

1 CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 LEITE: LEGISLAÇÕES E A CADEIA LÁCTEA

Com o objetivo de padronizar e regulamentar a atividade leiteira no Brasil foram estabelecidas Instruções Normativas (IN), a citar IN 51/2002 (Brasil, 2002), 62/2011 (Brasil, 2011), 07/2016 (Brasil, 2016) e 31/2018 (Brasil, 2018), que especificaram os padrões de identidade e de qualidade do leite cru refrigerado, do pasteurizado e do tipo A. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa) publicou as IN que estabelecem os novos padrões para o leite comercializado no país, criando as IN 76, 77 e 78, em novembro de 2018 (Brasil 2018a, Brasil, 2018b, Brasil, 2018c).

A IN 76 trata das características e da qualidade do produto na indústria e descreve as análises que devem ser realizadas para a caracterização do leite, principalmente em laticínios. Na IN 77, são definidos critérios para a obtenção do leite dentro dos padrões de qualidade e seguro ao consumidor, os quais perpassam a organização da propriedade, as instalações e os equipamentos utilizados, a capacitação dos responsáveis pelas tarefas de manejo e o controle sistemático de mastites, brucelose e tuberculose. Por sua vez, a IN 78 estabelece os critérios a serem seguidos nas provas de produção. As normativas demonstram a prioridade e preocupação governamental de se obter um leite que possui melhor qualidade higiênica e que apresente maior quantidade de sólidos totais. A qualidade representa também menores perdas e maior valor agregado, o que pode gerar vantagens competitivas aos produtores e laticínios (MORAES e BENDER FILHO, 2017; POPESCU e ANGEL, 2019; MENEGHATTI *et al.* 2020).

Dessa forma, para assegurar a qualidade exigida pela legislação vigente, o país conta com a Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), composta por laboratórios credenciados junto ao MAPA, responsáveis pela análise do leite comercializado cru em todo o Brasil. Mensalmente, e de forma mandatória, os laticínios devem enviar pelo menos uma amostra de leite do tanque de expansão de cada produtor para a análise nos laboratórios credenciados com o objetivo de determinar o teor de gordura, proteína, sólidos totais, nitrogênio ureico, contagem padrão em placas (CPP) e a contagem de células somáticas (CCS) (IN 76, BRASIL, 2018a). Com

esses resultados, as indústrias e o MAPA, via RBQL, monitoram a qualidade do leite produzido em todo o país.

Segundo o IBGE (2020), a maior parte do leite captado pelos laticínios brasileiros tem sido realizada por estabelecimentos de grande porte que representam uma pequena parcela do total de laticínios existentes no País. De acordo com o Anuário 2021 da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (EMBRAPA, 2021), a produção de leite no Brasil alcançou 35 bilhões de litros em 2020, e a produção de leite inspecionado cresceu 2,1%, atingindo 25,53 bilhões de litros, o que corresponde a 72,94% da produção total nacional. Na produção por região, o Sudeste processou aproximadamente 10 bilhões de litros nos laticínios, seguido pela região Sul, com 9,682 bilhões de litros. Juntas, estas duas regiões representaram 77,1% do leite inspecionado no Brasil em 2020.

Com o crescimento exponencial da produção de leite no Brasil, a competitividade entre as indústrias do mercado lácteo tem aumentado, principalmente nas principais bacias leiteiras, o que segundo Antunes *et al.* (2020), é estratégico para os laticínios. Estes autores afirmam que para estes laticínios estarem nestas bacias leiteiras, devido ao volume que representam e à própria densidade de leite por área, dilui seus custos e facilita as atividades mercadológicas e de logísticas. Assim, o dinamismo nessas bacias leiteiras define a presença de mercado de cada laticínio, com a possibilidade de ampliação e redução da captação de leite e, principalmente a migração de produtores de um laticínio para o outro, o que é prática comum, devido ao sistema não ser integralizado como na produção de aves e suínos.

Dessa forma, as indústrias passaram a estabelecer requisitos para o recebimento do leite e a beneficiar o produtor conforme a qualidade da matéria prima recebida, seguindo os padrões de qualidade definidos nas instruções normativas. O objetivo é de, progressivamente, oferecer um pagamento diferenciado pela qualidade de leite entregue e não mais pelo volume de leite. Assim, os laticínios estabelecem um preço base de acordo com as variações em vendas no mercado e pagam valores extras, como forma de incentivos ou penalidades ao produtor, de acordo com os resultados obtidos nas provas de qualidade estabelecidas na IN 76. Exemplos são os teores dos constituintes do leite (gordura, proteína, lactose e sólidos), a CCS, CPP, além do sistema de ordenha usado na propriedade e das condições sanitárias do rebanho, como a certificação de propriedade livre de brucelose e tuberculose. É importante destacar que a relevância que cada parâmetro exercerá em um sistema de pagamento por qualidade, é de total responsabilidade da

política leiteira da empresa (MENEGHATTI *et al.* 2020).

1.2 METODOLOGIAS DE ANÁLISE

Em relação aos métodos de análise da qualidade do leite no Brasil, os métodos oficiais para determinação da composição química são descritos na IN 68 (BRASIL, 2006), complementados e/ou alterados pela IN 76 (BRASIL, 2018), quanto a parâmetros para composição e qualidade do leite, dos quais muitos ainda são utilizados em plataformas de recebimento em laticínios. Todavia, são onerosos por envolver a utilização de reagentes caros, mão de obra especializada e maior tempo por análise (VENTUROSOSO *et al.* 2007).

1.2.1 Espectroscopia de infravermelho na região média (IF-TF)

A RBQL utiliza o método de espectroscopia por infravermelho na região média, geralmente por meio dos equipamentos da marca Bentley (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, Estados Unidos), ou Foss™. Segundo Marin (2013), a espectroscopia de infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção que usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra.

Tradicionalmente, os métodos por espectroscopia na região do infravermelho são baseados no grau de absorbância de um referido comprimento de onda para a determinação dos constituintes da amostra avaliada. A espectroscopia de infravermelho na região média tem como princípio de que, ao se aplicar a radiação infravermelha sobre determinada amostra, parte da radiação aplicada será absorvida em determinada onda, produzindo vibrações dos átomos da molécula mensurada gerando um espectro de onda (STUART, 2004). O espectro obtido corresponde à quantidade de energia absorvida de todas as ondas, com determinada frequência aplicada sobre a amostra. Assim como ocorre em outros processos de absorção de energia, as moléculas, quando absorvem radiação no infravermelho, são excitadas para atingir um estado de maior energia. Segundo Pavia (2010), uma molécula absorve apenas frequências (energias) selecionadas de radiação no infravermelho, que equivalem às frequências vibracionais naturais de uma molécula, e a energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula, permitindo dessa forma analisar os comprimentos da onda.

Os avanços na informática e processamento de dados tornou possível o avanço da tecnologia de espectroscopia de infravermelho, ao se utilizar o interferômetro de Michelson, e da utilização do conceito matemático da transformada de Fourier. Isto permitiu que as análises se tornassem mais precisas, diminuindo o ruído do sinal analisado e possibilitando que todas as frequências de ondas fossem aplicadas ao mesmo tempo sobre uma amostra, gerando um interferograma que, por meio da transformada de Fourier, é convertido em espectro da amostra, reduzindo o tempo de análise e melhorando o processo de leitura dos dados (GRIFFITHS; HASETH, 2007).

A vantagem desse sistema está na alta precisão, pois a natureza dos elementos ópticos possui grande estabilidade e imunidade a interferências eletromagnéticas. Permite a análise de aproximadamente 400 amostras por hora, com eficiência na análise dos componentes do leite: gordura, lactose, proteína e sólidos totais. Além disso, não requer homogeneização da amostra (KUCEVIK et al. 2017). A desvantagem está aliada ao grande porte deste equipamento, o alto custo na aquisição e manutenção com reagentes e padrões para calibração e na complexidade dos circuitos ópticos da interferometria e no elevado custo do laser e dos demais componentes, tornando seu uso possível apenas em laboratórios e grandes indústrias.

A espectroscopia de infravermelho próxima é capaz de detectar o teor de gordura (absorbância próxima a $2854.\text{cm}^{-1}$ e $1746.\text{cm}^{-1}$), teor de proteína (absorbância próxima a $1548.\text{cm}^{-1}$), teor de lactose (absorbância próxima a $1048.\text{cm}^{-1}$), sendo que o teor de sólidos totais é calculado com base na soma dos sólidos individuais e de um valor fixo de minerais (LUNGE et al. 1993; MARTEL; PAQUIN; BUIJS, 1991). Pode se determinar também o nitrogênio ureico do leite (NUL), percentual de caseína da fração proteica do leite e, mais recentemente, a identificação de ácidos graxos (OLIVEIRA et al. 2012; MAURICE-VAN EIJDHOVEN et al. 2013). Todavia, outros métodos de análise são necessários para se avaliar o teor de células somáticas (CS) do leite, como será apresentado a seguir.

1.2.2 Citometria de fluxo

Devido a certa lentidão dos métodos empregados nas análises, como a microscopia óptica e de fluorescência, surge a citometria de fluxo em função de uma necessidade de análises mais rápidas e que permitam a automatização do sistema. A citometria de fluxo é uma técnica

de contagem de células e partículas, utilizada em analisadores fluo-opto-eletrônicos capazes de analisar simultaneamente diversos parâmetros de células ou partículas em suspensão, enquanto fluem através de uma câmara de fluxo muito estreita (funil) (VEIGA et al. 2017). O seu princípio está na incidência de uma fonte de luz laser que intercepta cada partícula ou amostra em movimento, e a dispersão da luz é analisada por um sensor que mede a dispersão da luz e a fluorescência emitida, fornecendo dados relativos ao tamanho e à granularidade da partícula (ADAN et al. 2017).

A distinção do uso do citômetro de fluxo está no tipo de material analisado e na finalidade da análise, uma vez que existem dois tipos de citômetros de fluxo: os citômetros não classificadores, que medem a dispersão da luz e a emissão de fluorescência, e os do tipo classificador que quantificam a dispersão e a fluorescência de células coradas em meio a outras células ou micro-organismos usando corantes específicos na técnica (WILKERSON, 2012). Essa tecnologia passou a ser aplicada em diversos seguimentos como medicina, biologia, engenharia e botânica. No Brasil, o primeiro citômetro de fluxo foi adquirido pela FIOCRUZ em 1988.

Em termos de qualidade do leite, esta tecnologia permite a determinação do número de CS e da contagem bacteriana (CB) dessa amostra (GUNASEKERA et al. 2000; PELVAN e UNLUTURK, 2015). Para análise de CS e CB no leite é utilizado o citômetro do tipo classificador. Dessa forma, nas amostras a serem analisadas para CS, é feita a adição de corantes, a exemplo do laranja acridina, brometo de etídio ou iodeto de propídio (PELVAN e UNLUTURK, 2015). A amostra então é diluída em uma solução, sendo posteriormente aspirada por um sistema de sucção até uma câmara de fluxo onde recebe uma irradiação laser de comprimento de onda específico, por exemplo, ultravioleta (355 nm); violeta-azul (405 nm), hélio-neônio (633 nm) ou argônio (488 nm) (CARVALHO et al., 2010). Tal comprimento de onda vai produzir um efeito de excitação nos elementos onde estão aderidos o reagente colorimétrico (corantes). Um sistema optoeletrônico mede as variações de potência de luz absorvidas ou refletidas pelos elementos biológicos, convertendo a contagem de células por meio de um software de computador, que aplica uma calibração conforme o tipo de elemento biológico analisado (VEIGA et al. 2017). A grande vantagem dessa técnica automática está na capacidade de análise de várias amostras por hora, o que permite agilidade na obtenção dos resultados. Todavia, o custo de análise é elevado devido principalmente pelo uso de reagentes e da necessidade de calibração periódica.

A contagem celular e de partículas por citometria de fluxo permitia apenas a quantificação numérica do conjunto de células somáticas e partículas presentes na amostra avaliada; todavia, mais recentemente foi lançado no mercado o Fossomatic 7DC com tecnologia da marca FOSS™. O Fossomatic 7DC realiza a contagem total e diferencial de células somáticas no leite cru e está disponível como parte do CombiFoss 7. Estudos avaliando a influência dos diferentes tipos celulares na composição e na alteração dos constituintes do leite são feitos há muitos anos tendo como metodologia base a de Prescott e Breed (1910). Os mais recentes estudos feitos por Pilla et al. (2012), Sharma et al. (2011) e Zecconi et al. (2018) concluíram que os diferentes tipos celulares influenciam e se correlacionam diretamente com alterações encontradas nos constituintes do leite. Contudo, esses estudos utilizaram diferentes preparos de amostras e lâminas para leitura e diferenciação celular no leite, como as técnicas descritas por Prescott e Breed (1910), ou Coles (1974) e Lee et al. (1980), sendo estas duas últimas citadas por Pilla et al. (2009).

Recentemente, um estudo feito por Stocco et al. (2020), com um grande número de amostras de leite de vacas individuais, na região da Lombardia na Itália, avaliou o uso do Fossomatic 7DC na diferenciação celular em proporção combinada de leucócitos polimorfonucleares e linfócitos, frente à composição do leite. Os resultados evidenciaram diminuição da gordura do leite e aumento nos ácidos graxos, frente ao aumento dos níveis dos diferentes grupos celulares. Por outro lado a proteína, caseína e suas proporções mostraram menores valores com o aumento de determinados grupos celulares.

1.2.3 Microscopia ótica

A calibração dos métodos de análise automáticos é feita utilizando como base a microscopia ótica direta. Neste sentido, é o método de referência utilizado para contagem de células somáticas, utilizado como método de calibração para as metodologias eletrônicas, amparados pelas ISO 13366-2/2006 e ISO 13366-1 (2008). A metodologia de preparo das lâminas (neste caso para CCS) foi padronizada por Prescott e Breed (1910) e serve como método de controle dos contadores automáticos, recomendado pelo Food and Drug Administration (FDA). A contagem microscópica direta tem sido preconizada como um dos métodos mais confiáveis para a determinação do número de células somáticas no leite, principalmente se forem

utilizados corantes específicos que possibilitam a diferenciação das células somáticas dos corpúsculos citoplasmáticos (ZENG et al. 1999).

