



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE
ESTAFILOCOCOS ENTEROTOXIGÊNICOS
EM LEITE MASTÍTICO ATRAVÉS DE
MÉTODOS CONVENCIONAIS E ANÁLISE
DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS
CELULARES POR CROMATOGRÁFIA
GASOSA**

IVANI POSE MARTINS DE PÁDUA

2001

52060

MFN 36654

IVANI POSE MARTINS DE PÁDUA

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ESTAFILOCOCOS
ENTEROTOXIGÊNICOS EM LEITE MASTÍTICO
ATRAVÉS DE MÉTODOS CONVENCIONAIS E
ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS CELULARES POR
CROMATOGRAFIA GASOSA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras como parte das
exigências do Curso de Mestrado em
Ciência dos Alimentos, para obtenção do
título de "Mestre"

Orientadora

Eliana Pinheiro de Carvalho

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

2001

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pádua, Ivani Pose Martins de

Avaliação da presença de estafilococos enterotoxigênicos em leite mastítico através de métodos convencionais e análise de ácidos graxos celulares por cromatografia gasosa / Ivani Pose Martins de Pádua. -- Lavras : UFLA, 2001.
60 p. : il.

Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Mastite. 2. Estafilococos. 3. Cromatografia. 4. Ácidos graxos celulares. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

IVANI POSE MARTINS DE PÁDUA

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ESTAFILOCOCOS
ENTEROTOXIGÊNICOS EM LEITE MASTÍTICO
ATRAVÉS DE MÉTODOS CONVENCIONAIS E
ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS CELULARES POR
CROMATOGRAFIA GASOSA**

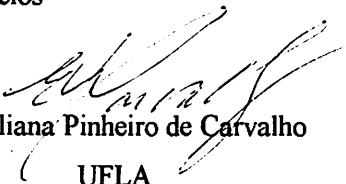
Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Curso de Mestrado em Ciência dos
Alimentos, área de concentração
Microbiologia de Alimentos, para
obtenção do título de "Mestre"

APROVADA em 30 de abril de 2001.

Denilson Ferreira de Oliveira UFLA

Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Fátima Piccolo Barcelos UFLA


Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho

UFLA

(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus,
OFEREÇO

Aos meus filhos, André Luiz e Maria Emília;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela longa convivência.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudos para a realização deste projeto.

Ao professor Denilson Ferreira de Oliveira, pela paciência e atenção.

Ao Departamento de Ciência do Solo, em especial, aos professores José Maria Lima e Bebeto, pela ajuda e colaboração essencial para a finalização deste projeto.

Aos professores do Departamento de Ciências dos Alimentos, que de maneira direta e indireta, contribuíram para a realização deste curso. Em especial, à Professora Eliana Pinheiro de Carvalho, pela orientação e amizade. Sem seu voto de confiança, não chegaria onde estou agora...

Aos meus “quase irmãos”, Ivana e Beto, companheiros inseparáveis de uma longa jornada. Vocês são inesquecíveis!

À minha amiga e “irmã mais nova”, Elaine. Obrigada pela força na identificação das toxinas.

Ao Márcio, amigo do peito e dos momentos de aflição. Sua ajuda, colega, foi muito importante.

Ao amigo Peninha, que organizou minhas idéias.

Ao Sílvio César, cunhado e médico de plantão do meu computador.

Aos amigos e colegas de mestrado e doutorado do Departamento de Microbiologia de Alimentos.

Aos funcionários Eliane, Cipriano (Pianinho) e Gicelda. Agradeço pela amizade e atenção.

Aos meus pais, Júlia e Osvaldo, pelo incentivo e confiança. Sem vocês seria muito difícil.

Ao amigo e companheiro de alegrias e tristezas, meu marido, Paulo de Tarso, pela compreensão e apoio durante o desenrolar deste curso.

Aos meus filhos, André Luiz e Maria Emília. Desculpem-me se fui um pouco ausente. Nossos esforços não foram em vão. Amo vocês!