A técnica baseia-se na contagem de células ou núcleos após a coloração, utilizando um microscópio óptico de bancada. O procedimento microscópico para contagem direta de células tem como princípio a distribuição de uma amostra do leite a ser analisada em uma área de lâmina microscópica conhecida. Após secagem, é feita a coloração, em que o corante adere ao DNA das células e, dessa forma, permite diferenciar as células dos constituintes de leite no processo de contagem e até mesmo quantificar o tipo de célula na amostra (Prescott e Breed, 1910). Esta é uma técnica clássica, todavia é utilizada atualmente.

Ao longo dos anos, o método evoluiu e a operação tornou-se mais simplificada, inclusive com a utilização de outras famílias de corantes, como o azul de metileno (NEWMAN, 1927; NEWBOULD e PHIPPS, 1967); hematoxilina e eosina (HE) (BENITES et al. 2001), e a coloração com May Grunwald-Giemsa, para o qual em avaliação prática, foram melhor evidenciadas a morfologia celular e a distinção de cores entre polimorfonucleadas e mononucleadas (VIANA et al. 2010).

Embora este seja o método considerando referência, existe também um consenso quanto a sua limitação de aplicação em escala, tempo, infraestrutura e outras dificuldades, e em como obter medidas precisas de um volume de leite na ordem de 0,01 mL e do preparo das soluções de coloração, exigindo pessoal altamente treinado.

Silveira et al. (2005) realizaram um estudo para determinação da CCS do leite bovino cru, para a qual coletaram amostras individuais de 48 vacas em lactação e compararam o método de análise de referência (contagem de células somáticas por microscopia direta) com o método automático pelo citômetro de fluxo (Somacount 300, Bentley Instruments, Estados Unidos). Neste trabalho, as médias observadas foram de 353.000 cél/ml no método de referência e 328.000 cél/ml no método de análise automática, os quais não diferiram estatisticamente. Machado et al. (2018), avaliaram o método de referência padronizada por Prescott e Breed (1910) em amostras de leite de 257 cabras, 513 metades mamárias e 10 tanques de expansão, em comparação com o método automático por citometria de fluxo, utilizando o Somacount 300 (Bentley Instruments, Estados Unidos), porém calibrado para leite bovino. Os autores concluíram que o equipamento utilizado superestimou em 2,1 vezes a CCS microscópica, no leite de cabra.

1.2.4 Espectroscopia por bioimpedância elétrica (EBE)

A técnica também conhecida como bioimpedância elétrica, é um método para caracterização da constituição de elementos biológicos, os quais incluem o percentual de gordura, células, tecidos e alguns tipos de fluidos com base em suas características elétricas (BARSOUKOV e MACDONALD, 2005; MARTINSEN e GRIMNES, 2011; VEIGA, 2013), representadas nesta metodologia pela impedância, a qual é expressa em Ohms. Essa técnica foi utilizada pela primeira vez para caracterizar a porção de água corporal por Thomasset, em 1962.

Basicamente, a técnica consiste em fazer fluir sobre o material biológico um conjunto de correntes elétricas com variação de múltiplas frequências de onda, onde alguns constituintes do material biológico avaliado vão apresentar diferentes excitações para cada região de frequência aplicada (MACHADO, 2018). E, segundo Grimnes e Martinsen (2000), para frequências inferiores a 100 kHz, a corrente predominante circula no espaço extracelular e para frequências maiores a corrente atravessa a membrana celular e percorre o espaço intracelular, tornando possível uma separação em diferentes espectros o material intracelular e extracelular. Neste sentido, segundo Veiga et al. (2013), é possível obter informações sobre a quantidade de membranas celulares presentes numa solução biológica, como estimar a contagem de células somáticas no leite bovino por exemplo, e a inferência da composição do leite para parâmetros como gordura, proteína, lactose, extrato seco e extrato seco desengordurado (MARTINS et al. 2017; SCHUMACHER et al. 2019; VEIGA e BERTEMES-FILHO, 2012). Além disso, ainda é possível identificar adulterantes no leite (DAS et al. 2015; DURANTE et al. 2016; VEIGA et al. 2017; DAS et al. 2018) e dessa forma permitir à indústria uma análise rápida para evitar fraude nos processos de obtenção, armazenamento, transporte e beneficiamento do leite (BERTOLINI e ROSSI, 2017).

Lopes et al. (2017) analisaram o leite UHT integral, semi e desnatado e, ainda, leite cru semi e desnatado, alterando de forma controlada, para mais ou para menos, os teores de gordura das amostras. Estas foram analisadas pelas metodologias padrão (método de Gerber) e por EBE, para as quais as frequências de ondas foram variadas entre 5Hz e 1MHz. Os resultados foram semelhantes aos encontrados pelo método de referência.

No estudo de Schumacher et al. (2019), a análise por bioimpedância elétrica foi utilizada para avaliar gordura, CCS, contagem bacteriana total (CBT), proteína, lactose, sólidos totais (ST)

e sólidos não gordurosos (SNG). Nas condições aplicadas no estudo, os coeficientes de correlação entre a impedância da amostra e os teores de ST e SNG foram de 0,45 e 0,53 ($p > 0,01$), respectivamente, uma correlação significativa, mas negativa de -0,26 com a CCS ($p > 0,05$). Esses resultados demonstraram potencial para estimar a composição do leite. Todavia, nota-se a necessidade de aumento da precisão da técnica.

1.3 RESPOSTA IMULÓGICA E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Os mecanismos de defesa das glândulas mamárias são constituídos por mecanismos físicos, celulares e moleculares. Esse conjunto de mecanismos é classificado em dois grupos, o de imunidade inata ou inespecífica e o de imunidade específica ou adaptativa.

1.3.1 Resposta imune inata e/ou inespecífica

Os patógenos envolvidos na mastite possuem muitos fatores de virulência que facilitam a colonização e infecção da glândula mamária. Segundo Carneiro et al. (2009), determinados patógenos podem evadir às defesas do hospedeiro ao se aderirem principalmente às células epiteliais, onde podem desenvolver cápsulas que dificultam o acesso, captura e destruição por parte dos agentes de defesa, principalmente os neutrófilos. Segundo os autores, esses patógenos produzem endotoxinas que destroem e inativam os leucócitos. Para se estabelecerem na glândula mamária e iniciarem o processo infeccioso, os patógenos necessitam inicialmente escapar da resposta imune inata. Cabe destacar que, embora inespecífica, essa resposta da imunidade inata influencia tanto na gravidade quanto na duração dos sintomas da mastite.

A resposta imune inata (ou inespecífica) é a primeira resposta do organismo nos estágios iniciais de infecção. Esse tipo de resposta é rápida e, portanto, não apresenta especificidade quanto ao tipo de patógeno envolvido na infecção, podendo ser caracterizada como uma “resposta pré-existente” do sistema imunológico. Dentre os principais componentes desse mecanismo temos a barreira física do canal do teto, células do sistema imunológico que migram para a glândula mamária (neutrófilos e macrófagos) e outros sistemas de defesa inespecíficos como lactoferrina e citocinas (SANTOS e FONSECA, 2019). Cabe destacar que, embora

inespecíficos, essa resposta da imunidade inata influencia tanto na gravidade quanto na duração dos sintomas da mastite.

Quanto as barreiras físicas, destacam-se algumas estruturas. O canal do teto tem como função primordial formar uma barreira física contra a entrada de micro-organismos. O canal do teto é circundado por um esfíncter e por uma camada de queratina que possui em sua composição ácidos graxos de cadeia longa com ação antimicrobiana e algumas proteínas que agem contra ação de bactérias (RAINARD e RIOLLET, 2006; CARNEIRO, 2009). No período entre ordenhas, esse anel constitui-se como uma barreira física contra a entrada de patógenos. Soma-se também a importante ação de um tampão de queratina, formado pela descamação das células do epitélio estratificado da parede do canal, formado principalmente no período seco (CARNEIRO et al. 2009).

Quanto às células do sistema imunológico, estas são a primeira linha de defesa celular do sistema imune inespecífico. Por este motivo, são as células que predominam nos primeiros estágios da inflamação. Os neutrófilos, também denominados polimorfonucleares (PMN), são o tipo celular predominante nos tecidos e nas secreções mamárias no início da inflamação e podem constituir 90% do total de leucócitos na glândula, permanecendo numerosos também nos processos crônicos, formado por dois a cinco lóbulos ligados por pontes delgadas de cromatina (PAAPE et al. 2003; SANTOS e FONSECA, 2019). Durante a mastite ou a involução da glândula, são as primeiras células a adentrar nos alvéolos (PAAPE et al. 2003), porém, atuam por curtos períodos, tendo em vista que sua ação é rápida, porém de curta duração (TIZARD, 2014). Os neutrófilos migram da circulação sanguínea para a glândula em resposta a uma grande variedade de mediadores inflamatórios, mas principalmente em resposta às citocinas.

As citocinas são um grupo de proteínas naturalmente produzidas e secretadas por uma grande variedade de células pertencentes ou não ao sistema imune atuam regulando parte da atividade das células que participam da imunidade inata e específica (TIZARD, 2014). Segundo Carneiro et al. (2009), essas substâncias ligam-se ao endotélio vascular, nos locais próximos à infecção, e os neutrófilos com receptores em suas membranas se aproximam por atração da parede interna do vaso sanguíneo, a medida que a velocidade de circulação do sangue reduz-se o suficiente. Os neutrófilos atravessam o endotélio e se transferem para o leite e para os sítios de infecção glandular. Uma vez no local de infecção, os neutrófilos fagocitam e inativam os patógenos. Exercem seu efeito bactericida mediante o fenômeno de “explosão respiratória”, que

produz espécies de oxigênio reativo, proteínas antibacterianas as quais eliminam ampla variedade de patógenos que causam mastite (CARNEIRO et al. 2009; TIZARD, 2014).

Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo: fagocitam e digerem fungos e bactérias. Os polimorfonucleados em geral atuam na inflamação, processo no qual há resposta do tecido no local da lesão. Na inflamação há aumento da permeabilidade vascular e, como consequência aumento do líquido intersticial. Células sanguíneas migram para o local da inflamação. Depois que o neutrófilo fagocita uma bactéria, por exemplo, a interação dos grânulos específicos e os azurófilos mata a bactéria e o neutrófilo morre e por fim passam a ser apoteóticos e são, então, fagocitados por macrófagos. O acúmulo de neutrófilos mortos e bactérias forma o pus (LIMA et al. 2018).

Os macrófagos, são estruturas que possuem função fagocítica e formam o grupo celular predominante na glândula mamária sadia e em involução. Segundo Santos e Fonseca (2019), como células fagocíticas, os macrófagos diferem dos neutrófilos em sua velocidade de resposta, que é menor, mas suas habilidades microbicidas são maiores, além de possuírem maior capacidade de desencadear a imunidade inata, pois quando estimulados, secretam uma mistura de citocinas que ativam a resposta imune. Atuam no controle da inflamação e no reparo de tecidos lesionados ao remover células mortas ou danificadas (CARNEIRO *et al.* 2009; LIMA et al. 2018).

O tecido da glândula mamária saudável e o leite contêm principalmente macrófagos, enquanto o tecido infectado e as secreções contêm principalmente neutrófilos. Quando os macrófagos reconhecem bactérias, liberam citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-16, estimulando a atividade bactericida dos neutrófilos, também produzindo prostaglandinas e leucotrienos, que aumentam a reação inflamatória local (TIZARD, 2014). Adicionalmente, os macrófagos também atuam de forma coordenada na apresentação dos antígenos bacterianos para os linfócitos e início da resposta imune específica (CARNEIRO et al. 2009).

1.3.2 Imunidade adaptativa e/ou específica

Quando os agentes patogênicos conseguem ultrapassar as barreiras e imunidade inata da glândula mamaria, ocorre o desencadeamento da resposta imune adquirida, na tentativa de eliminar o patógeno invasor. Após um primeiro contato com o agente causador da infecção, o antígeno, o sistema imune específico adquire memória (memória imunológica) contra esse

antígeno o reconhecendo. Dessa forma, desencadeia uma resposta mais rápida e eficiente na eliminação da infecção. Esse sistema envolve dois tipos celulares: os linfócitos B e T e as células apresentadoras de antígenos (CAA).

Os linfócitos T constituem um grupo variado de células com diferentes funções na resposta imune. Quando reconhecido os antígenos pelas CAA, os linfócitos T citocinas ativam a função dos linfócitos B, macrófagos e neutrófilos específicos envolvidos na resposta imune (TIZARD, 2014). Os linfócitos B tem como função a produção de anticorpos e ou imunoglobulinas específicas contra os agentes patogênicos. Isso ocorre após o reconhecimento do agente pelo linfócito T, ou seja, uma resposta imune eficiente depende da atuação dos linfócitos T no reconhecimento. As imunoglobulinas produzidas terão a função de marcar as bactérias, facilitando dessa forma o reconhecimento e fagocitose pelas demais células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos). As concentrações de imunoglobulinas variam de acordo com o estágio da lactação e a ocorrência de infecções recentes na glândula mamária (SANTOS & FONSECA, 2019). Segundo Lima et al. (2018), em uma glândula mamária sadia a concentração de imunoglobulinas no leite é de <1 mg/ml, enquanto no processo de infecção e no período de colostro, as concentrações podem chegar a >80 mg/ml de leite.

1.3.3 Mastite bovina

O maior desafio dentro da atividade leiteira é o controle da mastite, inflamação que afeta a glândula mamária e promove aumento no teor de CS advindas do quarto mamário afetado. As CS no leite são constituídas por células de defesa e epiteliais, sendo desta forma um parâmetro para monitorar a qualidade do leite quando da ocorrência de mastites. As células de defesa são os leucócitos, células que migram para o úbere quando este sofre alguma agressão, como por exemplo, nos casos de infecções. Os leucócitos fagocitam e digerem os microrganismos invasores. Do total de células somáticas, 75 a 98% são correspondentes a células de defesa e 2 a 25%, de células epiteliais, que são originados da descamação natural que ocorre no tecido secretor da glândula mamária (RIBAS, 2001; VIANA et al. 2010).

O aumento na CCS provoca uma queda na produtividade, além de influenciar na composição do leite, na atividade enzimática e no tempo de coagulação, dificulta a pasteurização e altera o rendimento e a qualidade dos derivados lácteos (ARASHIRO, 2006; MACHADO, 2008 apud MONTANHINI et al. 2013). A mastite bovina é o fator que mais provoca perdas

econômicas na cadeia produtiva do leite (MONTANHINI et al. 2013; MACEDO et al. 2018). Para suprir a demanda por produtos lácteos em quantidade e qualidade, é necessário que as perdas na produção de leite causadas pela mastite sejam quantificadas considerando as condições em que os rebanhos são explorados. As estimativas dos efeitos da mastite no desempenho das vacas leiteiras mostraram grande variação, o que pode ser atribuído às diferenças nas populações estudadas, aos indicadores de mastite e aos métodos estatísticos utilizados (MACEDO et al. 2018). Como principais alterações na composição do leite com CCS elevada, a literatura relata o aumento no teor de proteína, mas com uma redução na fração caseínica, além de redução nos teores de gordura e lactose (BALLOU et al. 1995 apud MACEDO et al. 2018). Por outro lado, Machado et al. (2000) relatam um aumento no teor de gordura em leites com elevada CCS.

De acordo com Macedo et al. (2018), o efeito da CCS na composição e na qualidade do leite avaliado em tanques de 230 rebanhos leiteiros de Minas Gerais e São Paulo, mostrou que rebanhos com baixa CCS apresentam redução da CBT; entretanto, rebanhos com média e alta CCS tiveram aumento nos teores de gordura, proteína bruta e sólidos totais. Com base nos indicadores de higiene e na composição do leite, foi observada correlação baixa e negativa entre CBT e gordura ($r = -0,0585$). Os rebanhos leiteiros com $CCS < 250.000$ células/mL apresentaram maior qualidade do leite de tanque; entretanto, considerando a composição, rebanhos com maior CCS tiveram maiores concentrações de gordura e proteína. Montanhini et al. (2013) avaliaram a influência da contagem de células somáticas sobre os componentes do leite. Foram avaliados os resultados de 156.465 amostras analisadas pelo laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), no período de julho a setembro de 2012. Nesse estudo, o teor de gordura apresentou correlação positiva com a CCS. Por outro lado, o teor de lactose e o extrato seco desengordurado (ou sólidos não gordurosos, SNG), apresentaram correlação negativa com a CCS. O teor de proteína total não sofreu influência da CCS; no entanto, a caseína apresentou correlação positiva com a CCS.

Um modelo de perdas de produção causadas pela mastite deve considerar outras variáveis que influenciam a produção de leite, como o número de dias em lactação, representado pela curva de lactação (REKAYA et al. 2001 apud MACEDO et al. 2018), a ordem de lactação, idade da vaca, a época do parto, a ocorrência de doenças no periparto e o escore de condição corporal ao parto (MONTANHINI et al. 2013; MACEDO et al. 2018). Dessa forma, fica comprovada a influência que a CCS tem sobre a composição do leite, com reflexos no aumento dos teores de

gordura, proteína bruta e sólidos totais. Com base nisso, pode-se dizer que o laticínio tem perdas pelo menor rendimento dos derivados processados de um leite com alta CCS.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Explorar o potencial do uso da espectroscopia de bioimpedância elétrica na contagem de células somáticas no leite bovino.

1.4.2 Objetivos específicos

Correlacionar os resultados das análises da CCS do leite bovino, realizados pelos métodos de citometria de fluxo, de espectroscopia de bioimpedância elétrica e, métodos diretos de análise referenciados pelas normas ISO. Correlacionar os resultados obtidos para CCS pelo método referenciado na ISO, com a diferenciação de células somáticas, componentes do leite e índices zootécnicos do rebanho.

2 CAPÍTULO II

MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações da revista científica:

International Journal of Dairy Technology

ARTIGO I

Uso da espectroscopia de bioimpedância elétrica para contagem de células somáticas no leite bovino

Use of electrical bioimpedance spectroscopy for somatic cell counts in bovine milk

RESUMO

Com a exploração do potencial do uso da espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE) para a contagem de células somáticas (CCS) no leite bovino, foram observadas correlações positivas e significativas entre este método e o método de referência (microscopia ótica). Foram observadas correlações significativas e positivas entre a CCS e linfócitos, macrófagos e polimorfonucleares. A citometria de fluxo foi à técnica que apresentou correlação mais alta com o método de referência para CCS. Todavia, a EBE apresentou resultados que apontam seu potencial de uso para análise de CCS no leite.

Palavras-chave: análise em tempo real, composição do leite, citometria de fluxo, diferenciação celular, microscopia ótica.

ABSTRACT

In exploring the potential of using electrical bioimpedance spectroscopy (EBE) for somatic cell counts (SCC) in bovine milk, positive and significant correlations were observed between this method and the reference method (optical microscopy). Significant and positive correlations were observed between SCC and lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear cells. Flow cytometry was the technique that showed the highest correlation with the reference method for SCC. However, EBE presented results that point to its potential use for analyzing SCC in milk.

Keywords: real-time analysis, flow cytometry, differential counting, optical microscopy.

INTRODUÇÃO

A contagem de células somáticas (CCS) é um parâmetro amplamente utilizado para monitorar a saúde do úbere e a qualidade do leite. A infecção da glândula mamária é considerada o principal fator que leva ao aumento da descamação celular no leite (Cunha *et al.* 2008; Della Libera *et al.* 2011). É necessário o uso de métodos e tecnologia específica para a análise e determinação da quantidade de células somáticas em amostras de leite.

O citometro de fluxo é uma tecnologia usada mundialmente nos laboratórios de análise de leite para a determinação da contagem de células somáticas. São calibrados de acordo com as normas da *International Organization for Standardization* (ISO) e possuem eficiência nos resultados atestado por diversos pesquisadores. Todavia, requer uso de reagentes, infraestrutura de logística, mão de obra especializada e possui alto custo de aquisição, tornando-se viável apenas para laboratórios com grande número de amostras. E devido ao tempo entre a logística de coleta, seja na propriedade ou laticínio, o envio, a análise da amostra e a divulgação do resultado, que pode demorar diversos dias. Assim, a praticidade deste serviço é de certa forma, inviável para o uso em manejos alimentares ou de secagem de animais, por exemplo, limitando a tomada de decisão pelos produtores.

Um novo método de análise investigado para composição e qualidade do leite, está baseado em espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE). Esse método já é utilizado para a caracterização de constituintes de elementos biológicos, os quais incluem o percentual de gordura, células, tecidos e alguns tipos de fluidos (Veiga, 2012; Martinsen *et al.* 2011). A utilização desta metodologia baseia-se em propriedades elétricas de materiais biológicos, as quais estão presentes na literatura científica desde 1871 (Epstein *et al.* 1983). As aplicações vão desde a separação no espectro de fluido intracelular e extracelular, composição corporal, até a estudos mais recentes com aplicação nas áreas de alimentos, água e leite (Pliquett, 2010; Berdanier *et al.* 2007).

A técnica consiste em fazer fluir sobre o material biológico um conjunto de sinais elétricos, que possuem múltiplos comprimentos de onda que ao atravessar pelo material biológico sofrem alterações que são detectadas por sensores, gerando diferentes espectros; com isso, os constituintes da amostra irão apresentar diferentes excitações para cada região de frequência aplicada (Veiga, 2013). Por meio de modelagem matemática e inteligência artificial (ou outros

processos de *machine learning process*), as distorções nos sinais de resposta são convertidas em informações, como número de células, por exemplo.

A composição do leite já foi determinada por EBE, a saber teores de gordura, lactose, sólidos totais e sólidos totais não gordurosos, além da contagem de células somáticas (CCS) e presença de adulterantes no leite (Durante *et al.* 2016; Martins *et al.* (2017), Veiga *et al.* (2017), Das *et al.* (2018) e Schumacher *et al.* (2019)). Por ser um método de análise em tempo real, pode permitir rápidas tomadas de decisões, sejam nas indústrias de recepção do leite ou mesmo em nível de propriedades rurais.

A criação e a validação de novas metodologias, com o objetivo de auxiliar o produtor rural na tomada de decisões, é uma iniciativa válida com o intuito de melhorar a cadeia láctea, e inclusive, torná-la mais transparente e dinâmica. Sabe-se que o preço pago pelo leite depende diretamente da qualidade do que é entregue para o laticínio. Segundo Roma Júnior *et al.* (2009), a bonificação chega a interferir no preço do leite em até 8,5%. Uma vez que a utilização da tecnologia de bioimpedância elétrica é nova no mercado lácteo, o objetivo com a realização deste trabalho foi explorar o potencial de uso dessa tecnologia, para a contagem de células somáticas no leite bovino. Especificamente, correlacionar os resultados das análises da CCS do leite, realizados pelos métodos de citometria de fluxo, de espectroscopia de bioimpedância elétrica e, métodos diretos de análise referenciado pelas normas ISO. Por fim, correlacionar os resultados obtidos para CCS pelo método referenciado na ISO, com a diferenciação de células somáticas, componentes do leite e índices zootécnicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados no presente experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), sob protocolo CEUA nº 7355030220.

Experimento 1 – Comparação entre métodos de referência para contagem de células somáticas por microscopia ótica

Foram coletadas amostras de leite da ordenha diária de cinco vacas da raça Holandesa, de

ordens de parto e dias em lactação distintos, criadas no sistema *compost barn* de uma propriedade comercial situada em Santa Catarina, Brasil. Anteriormente a ordenha, foram desprezados os três primeiros jatos de leite e realizado o *pre-dipping* nos animais. Foram utilizados coletores comerciais (Eurolatte®) acoplados a linha de ordenha, os quais coletam uma amostra representativa de toda a ordenha em frascos de plástico, previamente higienizados. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e transportadas imediatamente para o Laboratório de Morfologia da UDESC *campus* Chapecó para preparação das lâminas.

Para a contagem microscópica ótica, foram avaliadas as seguintes metodologias de preparo das lâminas: utilização de 10 μL de leite distribuídos em 1cm^2 (Prescott e Breed, 1910); 1 μL de leite, distribuído em 1cm^2 , e; 10 μL de leite distribuídos pela técnica do esfregado direto. As lâminas foram previamente desengorduradas com álcool, secas e flambadas, e preparadas em triplicata para cada vaca. Para coleta das alíquotas (10 μL e 1 μL) a serem distribuídas nas lâminas, os frascos foram homogeneizados e a amostra foi retirada do frasco com auxílio de micropipeta. A ponteira da micropipeta foi submetida cuidadosamente à secagem com papel na sua parte externa. Para o método de cm^2 , colocou-se o leite sobre a área previamente demarcada na lâmina, o qual foi espalhado sobre a lâmina na área do cm^2 com o auxílio da própria micropipeta, primeiramente contornando-se o quadrado demarcado e em seguida, preenchendo-se a área de maneira uniforme.

No preparo das lâminas por esfregado, a metodologia utilizada foi a de Antuñano e Schmunis (1988), adaptada por Mello *et al.* (2013), em que com uma micropipeta a amostra de leite (10 μL) foi colocada diretamente sobre uma lâmina de vidro (denominada lâmina A). Outra lâmina (denominada lâmina B) previamente desengordurada e seca foi usada para espalhar o leite por toda a superfície da lâmina A. Para isso, colocou-se a amostra de leite em contato com a borda da lâmina B, fazendo-se um movimento para trás, tocando-se a amostra de leite com o dorso em um ângulo 45° . Dessa forma, o leite se espalhou pela borda da lâmina B por capilaridade. A lâmina B então foi deslizada suavemente e uniformemente sobre a outra, em direção oposta à extremidade em que estava a amostra de leite. O leite foi espalhado pela lâmina, formando uma película uniforme de amostra.

Para todas as metodologias as lâminas foram secas ao ar por três horas, e fixadas utilizando solução de Carnoy por dez minutos, conforme descrito por Zeng *et al.* (1999). Após a fixação, as lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada e em seguida coradas com

corante hematoxilina e eosina (HE) por 8 segundos, conforme a metodologia de Benites *et al.* (2001). Após a coloração, as lâminas foram lavadas novamente em água destilada para remover o resíduo de corante. Dessa forma, a amostra de leite foi fixada e corada nas lâminas, em uma área aqui denominada de “mancha”.

Para a quantificação das células somáticas empregou-se duas metodologias de contagem em cada lâmina: uma pela contagem por faixas e outra por campos sucessivos, conforme descrito na ISO 13366-1 (2008). Brevemente, para a contagem em faixas ao longo da lâmina, foi utilizada uma objetiva de imersão de 100x e uma objetiva ocular de 10x. Com o auxílio do vernier do microscópio, foi determinada uma distância do início da borda esquerda/superior da mancha a ser contada na área do esfregaço ou do cm^2 . Esta borda foi de 0,5 mm, desconsiderada para início da contagem das lâminas (seja na área de 1 cm^2 ou no esfregaço) e dessa forma, iniciou-se a contagem observando a presença de células no primeiro campo de visão. Se nas bordas laterais verticais do campo de visão da faixa, a célula aparecesse de forma parcial (menor que a metade de sua superfície), não era contabilizada. Após a contagem do primeiro campo, movimentava-se a mesa continuamente, até atingir a borda inferior da mancha, em que todas as células encontradas eram contadas. Esse processo compreendia a contagem da primeira faixa da mancha. Para iniciar a segunda faixa, movia-se a mesa para a esquerda, a uma distância de 1 mm e iniciava-se uma nova contagem, movimentando a objetiva até atingir a borda superior, e assim sucessivamente até atingir a borda lateral direita da mancha. O resultado foi expresso aplicando-se a seguinte fórmula:

$$c = \frac{W_s \times N_t}{D_f \times N_b \times V_m} \times \frac{1}{d}$$

Em que:

W_s = Largura (mm) do esfregaço; N_t = Número total de células contadas; D_f = É o diâmetro (mm) do campo do microscópio; N_b = Número de faixas contadas; V_m = É o volume (mm) da amostra testada; d = Fator de diluição. Os resultados foram expressos em número de células/ml de leite.