À minha cunhada Cláudia Eugênia. Você foi o começo.

A toda minha família, pelo incentivo constante.

A Deus, que me ajudou a transpor os obstáculos que surgiram nesta caminhada.

SUMÁRIO

Lista de símbolos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
1 Introdução	1
2 Referencial teórico	3
2.1 Leite	3
2.2 Mastite.....	4
2.2.1 Agentes etiológicos	5
2.2.1.1 Staphylococcus sp	6
2.1.1.1.1 Staphylococcus spp e suas toxinas.....	7
2.3 Taxonomia microbiana.....	8
2.4 Quimiotaxonomia.....	9
2.4.1 Lipídeos na sistemática bacteriana	10
2.4.2 Ácidos graxos.....	11
2.5 Cromatografia Gasosa	15
2.5.1 Aplicação das técnicas cromatográficas em bacteriologia	16
3 Material e métodos	19
3.1 Obtenção das amostras	19
3.2 Análises microbiológicas.....	19
3.2.1 Contagem total	19
3.2.2 Obtenção e purificação dos isolados.....	20
3.2.3 Preservação das colônias isoladas.....	20
3.2.4 Caracterização preliminar das colônias	20
3.2.5 Identificação dos microrganismos	20
3.3 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas.....	21
3.4 Caracterização da composição dos AG celulares.....	21
3.4.1 Preparo das amostras para a análise cromatográfica.....	21
3.4.2 Análise das amostras por cromatografia gasosa.....	22
3.4.3 Identificação dos ésteres metílicos de AG	23
3.4.3.1 Comparação com dados cromatográficos da literatura:	23
3.4.3.2 Espectrometria de massas.	23
4 Resultados e discussão	25
4.1 Contagem	25
4.2 Caracterização de Staphylococcus sp.	26
4.3 Caracterização de toxinas	28
4.4 Análise dos ésteres metílicos dos AG	30
5 Conclusões	40
Referências bibliográficas	41
Anexos A	51

LISTA DE SÍMBOLOS

AG	ácidos graxos
pc-	plasma coagulase negativo
EEs	enterotoxinas estafilocócicas
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
nm	nanômetro
µm	micrômetro
CG	cromatografia gasosa
CMT	California Mastitis Test
MG	Minas Gerais
BP Agar	Baird-Parker Agar
PCA	Plate Count Agar
BHI	Broth Heath Infusion
tR	tempo de retenção
Staph pc-	<i>Staphylococcus</i> plasma de coagulase negativo
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
mL	mililitro
L	litro
UAT	ultra-alta temperatura
UHT	ultra high temperature

RESUMO

PÁDUA, Ivani Pose Martins de. **Avaliação da presença de estafilococos enterotoxigênicos em leite mastítico através de métodos convencionais e análise da composição dos ácidos graxos por cromatografia gasosa.** Lavras: UFLA, 2001. 60p. (Dissertação – Mestre em Ciência de Alimentos)*

Leite e produtos lácteos contaminados têm sido associados a várias doenças de origem alimentar, podendo os microrganismos serem considerados os seus causadores. Dentre esses microrganismos, merecem destaque as bactérias, especialmente aquelas do gênero *Staphylococcus*. Logo, com o intuito de avaliar a presença de linhagens estafilocócicas em leite proveniente de vacas mastíticas, experimentos foram conduzidos em laboratório com amostras de leite mastítico fornecidas por pequenos, médios e grandes produtores da região sul de Minas Gerais. Para o isolamento de tais microrganismos utilizou-se meio Baird-Parker ágar, do qual foram selecionadas colônias com características típicas de *Staphylococcus* spp, que foram identificadas por provas bioquímicas clássicas. Observou-se uma contagem média superior a 10⁴ unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus* spp por mL na maioria dos casos, sendo que 62% dos isolados correspondiam a *Staphylococcus aureus* e 38% a *Staphylococcus* pc- (plasma coagulase negativo). Os isolados foram submetidos a teste baseado na aglutinação reversa em látex, segundo o qual se observou que nenhuma cepa produzia enterotoxinas. Com o objetivo de desenvolver metodologia que permitisse identificar os isolados de forma mais rápida e segura do que aquela baseada em provas bioquímicas clássicas, todos foram submetidos à análise dos ácidos graxos celulares por cromatografia gasosa. No entanto, tal metodologia não permitiu a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* pc-.