Para a contagem por campos sucessivos ao longo da lâmina, foram utilizadas as mesmas objetivas de imersão e ocular, mesmo ponto de início para avaliação da lâmina e mesmos critérios para contagem. Após a contagem do primeiro campo movimentava-se a mesa numa

distância espacial fixa de 1 mm, estabelecendo um segundo campo de contagem até chegar na borda inferior/esquerda. Da mesma forma que na contagem por faixas, ao chegar à borda oposta da mancha, movimentava-se a mesa para a esquerda numa distância de 1 mm, iniciando-se uma nova contagem, movimentando a objetiva até atingir a borda superior, e assim sucessivamente até atingir a borda lateral direita da mancha. A ISO 13366-1 (2008) sugere a contagem de 100 a 200 campos ao longo da mancha. O resultado foi expresso aplicando-se a seguinte fórmula:

$$c = \frac{W_s \times L_s \times N_t}{\pi \times \left(\frac{D_f}{2}\right)^2 \times N_f \times V_m} \times \frac{1}{d}$$

Em que:

Ws= Largura (mm) do esfregaço; Ls= É o comprimento, em mm, da mancha; Nt= Número total de células contadas; Df= É o diâmetro (mm) do campo do microscópio; Nf= Número de campos contados completamente; Vm= É o volume (mm) da amostra testada; d= Fator de diluição; π valor de (3,14); Os resultados serão expressos em número de células/ml de leite.

Foram estimados os coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre as metodologias aplicadas, utilizando-se o procedimento PROC CORR do software Statistical Analysis System (SAS, versão 9.4).

Experimento 2 – Células somáticas no leite: correlação entre metodologias para sua determinação, diferenciação celular, componentes do leite e índices zootécnicos

Obtenção das amostras

As amostras de leite do tanque de expansão e de animal individual foram coletadas em propriedades localizadas no estado de Santa Catarina – Brasil, entre os meses de outubro de 2020 e janeiro de 2021. Foram analisadas 50 amostras oriundas de tanques colhidas conforme descrito em Dias e Antes (2012), onde imediatamente após a coleta foram transportadas em caixas

isotérmicas contendo gelo químico, para os Laboratórios da UDESC *campus* Chapecó, para preparação das lâminas e análises de composição e CCS, respectivamente.

As 50 amostras oriundas de animais individuais foram colhidas em propriedade comercial. O rebanho da propriedade era constituído de vacas das raças Holandesa, Jersey, Pardo Suíço e Girolando, com períodos de lactação e ordens de partos variados, criadas em sistema a pasto, ordenhadas duas vezes ao dia em sistema balde ao pé. A produção das ordenhas da manhã e tarde foram aferidas individualmente em balança eletrônica. O leite de cada ordenha foi homogeneizado com auxílio de concha e as amostras foram coletadas diretamente do taro de leite após a ordenha de cada animal (conforme ISO 707-2008). Cada amostra foi composta proporcionalmente, de acordo com a produção da manhã e da tarde, para atingir o volume final de 700 ml. O acondicionamento e transporte das amostras de leite de cada animal seguiu os mesmos procedimentos descritos para as amostras de tanque.

Posteriormente, ambas as amostras de tanque e de cada animal foram divididas em 12 alíquotas de 50 mL, sendo em 9 delas adicionado o conservante Bronopol® em forma de comprimido (0,02% m/v) e três delas sem o conservante, refrigeradas em geladeira a 4 °C. As amostras foram analisadas quanto aos teores de gordura total (GOR), proteína total (PRO), extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD) e, análise da contagem de células somáticas por diferentes metodologias, como descrito a seguir.

Análises de composição, células somáticas e diferenciação celular

Para análise da composição do leite, foram utilizados os métodos padronizados pelas metodologias ISO como sendo métodos de referência. A GOR foi analisada pelo método de Gerber (ISO 19662, 2018), utilizando-se amostra com conservante, em duplicata. A PRO foi determinada pelo método de micro-Kjedahl (ISO 8968-3/IDF 20-3, 2004), e o EST foi determinado pelo método gravimétrico (ISO 6731/IDF 21, 2010), ambas em triplicata. A PRO e o EST foram analisados em alíquotas de amostras sem conservante e o ESD foi determinado pela diferença entre a GOR e o EST.

Para a contagem de células somáticas foi considerada como referência no presente trabalho a metodologia descrita no Experimento 1, ou seja, a preparação de lâminas utilizando-se 1 µL de leite delimitado a 1 cm² de área de lâmina, contadas pelo método em faixas. Cada lâmina

foi lida por microscopia ótica, e 100 células foram contadas e diferenciadas entre linfócitos (LIN), polimorfonucleados (PMN) e, macrófagos somados a células epiteliais (MAC+EPI). As diferenciações celulares seguiram a descrição da ISO 13366-1 (2008). Os macrófagos foram contados juntamente com células epiteliais, conforme descrito em Pilla *et al.* (2012), pois segundo estes autores os macrófagos nem sempre podem ser distinguidos de células epiteliais. Foram contadas entre 100 e 200 células e realizado o mesmo tipo de diferenciação celular de acordo com Pilla *et al.* (2012), todavia, com uma preparação prévia diferente das amostras de leite para leitura por microscopia ótica. Após obtenção da contagem de 100 células, a porcentagem de cada tipo celular foi transformada, proporcionalmente, em números de células totais na amostra, de acordo com seu valor de CCS.

A análise de CCS por citometria de fluxo, foi realizada em dois laboratórios pertencentes à Rede Brasileira de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), denominados LAB 1 e LAB 2, sendo três alíquotas distintas de cada amostra com conservante. Ambos determinam a CCS utilizando-se equipamento Somacount FC[®] (Bentley Instruments, Chaska, MN, EUA), calibrados conforme a ISO 9622 - IDF 141 (2013).

Por fim, a análise da CCS por espectroscopia de bioimpedância elétrica foi realizada utilizando-se um espectrômetro comercial (BIOSpec[®]), composto por sonda tetrapolar, conectados a um software. As análises foram realizadas em três alíquotas de cada amostra, sem conservantes. Os modelos de regressão utilizados pelo software do espectrômetro para estimar os constituintes do leite também foram avaliados nos softwares Unscrambler (CAMO Analytics, Japão) e Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), em que foram exploradas um total de 29 frequências (de 50265 a 6283185 rad.s⁻¹), sendo duas em baixa frequência (0 a 314159 rad.s⁻¹), 22 em média frequência (314 a 628318 rad.s⁻¹) e cinco em alta frequência (628318 a 6283185 rad.s⁻¹). Três versões de calibração para amostras de tanques de expansão e cinco versões de calibração para amostras individuais por vaca foram fornecidos pela empresa fabricante do equipamento em desenvolvimento.

Cada versão foi desenvolvida baseada em um banco de dados próprio da empresa (obtido de análises de composição e CCS analisados por métodos preconizados por normas ISO, as quais resultaram em modelos preliminares básicos), sendo que cada versão foi determinada por regressão parcial de mínimos quadrados (PLS). Estas regressões foram submetidas a uma análise realizada com inteligência artificial convencional (*machine learning process*), onde algoritmos

foram gerados com o objetivo de melhorar a assertividade de cada versão testada, uma vez que a técnica tem como base inferir a CCS a partir de padrões na curva que se relacionam, tanto com a presença de membranas celulares quanto a outras variações, em função da composição do leite.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em que foram correlacionados os resultados das análises baseados em distintas metodologias, a saber: análise realizada pela metodologia de referência ISO; análise por EBE (com diferentes versões de calibração do equipamento), análise por citometria de fluxo, nos laboratórios denominados LAB 1 e LAB 2 (distintos e credenciados pela RBQL). Inicialmente, foram estimados os coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis CCS obtidas pelos métodos referência, IF-TF (LAB 1 e LAB 2) e entre as diferentes versões da EBE, para amostras de tanque de expansão e de animais, individualmente. Os coeficientes de correlação e de determinação ajustados, a determinação do bias e raiz quadrada média do erro de predição (RMSEP) foram calculados utilizando-se o *software R Studio*® (R Development, Core Team). Além disso, os coeficientes de correlação linear de Pearson também foram estimados entre os valores de CCS obtidos de amostras de tanques de expansão e as variáveis GOR, PRO, EST, ESD e os tipos celulares LIN, MAC+EPI e PMN; e entre as variáveis CCS obtidas de amostras de animais individualmente, e as variáveis GOR, PRO, EST, ESD, e os tipos celulares LIN, MAC+EPI e PMN somados aos dados zootécnicos de produção (kg leite/vaca/dia), ordem de parto, dias em lactação e idade das vacas (meses). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p < 0,05$.

Por fim, a CCS, as porcentagens de diferentes células e os constituintes do leite de amostras individuais e de tanque de expansão foram comparadas entre si. Para dados em que não houve distribuição normal de resíduos, foi realizada análise não-paramétrica, pelo teste de Krsukal-Wallis (5%) e para dados com distribuição normal dos resíduos, foi realizado de teste de Fisher-Snedecor (5 %).

RESULTADOS

Experimento 1

Considerando as diferentes metodologias de preparo de lâminas, bem como seu método

de contagem, todas as correlações avaliadas foram significativas e com coeficientes de correlação altos e positivos (Tabela 1). Estes valores indicam que as metodologias apresentaram alta correlação e podem ser utilizadas para a quantificação do número de células somáticas em leite bovino. Frente aos resultados obtidos no Experimento 1, o método de preparo de lâminas em 1 cm² e a contagem em faixas foi adotado para execução do Experimento 2.

Experimento 2

Os valores médios das 50 amostras de leite oriundas de tanques de expansão e de animais individualmente, para as variáveis de contagem de células somáticas (CCS) pelos diferentes métodos e versões dos equipamentos avaliados, diferenciação celular, composição e dados zootécnicos encontram-se na Tabela 2. Os teores de PRO, ESD e CCS obtida pelo método de referência diferiram entre amostras de tanque de expansão e amostras individuais dos animais ($p=0,0486$, $p=0,0448$ e $p<0,0001$, respectivamente). Os resultados obtidos para CCS pelo método de citometria e por EBE serão discutidos posteriormente.

Quanto à diferenciação celular, considerando as porcentagens médias verificadas, a menor proporção média foi para LIN, tanto em amostras individuais dos animais quanto para as de tanques de expansão, as quais diferiram entre si ($p=0,0006$). Foi observada maior proporção de MAC+EPI em amostras oriundas de tanques de expansão em comparação às amostras individuais de animais ($p=0,00634$). Os valores médios para PMN também diferiram entre si para amostras de tanque *vs.* Animais individuais ($p=0,00018$). Estas proporções (porcentagens celulares) quando convertidas em números de células, ou seja, quando as proporções foram calculadas em relação ao valor de CCS pelo método de referência, demonstram indiretamente informações distintas sobre as condições de saúde da glândula mamária dos animais, ou rebanhos avaliados.

Com relação à determinação da CCS por diferentes metodologias (ou oriundas de diferentes laboratórios), os laboratórios credenciados para RBQL (LAB1 e LAB2) apresentaram os maiores coeficientes de correlação e de determinação, assim como menor bias e RMSEP em relação ao método de referência, para ambos os tipos de amostras analisadas (Tabela 3). Todas as versões avaliadas para a EBE se correlacionaram positivamente e foram significativas, em relação ao método de referência, com melhores resultados para a versão EBE0 para amostras oriundas de animais individuais. Ainda, todas as versões apresentaram valores similares de

coeficientes de correlação e de determinação entre si. Por outro lado, quando amostras de tanque de expansão foram avaliadas, a versão EBE2 não foi significativa, e os resultados (coeficientes de correlação e determinação, assim como bias e RMSEP) foram inferiores aos encontrados em relação às amostras oriundas de animais individuais.

Os dados apresentados na Tabela 3 têm o intuito de validação do método de EBE frente à análise de referência, que é a microscopia ótica. Todavia, as correlações entre todas as metodologias utilizadas no presente trabalho, além de suas correlações com os tipos celulares que compõem a CCS avaliados, são apresentadas na Tabela Complementar. Pode-se observar que todos os métodos de análise se correlacionaram de forma significativa e positiva entre si e, entre os tipos celulares, tanto para amostras de leite individuais dos animais como para as de tanques de expansão. Maiores coeficientes de correlação foram observados entre os métodos de referência e por citometria de fluxo (LAB 1 e 2), e todos os métodos foram sensíveis aos diferentes tipos celulares.

Quanto às correlações avaliadas entre as variáveis oriundas de amostras de animais individuais (Tabela 4), não foram observadas correlações significativas entre a CCS e os dados zootécnicos, a saber, ordem de parto, idade, DEL, e produção diária. A idade e ordem de parto se correlacionaram positivamente entre si ($p < 0,0001$). Não foram observadas correlações significativas entre a CCS e os componentes do leite analisados (GOR, PRO, EST e ESD). Todavia, foram observadas correlações significativas e positivas entre EST e GOR, EST e PRO, ESD e PRO e entre ESD e EST. Com relação à diferenciação celular, observaram-se correlações significativas e positivas entre as mesmas, a saber, entre LIN e MAC+EPI, LIN e PMN e, entre PMN e MAC+EPI. Não foram observadas correlações significativas entre os componentes do leite e os diferentes tipos celulares componentes da CCS. E finalmente, foram observadas correlações significativas e positivas entre CCS e diferentes tipos celulares, a saber, entre CCS e LIN, CCS e MAC+EPI e entre CCS e PMN.

Para amostras oriundas de tanques de expansão, da mesma forma que para amostras individuais dos animais, não foram observadas correlações significativas entre CCS e os componentes do leite analisados. Observaram-se correlações significativas e positivas entre os seguintes componentes do leite: GOR e PRO, GOR e EST, EST e PRO, PRO e ESD, e entre EST e ESD. Com relação à diferenciação celular, observaram-se correlações significativas e positivas somente entre LIN e MAC+EPI e LIN e PMN. Não foram observadas correlações significativas

entre os componentes do leite e os diferentes tipos celulares componentes da CCS, à exceção de uma correlação fraca mas significativa e negativa entre o teor de PRO e os PMN. Da mesma forma, como para amostras individuais dos animais, foram observadas correlações significativas e positivas entre CCS e diferentes tipos celulares. Imagens das lâminas preparadas no presente experimento, que apontam os diferentes tipos celulares, são apresentadas na Figura 1.

DISCUSSÃO

Em relação à praticidade da metodologia, o tempo médio de contagem do número de células somáticas pelo método do cm^2 com a leitura em faixas foi cerca de 40% menor que pelo método esfregaço (dados estimados), o que pode aperfeiçoar as análises laboratoriais. Entretanto, é uma análise que depende de treinamento prévio, principalmente, na identificação das células. As metodologias de bancada são utilizadas como método de referência nos processos de calibração dos contadores automáticos, e é de extrema importância padronizar metodologias que sejam práticas e que permitam visualizar as células com clareza para que se tenham resultados precisos.

A contagem de células somáticas é um indicador indireto da qualidade do leite e da saúde dos animais de uma propriedade leiteira. Neste sentido, recentemente o governo brasileiro revisou os limites exigidos para a CCS, com o intuito de melhorar a qualidade do leite produzido no país, que atualmente é de 500 mil céls/mL (IN 76, Brasil, 2018a). Na presente pesquisa, foram avaliados dois tipos de amostras de leite: as oriundas de animais, coletadas de forma individual em uma propriedade rural, e amostras de tanques de expansão, as quais representam valores médios dos rebanhos de determinada região. O valor médio de CCS observado nos tanques de expansão atende o preconizado pela legislação vigente. Marin *et al.* (2021) em recente pesquisa, afirmaram que 60% dos produtores familiares cooperados, em um município próximo ao local da realização desta pesquisa, apresentam conformidade para a CCS, considerando a IN 76. Os mesmos autores, após levantamento detalhado dos sistemas de produção na região, concluem que há uma necessidade contínua de orientação quanto a melhoras em diversos aspectos de manejos nas propriedades leiteiras, que visem aumento de produção e da qualidade do leite.

Não somente em nível de qualidade de leite em tanques de expansão, é fundamental que os produtores de leite possam identificar animais acometidos por mastite, tanto visando manter sua saúde como obter leite de melhor qualidade. Em termos práticos, não é incomum se encontrar

rebanhos com ampla faixa de CCS no leite. Todavia, a análise mais acurada desta CCS geralmente depende de equipamentos e mão de obra específica que a inviabiliza em nível de propriedades leiteiras. Dessa forma, majoritariamente o produtor depende de análises realizadas pelos laboratórios da RBQL, contudo, sua periodicidade é mensal, e cabe ao laticínio realizar somente no tanque e não por animal, que de certa forma, apresenta-se onerosa. Neste sentido, destaca-se que a busca por uma ferramenta que possa gerar resultados de composição, CCS, dentre outros parâmetros ao produtor rural em tempo real sobre a situação do seu rebanho, podem auxiliar técnicos e produtores de quaisquer níveis tecnológicos na tomada de decisões para melhora de seus níveis e características produtivas, em qualquer escala de produção.

Ressalta-se que a busca por análises complementares àquelas realizadas por exigência legal, não visam sua substituição, mas sim servir como ferramentas para melhoria do sistema produtivo, como é o caso da EBE, avaliada no presente estudo. Tanto que, primeiramente foram avaliadas as correlações entre o método de referência de microscopia ótica e o método de citometria de fluxo, baseados no fato de que a microscopia ótica é o método de calibração de contadores automáticos, conforme descrito na ISO 9622 - IDF 141 (2013). Os coeficientes de correlação obtidos para CCS, considerando tanto amostras individuais de animais quanto de tanques de expansão, não atenderam o valor mínimo estabelecido pela norma ISO 8196-1 (2009) que é de 0,98 (Tabela 3).

Resultados semelhantes foram encontrados por Evangelista et al. (2008), os quais também observaram correlação positiva e alta entre a citometria de fluxo e a microscopia ótica, avaliando leite submetido a diferentes tratamentos térmicos ($r=0,83$ em leite cru; $r=0,89$ em leite pasteurizado e $r=0,52$ em leite esterilizado) em amostras individuais de vacas. Da mesma forma, Gunasekera *et al.* (2003) observaram correlação alta e significativa ($r=0,88$) entre os métodos de citometria de fluxo e de contagens microscópicas diretas na CCS em amostras de leite cru. Essa correlação com valores inferiores ao estabelecido pela ISO 8196-1 (2009) pode estar relacionada a falhas no método, pois, na citometria de fluxo, todos os núcleos corados são contabilizados, e dessa forma, o equipamento não conta diretamente às células, mas sim a quantidade de material nuclear. De acordo com Andrade *et al.* (2009), o rompimento das células não compromete a contagem, a não ser que os núcleos percam a capacidade de absorver o corante. Na microscopia ótica, apenas células intactas são contadas. Além disso, o “fator humano” pode inferir a erros na observação e identificação celular, além de possíveis falhas na preparação e coloração de

lâminas, irregularidade na distribuição de células somáticas nas lâminas, dentre outros.

Quanto à avaliação do método de EBE, todas as calibrações do equipamento avaliadas para animal se correlacionaram positivamente e foram significativas para CCS entre este método e o método de referência (p Valor entre 0,40 e 0,48). Para amostras de tanque, somente a versão EBE2 não foi significativa. As correlações positivas entre a CCS, estimadas pelos métodos de referência e EBE, podem ser consideradas um avanço aos resultados apresentados por Schumacher *et al.* (2019). Estes autores encontraram correlação significativa, porém negativa, entre o valor da bioimpedância e os valores de CCS estimados por citometria de fluxo. Todavia, na presente pesquisa, os valores de bioimpedância obtidos pelo método EBE foram submetidos posteriormente a análises matemáticas e de inteligência artificial, as quais potencialmente melhoraram a estimativa dos valores de CCS.

Ressalta-se que a estimativa da CCS por EBE pode sofrer interferência de diversos fatores, e embora tenha apresentado menores valores de r em comparação aos métodos de referência ou de citometria de fluxo, a EBE foi capaz de prever os valores de CCS, o que pode permitir ao produtor rural identificar um animal acometido com mastite, uma vez que CCS acima de 200.000 céls/mL pode ser considerado um parâmetro para se distinguir animais saudáveis vs. os acometidos por mastite (IDF, 2013).

O trabalho de Schumacher *et al.* (2019) a CCS, assim como a CBT, lactose e SNG não apresentaram interações suficientes quando consideradas para elaboração de modelos matemáticos preditivos para a composição do leite e, portanto, no referido trabalho a CCS não foi apresentada. Contudo, a presente pesquisa apresenta um avanço quanto à tecnologia e desenvolvimento do uso da bioimpedância para determinação dos componentes do leite, como demonstrado por Breitenbach (2021), ou de sua qualidade sanitária, no caso a CCS. O método de EBE avaliado, bem como seus softwares aliados a distintas versões de calibração e inteligência artificial, foi capaz de estimar valores para a CCS do leite bovino (tanto para amostras de leite individuais de animais quanto para tanques de expansão), com coeficientes de correlação significativos, e entre 0,40 e 0,48, considerando as diferentes calibrações do equipamento (Tabela 3).

Estes valores de correlação encontrados para a CCS, entre os métodos de EBE podem ser considerados moderados quando comparados aos determinados por métodos de referência ou por citometria de fluxo. Esta diferença pode ocorrer pelo fato de que, além de o leite possuir centenas

de componentes, os próprios tipos celulares que o compõe variam amplamente. Haja vista a diferente proporção de tipos celulares que compõe as CS, bem como a natureza da amostra (se de um animal ou de tanque de expansão). Uma vez que a bioimpedância é baseada em mensurar diferentes oposições à passagem de uma corrente elétrica (alternada) sobre uma determinada amostra, é possível admitir que, por exemplo, diferentes tipos celulares sejam fontes de variação para esta determinação. Isto porque, por exemplo, macrófagos tem tamanhos entre 8 e 30 μm , PMN entre 10 e 14 μm , linfócitos entre 5 e 10 μm e células epiteliais, entre 10 e 14 μm (ISO 13366-1, 2008). Ainda, existem diferentes tipos de macrófagos (M1 e M2), com distintos receptores de superfície, como descritos por (Neves 2015).

Linfócitos possuem citoplasma mais abundante em comparação a outras células de defesa e, também apresentam diferentes tipos (T, B e natural killers - NK) (Coelho et al. 2009). Outro aspecto é o levantado por Grimnes e Martinsen (2000), que citam que para frequências inferiores a 100 kHz, a corrente predominante circula no espaço extracelular e, para frequências maiores, a corrente é capaz de atravessar membranas celulares e percorrer o espaço intracelular, tornando possível uma separação em diferentes espectros, o material intracelular e extracelular. Na presente pesquisa, as frequências variaram entre 0,8 e 1000 kHz. Neste sentido, estas diferenças entre as células podem gerar alterações ou respostas distintas quanto à sua resistência a correntes elétricas utilizadas no método de EBE, ou até mesmo gerarem espectros diferenciados, uma vez que possuem diferentes lipídeos e proteínas em sua composição.

Percebe-se que estas características biológicas de, por exemplo, tamanhos celulares e de composição de membrana, podem interferir de maneira mais contundente uma metodologia baseada em EBE do que citometria, ou mesmo a microscopia ótica, uma vez que estes fatores não interferem nestes dois últimos tipos de métodos citados avaliados. De fato, a citometria ou a microscopia baseiam-se em coloração de núcleos celulares com corantes específicos, não havendo relação com a morfologia celular para sua determinação quanto à contagem.

Com relação às correlações entre CCS e os componentes do leite, não foram observadas correlações significativas para as amostras individuais de animais e de tanque. Esse resultado vai ao encontro dos dados apresentados por Faria *et al.* (2020), os quais avaliaram vacas com os níveis de CCS considerados baixos (<250.000 cel/ml) ou altos (>251.000 cel/ml) e correlacionaram os dados com os constituintes do leite. Nesse estudo, o nível de CCS afetou significativamente os teores de gordura do leite ($p < 0,05$) sendo que a gordura foi menor para

animais com alta CCS (3,02%) em comparação com animais que apresentavam baixos níveis de CCS (3,8%).

Em relação à variação da gordura do leite em relação à CCS, existem relatos na literatura de aumento, diminuição e da não alteração desse constituinte (Cunha *et al.* 2008; Vianna *et al.* 2008 e Faria *et al.* 2020), pois, é uma condição que está ligada a fatores que envolvem animal, alimentação e níveis de estresse em que o animal é submetido (Faria *et al.* 2020). Contudo, pode estar relacionado com a diminuição da produção de leite ocasionada pela infecção da glândula mamária ou pela redução da capacidade da secreção de gordura pelos alvéolos. Nesse estudo, os demais constituintes do leite não foram afetados por um aumento na CCS em nível de animal.

Considerando o efeito da contagem diferencial de células somáticas na composição de amostras individuais de leite e de tanque, os resultados mostraram que as diferentes composições celulares encontradas no leite não influenciam nos teores dos constituintes. Contudo, quando avaliado os efeitos da diferenciação celular sobre a CCS, observou-se uma correlação linear e positiva para os todos os tipos celulares avaliados, com maiores aumentos observados para PMN e de uma forma menor, mas em escala igual para os MAC+EPI e LIN. Stocco *et al.* (2020), avaliaram a influência de diferenciação celular na composição do leite e exploraram o efeito combinado entre a CCS e diferenciação celular sobre a qualidade do leite em diferentes grupos de vacas com diferentes escores de CCS. Os resultados observados foram que, amostras de leite oriundas de animais com elevada CCS apresentaram diminuição nos valores de lactose (4,80%), e valores mais altos de gordura (3,74%) e proteína (3,53%) em comparação com amostras avaliadas dos animais com CCS baixa.

Em relação ao efeito da diferenciação celular, esses mesmos autores evidenciaram que um alto número de células PMN foi associado com redução de gordura, comportamento não observado nesse estudo nas amostras de animais e de tanque. Contudo, foi observada uma correlação significativa entre PMN e proteínas nas amostras de tanque.

Segundo Verdi *et al.* (1991), os PMN têm diferentes perfis enzimáticos, com diferentes atividades de degradação de proteínas e caseínas em relação aos macrófagos. Em particular, a extensão da atividade de degradação muda de acordo com a quantidade de uma determinada população de células, nesse caso, os PMN, pois há maior liberação de enzimas proteolíticas pela mudança na proporção de células causada por uma possível infecção na glândula mamária, dessa forma gerando uma resposta imune. Ainda, pode-se dizer que com o aumento dos PMN se tem

um aumento dos macrófagos e dos linfócitos, dado confirmado quando correlacionado os tipos celulares no presente estudo. Esse fator também pode estar relacionado com uma diminuição no teor de proteína no leite devido à ação dos macrófagos no processo de engolfamento de patógenos, onde esse processo resulta na produção de 5 a 6 vezes mais proteases que o PMN. Segundo Damm *et al.* (2017), leite com baixa CCS frequentemente é associado a animais saudáveis e, portanto, é caracterizado por um número relativamente alto de macrófagos e linfócitos e baixo PMN, enquanto o oposto é esperado quando encontrado um alto número de PMN.

Recentemente, pesquisas como as de Stocco (2020) e de Schwarz (2020) demonstram que a diferenciação celular dentre as células somáticas, contribuem com diferentes respostas sobre a qualidade e composição do leite. Estes autores demonstram claramente alterações na concentração da gordura do leite e o aumento nos ácidos graxos com o aumento da CCS em associação com as variações na quantidade de células diferenciais, enquanto a proteína, caseína e suas proporções mostraram seus menores valores com o aumento da CCS, em associação principalmente a PMN. Ainda segundo esses autores, a interação entre CCS e os diferentes tipos de células foi importante para avaliar o índice de lactose e caseína, pois eles variaram de forma diferente em alta e baixa CCS e de acordo com a proporção dos tipos celulares encontrados. Dessa forma, esses estudos apresentam uma nova perspectiva para análise da qualidade do leite em nível mundial, uma vez que laboratórios poderiam prover esta tecnologia a produtores e à indústria. Todavia, estes resultados (correlação entre componentes celulares e componentes do leite) não foram observados na presente pesquisa. Primeiramente, porque estes trabalhos utilizaram-se de citômetros de fluxo automáticos para diferenciação celular.