* Comitê Orientador: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Orientador),
Denilson Ferreira de Oliveira - UFLA.

ABSTRACT

PÁDUA, Ivani Pose Martins de. **Evaluation of the presence of enterotoxigenic staphylococci in mastitic milk through conventional methods and analysis of the cellular fatty acids by gas chromatography.** Lavras: UFLA, 2001. 60p. (Dissertation – Master Program on Food Science)*

Contaminated milk and dairy products have been associated with a number of food-borne diseases, microorganisms being able to regarded as their causers. Among these foods, the bacteria specially those of the genus *Staphylococcus* deserve prominence. So, with the purpose of evaluating the staphylococcal strains in milk from mastitic cows, experiments were conducted in laboratory with samples of mastitic milks furnished by small, medium and great farmers from the southern region of Minas Gerais. For the isolation of such microorganisms, Baird-Parker agar medium was utilized, from which were selected colonies with characteristics of *Staphylococcus* spp, which were identified by classic biochemical tests. An average count superior to 10⁴ colony-forming units of *Staphylococcus* spp per mL in most cases, 62% of the isolates corresponded to *Staphylococcus aureus* and 38% to *Staphylococcus pc-* (negative coagulase plasm). The isolates were submitted to test based on the latex reverse agglutination according to which it was found that no strain produced enterotoxins. With the objective of developing methodology which allowed to identify the isolates in a faster and safe way than that based on classic biochemical tests, all were submitted to the analysis of the cell fatty acids by gas chromatography. Nevertheless, such a methodology did not enable the distinction between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pc-*.

* Guidance Committee: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Major Professor), Denilson Ferreira de Oliveira - UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, um número considerável de crianças ainda morre de desnutrição antes de completar um ano de vida o que é, em grande parte, uma das conseqüências da desnutrição. Em decorrência, o leite, que é considerado o mais completo de todos os alimentos na primeira infância humana, assume importante papel na nossa sociedade. A média nacional de produção de leite está em torno de 14 bilhões de litros por ano, o que corresponde a uma baixa produção, se comparada à norte americana. Nos Estados Unidos, apesar do rebanho ser numericamente equivalente ao brasileiro, a produção de leite é cinco vezes maior.

Além de elevar a produtividade brasileira, também é de grande importância a busca por um leite de alta qualidade, com sabor agradável, alto valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes (antibióticos, pesticidas, adição de água e sujidades), reduzida contagem de células somáticas e baixa carga microbiana.

Dentre todas as características relacionadas à qualidade do leite, as microbiológicas são consideradas de fundamental importância, pois podem ser correlacionadas de forma confiável à saúde dos animais, às condições higiênicas na ordenha e à eficiência do manuseio deste produto desde a fazenda até o consumidor final.

Conseqüentemente, faz-se necessário reduzir ao mínimo a presença de bactérias no leite, já que tais microrganismos são os que mais afetam sua qualidade. Elas são capazes de se multiplicarem rapidamente, o que, além de alterar a composição química do leite, pode ocasionar a transmissão de doenças aos seres humanos. Um importante exemplo consiste nas bactérias do gênero *Staphylococcus*, que estão associadas com diversos casos de contaminação do

leite e podem produzir substâncias consideravelmente tóxicas aos seres humanos.