Esta é uma tecnologia relativamente recente e foi apresentada e utilizada por Damm *et al.* (2017) e Zecconi *et al.* (2018), para uso em análises de rotina e, possivelmente, devido ao número de amostras avaliadas. Contudo, ressalta-se que a presente pesquisa, além de avaliar as correlações entre tipos celulares e a composição do leite (ou até mesmo a correlação de dados zootécnicos com composição e qualidade), buscou, parcialmente baseado nas normativas ISO, também verificar a acurácia de métodos alternativos para avaliar a qualidade do leite, no caso a EBE. Para esta validação, segundo a ISO 8196-1 (2009), são necessárias no mínimo duplicatas de amostras, as quais na presente pesquisa foram analisadas em triplicata. Todavia, o número de laboratórios envolvidos nas análises não foi o preconizado pela ISO citada. Neste sentido, sugere-

se que mais pesquisas sejam realizadas, por exemplo, verificando a relação entre a análise da diferenciação celular obtida por meio de microscopia ótica, citômetro de fluxo e a EBE, e que se envolvam mais laboratórios para se atingir a repetibilidade preconizada.

CONCLUSÕES

A espectroscopia de bioimpedância elétrica apresentou resultados que apontam seu potencial de uso para análise de CCS no leite, uma vez que foram encontradas correlações significativas e positivas entre este método de análise e o método de referência. Todavia, a citometria de fluxo foi à técnica que apresentou correlação mais alta com o método de referência para CCS. A CCS não influenciou os resultados de qualidade do leite, observados tanto em amostras de leite individuais dos animais quanto advindas de tanques de expansão. A CCS foi correlacionada entre os tipos celulares, com predominância de PMN para amostras de animais e para amostras de tanques de expansão.

REFERÊNCIAS

- Andrade UVC, Hartman W e Masson ML (2009). Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. *Ars Veterinaria* **25** 129-135.
- Breitenbach, P (2021). Espectroscopia de bioimpedância elétrica como ferramenta de avaliação da composição de leite e CCS. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC Oeste. 67p.
- Benites NR, Melville PA, Costa EO (2001). Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott & Breed utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina. *Revista Napgama* **3** 6-9.
- Coles, E. H. (1974). Leukocytes. In: *Veterinary Clinical Pathology*. 2nd ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA. **02** 40–98.
- Cunha RPL, Molina LR, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Ferreira PM, Gentilini MB (2008). Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite de vacas da raça Holandesa, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **60(1)** 19- 24.
- Damm M, Holm C, Blaabjerg M, Bro e Schwarz D (2017). Differential somatic cell count novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs.

Journal of Dairy Science **100** 4926–4940.

Della Libera, AMMP, Souza, FN, Blagitz, MG, Batista, CF (2011). Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. *Arquivo Instituto de Biologia* **78** 297-300.

Epstein B, Foster K (1983). “Anisotropy in the dielectric properties,” in *Medical and Biological Engineering and Computing* **21** 153-209.

Evangelista, D. (2008). Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária, Belo Horizonte.

Faria APA, Penna CFAM, Pinto MS e Endo E (2020). Influência do leite com elevada contagem de células somáticas sobre características físico-químicas e processo de fermentação de iogurte. *Ciência Animal Brasileira* **21** 47-73. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-44773>

Gunasekera TS, Veal DA, Attfield PV (2003). Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *International Journal of Food Microbiology* **85** 269-27.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 1211-IDF 1: Milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)*. Genève, Switzerland, 2010. **2** ed. 18p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 13366-1/IDF 148-1: Milk - Enumeration of somatic cells - Part 1: Microscopic method (Reference method)*. Genève, Switzerland, 2008. **2** ed. 17p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 13366-2/IDF 148-2: Milk - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters*. Genève, Switzerland, 2006. **2** ed. 13p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 21187-IDF 196: Milk - Quantitative determination of bacteriological quality - Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results*. Genève, Switzerland, 2004. **1** ed. 13p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 22662-IDF 198: Milk and milk products - Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference method)*. Genève, Switzerland, 2007. **1** ed. 10p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 8196/IDF 128-1: Milk — Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis — Part 1: Analytical attributes of alternative methods*. Genève, Switzerland, 2009. **1** ed. 13p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 6731-IDF 021: Milk, cream and*

evaporated milk — Determination of total solids content (Reference method). Genève, Switzerland, 2010. 2 ed. 5p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 4833-1: Microbiology of the food chain- Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique*. Genève, Switzerland, 2013. 1 ed. 9p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 9622-IDF 141: Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry*. Genève, Switzerland, 2013. 2 ed. 14p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 8968-1/IDF 20-1: Milk and milk products - Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation*. Genève, Switzerland, 2014. 2 ed. 18p.

ISO - International Organization for Standardization. *ISO 19662/IDF 238: Milk — Determination of fat content — Acido-butyrometric (Gerber method)*. Genève, Switzerland, 2018. 1 ed. 15p.

Lee CS, Wooding FB, Kemp P. (1980). Identification properties and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cow secretions, colostrums and milk from normal cows. *Journal of Dairy Research* **47** 39–50.

Martinsen O, Grimnes S (2011). Bioimpedance and bioelectricity basics. Holand. *Elsevier*.

Mello MBC, Leal-Santos FA, Alves ER, Gasque- Thamires M, Fontes JF (2014). Standardization of blood smears prepared in transparent acetate: an alternative method for the microscopic diagnosis of malaria. *Malaria Journal* **13** p. 238.

Pilla R., Schwarz D, König S, Piccinini R (2012). Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *Journal of Dairy Science* **95** 4410-4420.

Prescott SC, Breed RS (1910). The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago **7** 632-640.

Santos M V, Fonseca LFJ (2019). *Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções*. 1. ed. Pirassununga-SP:. 301p.

Schumacher LL, Viégas J, Naetzold S, Tonin TJ, Rocha L, Cauduro L, Mor A.B, Robalo SS (2019). Use of electrical bioimpedance analysis to evaluate the quality of bovine raw milk. *South African Journal of Animal Science* **49**(3) 727-734.

Sharma N, Singh K, Bhadwal MS (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* **24** 429–438.

Silveira TML, Fonseca LM, Lago TBN, Veiga DR (2005). Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite

bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **57** 128-132.

Stocco G, Summer A, Cipolat GO (2020). Differential Somatic Cell Count as a Novel Indicator of Milk Quality in Dairy Cows. *Animals* **10** pg -753.

Stuart BH (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. [s.l.] : ANTS (Analytical Techniques in the Sciences) Series.

Tizard, Ian R (2014). *Imunologia Veterinária*, 9ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier.

Veiga EA, Bertemes-Filho P (2012). Bioelectrical impedance analysis of bovine milk fat. *Journal of Physics: Conference Series*, [s. l.], **407** p. 012009. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/17426596/407/i=1/a=012009?key=crossref.d6d289704d4301d65d316ded30a78715.html>> (Acessado em 02 de setembro de 2021).

Veiga EA (2013). “Desenvolvimento de um sistema de bioimpedância elétrica baseado em FPGA. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de Santa Catarina, p. 104.

Verdi R.J Barbano DM (1991). Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. *Journal of Dairy Science* **74** 2077–2081.

Viana KF, Briza FS (2010). Comparação da contagem de células somáticas em leite cru por quatro métodos de coloração. *Acta Veterinaria Brasilica* **4** 59-63.

Vianna PCB, Mazal G, Santos MV, Bolini HMA, Gigante ML (2008). Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells, *Journal of Dairy Science* **91** 1743-1750.

Wilkerson MJ (2012). *Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine*.

Zeconni A, Vairani D, Cipolla M (2018). Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk. *Italian Journal of Animal Science* **18:1** 460-465.

Zeng SS, Escobar EN, Hart SP, Hinckley L, Baulthau M, Robinson GT, Jahnke G (1999). Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. *Small Ruminant Research* **31** 103-107.

Tabela 1: Coeficientes de correlação linear de Pearson (r) entre as diferentes metodologias de preparo de lâmina e técnica de contagem para quantificação do número de células somáticas no leite bovino.

	Campos Sucessivos (cm²)	Campos Sucessivos (esfregaço)	Contagem em faixas (esfregaço)
Contagem em faixas (cm²)	0,93*	0,96*	0,94*
Campos sucessivos (cm²)		0,93*	0,96*
Campos Sucessivos (esfregaço)			0,96*

Fonte: autor. *p<0,0001

Tabela 2: Médias, desvio-padrão (DP), valores mínimos (Mín) e máximos (Máx) para as variáveis de contagem de células somáticas (CCS) pelos diferentes métodos e versões de calibração dos equipamentos avaliados, diferenciação celular, composição e dados zootécnicos.

Variável	Amostras Individuais				Amostras de tanque de expansão			
	Média	DP	Mín.	Máx.	Média	DP	Mín.	Máx.
Idade (meses)	67,0	26,70	28,00	126	-	-	-	-
DEL	212	108,40	33,00	456	-	-	-	-
OP	2,64	1,35	1,00	6,00	-	-	-	-
Prod. (kg/dia)	13,20	2,65	5,60	18,50	-	-	-	-
LIN (%)¹	15,40*	8,53	4,00	43,33	22,81*	10,75	3,67	53,67
MAC+EPI (%)¹	30,70*	19,68	5,00	66,66	41,57*	18,59	8,33	77,33
PMN (%)¹	54,50*	23,98	14,67	85,33	35,61*	20,09	5,33	72
LIN (total)	181,10	156,71	20,65	786,67	107,19	121,83	3,72	591,19
MAC+EPI (total)	277,40	17095	64,13	688,11	161,45	129,41	6,90	535,21
PMN (total)	986,84	1113	40,26	4340	184,81	247,34	6,65	1172
GOR (Ref)^{2,3}	3,70	0,88	1,80	5,30	3,69	0,40	2,50	4,75
PRO (Ref)^{1,3}	3,10*	0,45	2,39	4,79	3,18*	0,13	2,85	3,49
ST (Ref)^{2,3}	11,80	1,18	9,04	14,29	11,96	0,44	10,87	12,92
SNG (Ref)^{1,3}	8,06*	0,67	5,39	9,40	8,25*	0,36	7,02	8,89
CCS (Ref)^{2,3}	1.440*	1328	154,8	5.293	453,5*	389,71	23,75	1721,91
CCS Lab. 01⁴	1.319	1441	98,3	6.850	393,86	263,41	121,00	1248,43
CCS Lab. 02⁴	1.348	1360	87,6	5.429	392,81	288,20	104,00	1333
CCS EBE 00⁵	532,67	694,16	71,98	3657	316,15	40,21	245,31	527,26
CCS EBE 01⁵	287,83	196,80	51,53	1208	415,92	46,84	324,64	633,88
CCS EBE 02⁵	365,80	225,42	65,97	1208	571,59	69,99	399,16	751,16
CCS EBE 03⁵	534,38	235,74	69,84	1208	-	-	-	-
CCS EBE 04⁵	935,53	698,31	148,42	4587	-	-	-	-

Fonte: autor. DEL: dias em lactação; OP: ordem de parto; Prod. (kg/dia): produção de leite diária; LIN: linfócitos; MAC+EPI: macrófagos + células epiteliais; PMN: polimorfonucleados; GOR: gordura do leite; PRO: proteína do leite; ST: sólidos totais do leite; SNG: sólidos não gordurosos; ¹Valores que diferem entre si pelo teste de Krsukal-Wallis (5%) quando apresentam * na média. ²Valores que diferem entre si pelo teste de Fisher-Snedecor (5 %) quando apresentam * na média. ³métodos padronizados pelas metodologias ISO; ⁴método por citometria de fluxo; ⁵ Método por espectroscopia de bioimpedância elétrica, com cinco diferentes versões de calibração do equipamento, de 00 a 04.

Tabela 3: Médias, desvio padrão (DP), bias, raiz quadrada média do erro de predição (RMSEP), coeficientes de correlação de Pearson (R Pear.) e de determinação (R²), entre os métodos de referência baseados em normas ISO (REF), metodologia de citometria de fluxo (determinadas em dois laboratórios, LAB 1, LAB 2) e espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE, considerando cinco versões do equipamento, de EBE0 a EBE4), das amostras advindas de tanques de expansão de animais para contagem de células somáticas (CCS, mil céls/mL).

Amostras individuais de animais								
	REF	LAB 1	LAB 2	EBE0	EBE1	EBE2	EBE3	EBE4
Média	1439,8	1346,3	1348,4	532,7	287,8	365,8	534,4	935,5
DP	1327,82	1441,19	1360,32	694,16	196,80	225,42	235,74	698,31
BIAS	-	-33,24	-77,67	-893,44	-1138,28	-1060,31	-891,73	-490,58
RMSEP	-	535,04	464,97	1464,33	1688,66	1631,49	1535,58	1273,06
R Pear.	-	0,9299	0,9437	0,4836	0,4607	0,4527	0,4039	0,4665
p-valor		<,0001	<,0001	0,0004	0,0008	0,0010	0,0036	0,0006
R² aj.	-	0,86	0,88	0,22	0,20	0,19	0,14	0,20
Amostras de tanque de expansão								
	REF	LAB 1	LAB 2	EBE0	EBE1	EBE2		
Média	453,5	393,9	392,8	316,1	415,9	571,6		
DP	389,71	263,40	288,20	40,21	46,84	69,98		
BIAS	-	-59,62	-60,68	-137,33	-37,56	118,18		
RMSEP	-	226,13	230,89	399,64	377,35	397,59		
R Pear.		0,8412	0,8204	0,3117	0,2797	0,1778		
p-valor		<,0001	<,0001	0,0276	0,0492	0,2166		
R² aj.	-	0,70	0,67	0,08	0,06	0,01		

Fonte: autor.

Tabela 4: Coeficientes de correlação linear de Pearson entre dados zootécnicos, constituintes do leite, contagem de células somáticas (CCS, céls/mL) obtidas pelos métodos de referência, e contagem diferencial de células (linfócitos (LIN), macrófagos+células epiteliais (MAC+EPI) e polimorfonucleados (PMNs), de amostras advindas de animais, individualmente (hachuradas em verde) e de tanques de expansão (hachuradas em azul).

Variáveis	IDADE	DEL	PROD	LIN	MAC+EPI	PMN	GOR	PRO	ST	SNG	CCS
OP	0,9492	0,0332	-0,0385	-0,1269	-0,06676	0,0975	-0,1637	0,2274	-0,1668	-0,0781	0,0603
(p-valor)	<,0001	0,8186	0,7906	0,3798	0,6486	0,5006	0,256	0,1122	0,2467	0,5896	0,6774
IDADE		0,0059	-0,0558	-0,2165	-0,1117	0,0606	-0,2107	0,1942	-0,1589	-0,0017	0,0118
(p-valor)		0,9673	0,7004	0,1311	0,4448	0,6761	0,1419	0,1766	0,2705	0,9906	0,9351
DEL			0,2510	-0,0040	-0,0500	-0,0649	0,0672	0,2328	0,0897	0,0694	-0,0612
(p-valor)			0,0788	0,9780	0,7329	0,6545	0,6427	0,1037	0,5357	0,6319	0,6727
PROD				-0,2527	-0,0333	-0,2006	0,0077	0,0885	0,0634	0,1019	-0,2031
(p-valor)				0,0766	0,8201	0,1624	0,9580	0,5413	0,6617	0,4812	0,1573
LIN					0,5516	0,6055	0,1934	-0,0999	0,0034	-0,2499	0,6965
(p-valor)					<,0001	<,0001	0,1785	0,4900	0,9812	0,0800	<,0001
MAC+EPI				0,3209		0,5989	0,2022	0,0624	0,0788	-0,1289	0,6956
(p-valor)				0,0231		<,0001	0,1635	0,6702	0,5904	0,3776	<,0001
PMN				0,5848	0,2143		0,1371	-0,2258	-0,0043	-0,1891	0,9871
(p-valor)				<,0001	0,1350		0,3424	0,1148	0,9765	0,1885	<,0001
GOR				0,1969	0,0244	-0,0757		0,1879	0,8282	0,1394	0,1618
(p-valor)				0,1706	0,8663	0,6013		0,1913	<,0001	0,3343	0,2618
PRO				0,1006	0,0247	-0,2748	0,3139		0,2981	0,2779	-0,1965
(p-valor)				0,4870	0,8648	0,0534	0,0264		0,0355	0,0507	0,1714
ST				0,0639	0,1199	-0,1295	0,6587	0,4816		0,6704	0,0074
(p-valor)				0,6593	0,4071	0,3701	<,0001	0,0004		<,0001	0,9592
SNG				-0,2682	0,1136	-0,1755	-0,2867	0,2975	0,5117		-0,2010
(p-valor)				0,0597	0,4322	0,2230	0,0435	0,0359	0,0001		0,1616
CCS				0,7904	0,5684	0,8888	0,0216	-0,1348	-0,0224	-0,1575	
(p-valor)				<,0001	<,0001	<,0001	0,8816	0,3507	0,8772	0,2747	

Fonte: autor. OP: ordem de parto; IDADE: em meses; DEL: dias em lactação; PROD: produção média diária, em kg/dia; LIN: linfócitos; MAC+EPI: macrófagos + células epiteliais; PMN: polimorfonucleares; GOR: gordura do leite; PRO: proteína do leite; ST: sólidos totais do leite; SNG: sólidos não gordurosos do leite; CCS: contagem de células somáticas do leite.

Tabela 5 (Complementar): Coeficientes de correlação linear de Pearson entre tipos celulares (linfócitos, LIN; macrófagos somados à células epiteliais, MAC+EPI e polimorfonucleares, PMN) e análises de contagem de células somáticas (CCS) obtidas pelos métodos de referência (CCS_ref), citometria de fluxo realizada em dois laboratórios (LAB 1 e LAB 2) e espectroscopia de bioimpedância elétrica (EBE) com versões de calibração (cinco para amostras individuais e três para tanques de expansão). Correlações para amostras de animais individuais hachuradas em verde, e para e tanques de expansão hachuradas em azul.

Variáveis	LIN	MAC+EPI	PMN	REF	LAB 1	LAB 2	EBE0	EBE1	EBE2	EBE3	EBE4
LIN (p-valor)		0,55159 <,0001	0,60549 <,0001	0,69653 <,0001	0,81999 <,0001	0,75418 <,0001	0,51429 0,0001	0,52385 <,0001	0,47221 0,0005	0,39146 0,0049	0,57066 <,0001
MAC+EPI (p-valor)	0,32090 0,0231		0,59891 <,0001	0,69556 <,0001	0,64582 <,0001	0,64463 <,0001	0,43454 0,0018	0,38613 0,0061	0,37178 0,0085	0,29641 0,0386	0,41853 0,0028
PMN (p-valor)	0,58475 <,0001	0,21432 0,1350		0,98708 <,0001	0,89309 <,0001	0,91991 <,0001	0,44168 0,0013	0,42062 0,0024	0,42137 0,0023	0,38507 0,0058	0,41649 0,0026
REF (p-valor)	0,79037 <,0001	0,56843 <,0001	0,88875 <,0001		0,92995 <,0001	0,94376 <,0001	0,48360 0,0004	0,46075 0,0008	0,45274 0,0010	0,40389 0,0036	0,46653 0,0006
LAB 1 (p-valor)	0,66190 <,0001	0,29386 0,0383	0,84550 <,0001	0,84121 <,0001		0,97814 <,0001	0,62730 <,0001	0,63245 <,0001	0,59487 <,0001	0,54666 <,0001	0,63678 <,0001
LAB 2 (p-valor)	0,61825 <,0001	0,26735 0,0605	0,84815 <,0001	0,82044 <,0001	0,99109 <,0001		0,51216 0,0001	0,49791 0,0002	0,48502 0,0004	0,42144 0,0023	0,49244 0,0003
EBE0 (p-valor)	0,39928 0,0041	-0,10777 0,4563	0,35074 0,0125	0,31168 0,0276	0,24637 0,0846	0,19535 0,1740		0,95249 <,0001	0,94056 <,0001	0,74730 <,0001	0,95641 <,0001
EBE1 (p-valor)	0,35592 0,0112	-0,11485 0,4271	0,32538 0,0211	0,27967 0,0492	0,22652 0,1137	0,17854 0,2148	0,98495 <,0001		0,98520 <,0001	0,86829 <,0001	0,97122 <,0001
EBE2 (p-valor)	0,05536 0,7026	-0,00386 0,9788	0,25495 0,0740	0,17786 0,2166	0,12528 0,3860	0,11032 0,4456	0,55336 <,0001	0,58387 <,0001		0,89378 <,0001	0,93722 <,0001
EBE3 (p-valor)											0,80419 <,0001

Fonte: autor. LIN: linfócitos; MAC+EPI: macrófagos + células epiteliais; PMN: polimorfonucleares; GOR: gordura do leite; PRO: proteína do leite; ST: sólidos totais do leite; SNG: sólidos não gordurosos do leite; CCS: contagem de células somáticas do leite. EBE: espectroscopia de bioimpedância elétrica em cinco versões.

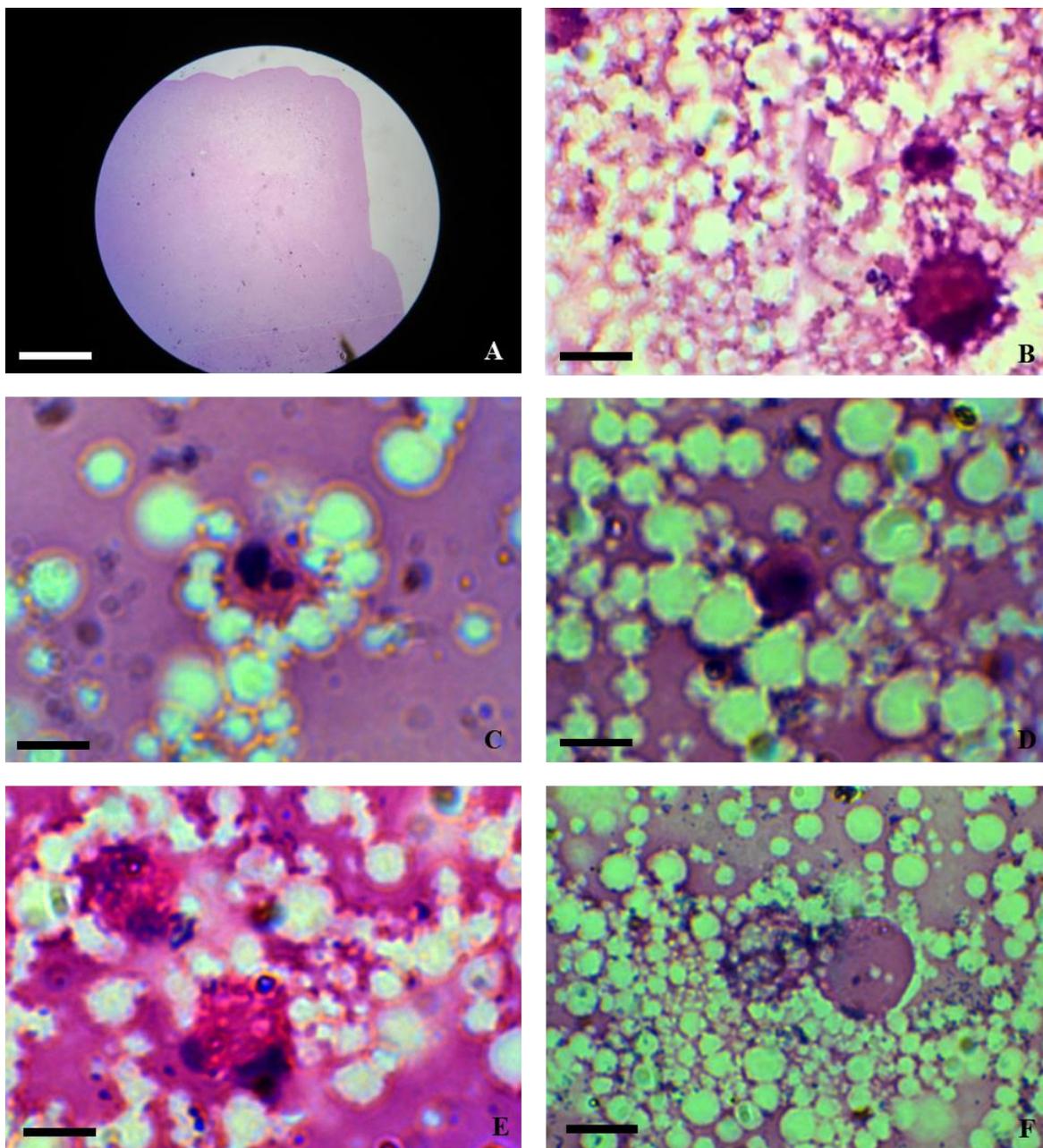


Figura 1: Contagem microscópica de células somáticas no leite bovino, A: Vista da mancha no cm^2 na objetiva 40x; B: Grupo de Macrófagos; C: Neutrófilo granuloso – polimorfonucleados, PMN; D: Linfócito; E: Conjunto de PMN; F: Célula epitelial, Barras: 40 μm para A e 100 μm para B a F, utilizando objetiva de imersão de 100x e uma objetiva ocular de 10x na microscopia óptica. Fonte: autor.

REFERÊNCIAS (DISSERTAÇÃO)

- ADAN, A. **Flow cytometry: basic principles and applications**. Taylor and Francis Ltd. 2017.
- ANDRADE, U. V. C; HARTMAN, W; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico. contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **Ars Veterinaria**. 2009; 25(3):129-135.
- ANTUÑANO, F. J. L.; SCHMUNIS, G. **Diagnóstico de Malaria**. Washington:Organización Panamericana de la Salud. 1988.
- ARASHIRO, E. K N.; TEODORO, V. A. M.; MIGUEL, E. M. Mastite bovina: importância econômica e tecnológica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora. v.61. n.352. p.32-36. 2006.
- BARSOUKOV, E; MACDONALD, J. R. (James R. **Impedance spectroscopy : theory. experiment. and applications**. 2005 [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.wiley.com/enus/Impedance+Spectroscopy%3A+Theory%2C+Experiment%2C+and+Applications%2C+2nd+Edition-p-9780471647492>>. Acesso em: 25/08/2021.
- BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott & Breed utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina. **Revista Nappama** 3:6-9. 2001.
- BERA, T. K.; JAMPANA, N.; LUBINEAU, G. A. Lab based electrical bioimpedance spectroscopic data interpreter (LEBISDI) for biological tissue impedance analysis and equivalent circuit modelling. **Journal of Electrical Bioimpedance**. 2016. v. 7. n. 1. p. 35–54.
- BERTOLINI, A. B.; ROSSI, G. A. M. 2017. Análises físico-químicas e detecção de fraudes em leite tratado termicamente por Ultra Alta Temperatura (UAT) comercializado na Região Centro-Oeste do Estado de São Paulo. Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v 11(4). p. 374 – 381. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura (MAPA). Instrução normativa nº 51. de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção. Identidade e Qualidade do Leite tipo A. do Leite tipo B. do Leite tipo C. do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 68. de 12 de dezembro de 2006. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos. para Controle de Leite e Produtos Lácteos. em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa. determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura (MAPA). Instrução normativa nº 62. de 29 de dezembro de

2011. 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. **Diário Oficial da União**. Brasília. Brasília. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 07. de 03 de maio de 2016. 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 da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 31. de 29 de julho de 2018. 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 da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura (MAPA). Instrução normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico das características e da qualidade do produto na indústria. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura (MAPA). Instrução normativa nº 77 de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico dos critérios para obtenção de leite de qualidade e seguro ao consumidor. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2018b.

BRASIL. Ministério da Agricultura (MAPA). Instrução normativa nº 78 de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico dos critérios a serem seguidos nas provas de produção. **Diário Oficial da União**. Brasília. 2018c.

CAVALHO, A. T.; RIBEIRO, G. A.; FERRAS, R. **Citometria de fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz. 2010.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 39. n. 6. p.1934-1943. 2009.

CONSELEITE PARANÁ. Site da empresa. 2021. Disponível em: <https://conseleitepr.com.br/>
Acesso em: 05/09/2021.

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 de vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 2008; 60(1):19- 24.

DAMM, M.; HOLM, C.; BLAABJERG, M.; BRO, M. N; SCHWARZ, D. Diferencial de contagem de células somáticas - Um novo método para rastreio de mastite de rotina no âmbito

dos programas de teste de Melhoria de Rebanhos de Leite. **Journal of Dairy Science**. 2017; 100: 4926–4940. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12409>.

DAS, S.; SIVARAMAKRISHNA, M.; BISWAS, K.; GOSWAMI, B. A low-cost instrumentation system to analyze different types of milk adulteration. **ISA transactions**. v 56. p. 268-275. 2015.

DAS, C.; CHAKRABORTY, S.; KARMAKAR, A.; CHATTOPADHYAY, S. **On-chip Detection and Quantification of Soap as an Adulterant in Milk Employing Electrical Impedance Spectroscopy**. In: International Symposium on Devices, Circuits and Systems (ISDCS). Howrah. 2018. 1-4 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.1109/ISDCS.2018.8379634>.

DIAS, J.; ANTES, F. G. Procedimentos para a coleta de amostras de leite para contagem de células somáticas. contagem bacteriana total e detecção de resíduos de antibiótico. **Embrapa Rondônia**. 15 p. (Documentos / Embrapa Rondônia. ISSN 0103-9865; 150). 2012.

DURANTE, G.; BECARI, W.; LIMA, F. A. S.; PERES, H. E. M. Electrical Impedance Sensor for Real-Time Detection of Bovine Milk Adulteration. **IEEE Sensors Journal**. [s. l.].v.16.n.4.p.861–865.2016.

Embrapa Gado de Leite. **ANUÁRIO leite 2021: saúde única e total**. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa. 2021.120 p.

EPSTEIN, B.; FOSTER, K. “Anisotropy in the dielectric properties.” in **Medical and Biological Engineering and Computing**. v.21. 1983.

EVANGELISTA, D. *Comparação entre métodos de referência e eletrônico por citometria de fluxo na contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) em leite submetido a diferentes tratamentos térmicos*. Escola de Veterinária. Belo Horizonte. Dissertação de Mestrado. 2008.

FARIA, A. P. A.; PENNA, C. F. A. M.; PINTO, M. S.; ENDO, E. Influência do leite com elevada contagem de células somáticas sobre características físico-químicas e processo de fermentação de iogurte. **Ciência Animal Brasileira**. v.21. 2020.

GRIFFITHS, P. R.; HASETH, J. A. **Fourier transform infrared spectrometry**. 2. ed. Hoboken. v. 222. 2007.

GRIMNES, S.; MARTINSEN, O. G. **Bioimpedance and bioelectricity basics**. London: UK Academic press. 2000.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL, D. A. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. **Applied and Environmental Microbiology**. [s. l.]. v. 66. n. 3. p. 1228–1232. 2000.

GUNASEKERA, T. S.; VEAL, D. A.; ATTFIELD, P. V. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. **International Journal of Food Microbiology**. v.85. n.3. p.269-279. 2003.

IDF. International Dairy Federation. 2013. Guidelines for the Use and Interpretation of Bovine Milk Somatic Cell Count. Bull. IDF.466/2013.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 1211-IDF 1: Milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)**. Genève. Switzerland. 2010. 2 ed. 18p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 13366-1/IDF 148-: Milk - Enumeration of somatic cells - Part 1: Microscopic method (Reference method)**. Genève. Switzerland. 2008. 2 ed. 17p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 13366-2/IDF 148-2: Milk - Enumeration of somatic cells - Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters**. Genève. Switzerland. 2006. 2 ed. 13p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 21187-IDF 196: Milk - Quantitative determination of bacteriological quality - Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results**. Genève. Switzerland. 2004. 1 ed. 13p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 22662-IDF 198: Milk and milk products - Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography (Reference method)**. Genève. Switzerland. 2007. 1 ed. 10p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 8196/IDF 128-1: Milk — Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis — Part 1: Analytical attributes of alternative methods**. Genève. Switzerland. 2009. 1 ed. 13p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 6731-IDF 021: Milk, cream and evaporated milk — Determination of total solids content (Reference method)**. Genève. Switzerland. 2010. 2 ed. 5p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 4833-1: Microbiology of the food chain- Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique**. Genève. Switzerland. 2013. 1 ed. 9p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 9622-IDF 141: Milk and liquid milk products - Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry**. Genève. Switzerland. 2013. 2 ed. 14p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 8968-1/IDF 20-1: Milk and milk products - Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation**. Genève. Switzerland. 2014. 2 ed. 18p.

ISO - International Organization for Standardization. **ISO 19662/IDF 238: Milk — Determination of fat content — Acido-butyrometric (Gerber method)**. Genève. Switzerland. 2018. 1 ed. 15p.

KUCEVIK, D. Validation and Application of FTIR Spectroscopy in Raw Milk Analysis. Master thesis. University of Novi Sad. Faculty of Agriculture. 2017.

LOPES, A. M.; MACHADO, J. A. T.; RAMALHO, E.; SILVA, V. Milk Characterization Using Electrical Impedance Spectroscopy and Fractional Models. **Food Analytical Methods**. v 11(3). p. 901-912. 2017.

LUINGE, H. J.; HOP, E.; LUTZ, E. T. G.; VAN HEMERT, J. A.; DE JONG, E. A. M. Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. [s. l.]. v. 284. n. 2. p. 419–433. 1993.

MACEDO, S.; GONÇALVES, J.; CORTINHAS, C.; LEITE, R.; SANTOS, M. Efeito da contagem de células somáticas sobre a composição e indicadores de higiene do leite de tanque. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 55(1). 1-11. 2018.

MACHADO, A. L.; RAMALHO, J. A. Milk Characterization Using Electrical Impedance Spectroscopy and Fractional Models. **Food Analytical Methods**. pp. 901-912. 2018.

MARTINS, C. M. M. R. Evaluation of electrical bioimpedance spectroscopy in estimate the milk composition, SCC, and milk ethanol stability—Preliminary results. In: AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION - ADSA 2017 ANNUAL MEETING 2017. Pittsburgh. **Anais...** Pittsburgh. Disponível em: <<https://m.adsa.org/2017/abs/t/70941>>. Acesso em: 05/09/2021.

MARTEL, R.; PAQUIN, P.; BUIJS, H. Water Absorption in Fluid Milk Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**. [s. l.]. v. 74. n. 7. p. 2073–2076. 1991.

MARTINSEN, O.; GRIMNES, S. Bioimpedance and bioelectricity basics. **Elsevier**. 2011.

MAURICE-VAN EIJNDHOVEN, M. H. T.; SOYEURT, H.; DEHARENG, F.; CALUS, M. P. L. Validation of fatty acid predictions in milk using mid-infrared spectrometry across cattle breeds. **Animal**. [s. l.]. v. 7. n. 2. p. 348–354. 2013.

MELLO, M. B. C; LEAL-SANTOS, F. A; ALVES, E. R; GASQUEZ, THAMIRES M; FONTES, C. O. R. Standardization of blood smears prepared in transparent acetate: an alternative method for the microscopic diagnosis of malaria. **Malaria Journal**. v. 13. p. 238. 2014.

MENEGHATTI, M. R.; GRIEBELER, A.; FARIÑA, L. O.; BERTOLINI, G. R. F. Impactos do sistema de pagamento por qualidade do leite em uma cooperativa da agricultura familiar. **DRd - Desenvolvimento Regional em Debate**. 10. 1203–1234. 2020.

MONTANHINI, M. T. M.; MURARA, D. H; MORAES, R. M. Neto. Influência da contagem de células somáticas sobre os componentes do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora. v. 68. n. 392. p. 18-22. mai./jun.. 2013.

MORAES, B. M. M.; BENDER FILHO, R. Mercado brasileiro de lácteos: análise do impacto de políticas de estímulo à produção. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. v. 55. n. 4. p. 783-

800. out/dez 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790550410>.

NEWMAN, R. W. "One solution technique for direct microscopic counting of bacteria in milk." **Experimental Biology and Medicine**. vol. 24. pp. 323-325. 1927.

NEWBOULD, F. H. S.; PHIPPS, L. W. "An improved technique for counting leucocytes in milk by the direct microscopic method." **Medicine Veterinary Science** vol. 31. pp. 65-69. 1967.

OLIVEIRA, M. C. P. P.; SILVA, N. M. A.; BASTOS, L. P. F.; FONSECA, L. M.; CERQUEIR, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; CONRADO, R. S. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for MUN analysis in normal and adulterated milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. [s. l.]. v. 64. n. 5. p. 1360–1366. 2012.

PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J. W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**. v.34. p.597-627. 2003.

PELVAN, M.; UNLUTURK, S. Application of Flow Cytometry and Fluorescence Techniques in Somatic Cell Analysis of Raw Milk. **International Journal of Food Processing Technology**. V.2. 11-16 11.2015.

PILLA, R.; SCHWARZ, D.; KÖNIG, S.; PICCININI, R. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. **Journal of Dairy Science**. v.95. p.4410-4420. 2012.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **Journal of Infectious Diseases**. Chicago. v. 7. 1910. p. 632-640.

POPESCU, A.; ANGEL, E. Cow raw milk quality and its factors of influence in relationship with milk price. **Management. Economic engineering in agriculture and rural development**. v. 19. n. 1. p. 421-440. 2019. Disponível em: <http://managementjournal.usamv.ro/index.php>. Acesso em 03/09/2021.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**. v.37. n.3. p.369- 400. 2006.

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

ROMA JÚNIOR, L. C.; MONTOYA, J. F. G.; MARTINS, T. T.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Seasonability of protein and others milk components related with quality payment program. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. [s. l.]. v. 61. n. 6. p. 1411–1418. 2009.

SANTOS, M. V; FONSECA, L. F. J. **Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções**. 1. ed. Pirassununga-S:. Pg 301. 2019.

SCHUMACHER, L.L.; VIÉGAS, J.; NAETZOLD, S.; TONIN, T. J.; ROCHA, L.; CAUDURO, A.B.; MORO, ROBALO, S.S. Use of electrical bioimpedance analysis to evaluate the quality of bovine raw milk. **South African Journal of Animal Science**. v 49(3). p. 727-734. 2019.

SHARMA, N; SINGH, K; BHADWAL, M. S. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**. 2011. 24. 429–438.

SILVEIRA, T. M. L; FONSECA, L. M; LAGO, T. B. N; VEIGA, D. R. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.57. n.1. p.128-132. 2005.

STOCCO, G; SUMMER, A.; CIPOLAT-GOTET. C. Differential Somatic Cell Count as a Novel Indicator of Milk Quality in Dairy Cows. **Animals**. v.10. n. 753. 2020.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. [s.l.] : ANTS (Analytical Techniques in the Sciences) Series. 2004.

THOMASSET, M. A. Bioelectric properties of tissue. Impedance measurement in clinical medicine. Significance of curves obtained. **Lyon medical**. [s. l.]. v. 94. p. 107–18. 1962. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13920843>>. (Acesso em 18/08/2021).

TIZARD. Ian R. *Imunologia Veterinária*. 9ª ed.. Rio de Janeiro: **Elsevier**. 2014.

TK, B. Bioelectrical Impedance Methods for Noninvasive Health Monitoring: A Review. **Journal of Medical Engineering**. 17 jun. 2014. v. 2014. p. 1–28. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27006932/>. (Acesso em 18/08/2021).

VEIGA, E. A. et al. Evaluation of electrical bioimpedance spectroscopy for detection of milk adulteration—Preliminary results. In: AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION - ADSA 2017 ANNUAL MEETING 2017. **Anais...** [s.l: s.n.] Disponível em:https://www.researchgate.net/publication/317905525_Evaluation_of_electrical_bioimpedance_spectroscopy_for_detection_of_milk_adulteration-Preliminary_results. (Acesso em 18/08/2021).

VEIGA, E. A.; BERTEMES-FILHO, P. Bioelectrical impedance analysis of bovine milk fat. **Journal of Physics: Conference Series**. [s. l.]. v. 407. n. 1. p. 012009. 2012. Disponível em: <http://stacks.iop.org/17426596/407/i=1/a=012009?key=crossref.d6d289704d4301d65d316ded30a78715>. (Acesso em 18/08/2021).

VEIGA, E. A.. “*Desenvolvimento de um sistema de bioimpedância elétrica baseado em FPGA.*” Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado de Santa Catarina. p. 104. 2013.

VIANA, K. F.; BRIZA, F. S. “Comparação da contagem de células somáticas em leite cru por quatro métodos de coloração.” **Acta Veterinaria Brasilica**. vol. 4. pp. 59-63. 2010.

VIANNA, P. C. B. MAZAL, G. SANTOS, M. V. BOLINI, H. M. A. GIGANTE, M. L.

Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. **Journal of Dairy Science**. 2008; 91:1743-1750.

VENTUROSO, R. C.; ALMEIDA, K. E. de; RODRIGUES, A. M.; DAMIN, M. R.; OLIVEIRA, M. N. de. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultrassom. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43. n. 4. p. 607-613. 2007.

VERDI, R. J. BARBANO, D. M. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leukocytes. **Journal of Dairy Science**. 1991; 74: 2077–2081. Doi: 10.3168 / jds.S0022-0302 (91) 78379-3.

ZECONNI, A.; VAIRANI, D.; CIPOLLA, M. Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk. **Italian Journal of Animal Science**. 2018.

ZENG, S. S.; ESCOBAR, E. N.; HART, S. P.; HINCKLEY, L.; BAULTHAUS, M.; ROBINSON, G. T.; JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing laboratory. counting method. storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. **Small Ruminant Research**. v.31. p.103-107. 1999.