Para minimizar os problemas de contaminação microbiológica do leite, faz-se de vital importância o emprego de métodos rápidos e seguros para averiguar a presença de bactérias em diversas amostras. Conseqüentemente, vários são os trabalhos buscando desenvolver novas metodologias com tal finalidade. Várias delas se baseiam no fato de que espécies distintas apresentam tipos e/ou quantidades de substâncias diferentes nas suas constituições. Ou seja, a composição química das bactérias, principalmente o conteúdo de carboidratos, lipídeos e proteínas, pode variar de forma marcante de acordo com a espécie. Assim sendo, pode-se identificar as diversas espécies bacterianas por meio da análise dos seus constituintes químicos. Para isso, as técnicas cromatográficas correspondem à ferramenta de grande importância, com destaque para a análise de AG (ácidos graxos) por CG (cromatografia gasosa), que vem apresentando resultados bastante satisfatórios.

Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivos, isolar e identificar *Staphylococcus* spp proveniente de leite de vacas mastíticas, avaliar a capacidade de produção de enterotoxina por estes microrganismos e testar a eficiência da utilização da composição dos AG de *Staphylococcus* spp analisados por CG para a sua identificação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leite

Apesar de ser um alimento mundialmente consumido devido ao seu alto valor nutritivo, o leite pode ser um ótimo meio de cultura para a grande maioria dos microrganismos. Os que mais comprometem a qualidade do leite são as bactérias e, com intensidade consideravelmente menor, os fungos, vírus e leveduras. Especificamente no caso de bactérias patogênicas, além de alterarem a qualidade final do produto, podem ocasionar grandes riscos à saúde pública (Santos, 2000).

Apesar de considerar a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, a nova resolução da Vigilância Sanitária, nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001), não cita padrões no que se refere ao leite cru, bem como não determina a diferenciação dos tipos de leite. A portaria estipula apenas valores de referência para leite pasteurizado e UAT (UHT). A legislação criada pelo Ministério da Agricultura em 1954, que ainda está em vigor, tem restringido-se à prevenção de fraudes ou adulterações do produto *in natura*. A nova legislação, ainda não homologada, definirá regulamentos técnicos para a produção, identidade e qualidade nos tipos de leite, condições de refrigeração na propriedade rural e transporte a granel, além do monitoramento do leite, que passará a ser feito na propriedade em vez de ser analisado depois de chegar na indústria. Os critérios microbiológicos no leite fresco, atualmente, aplicam-se apenas aos tipos A e B, enquanto para o leite C, este parâmetro é adotado somente para o produto pasteurizado (Oliveira, Fonseca e Germano, 2001).

Espera-se que tais mudanças na legislação possam servir de fator motivador para o emprego de um manejo mais adequado do produto e utilização

de mão-de-obra mais especializada. Com isso, acredita-se, por exemplo, que os problemas sanitários dos rebanhos poderão ser minimizados, reduzindo a níveis aceitáveis uma das principais causas de contaminação do leite: a mastite (Laranja da Fonseca e Pereira, 1999; Costa, 1999).

2.2 Mastite

Mastite é um nome genérico, utilizado por vários autores para definir uma inflamação da glândula mamária (úbere). Ela pode ocorrer em vacas, cabras, éguas, porcas e em outras inúmeras espécies de animais mamíferos (Brito et al., 1997; Shourkry e Sabana, 1997; Brabres, 1999; Prestes, Langoni e Cordeiro, 1999). Porém, devido a fatores econômicos e de saúde pública, a doença assume maior importância na vaca leiteira. Além da causa infecciosa, caracterizada pela penetração de microrganismos no canal do leite, fatores fisiológicos, traumáticos, metabólicos e alérgicos podem desencadear os processos de mastite (Bray e Shearer, 1993; Zecconi, 1996; Brabes, 1999; Costa, 1999; Costa et al., 1999; Leite, 2000; Faria et al., 2000).

De acordo com a intensidade do processo e forma de evolução, a mastite tem sido classificada como clínica ou subclínica. A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis na mama e/ou no leite, apresentando quartos mamários inchados, quentes, avermelhados e doloridos (o animal reage ao toque). Estes sintomas podem ser ou não acompanhados de alterações das características do leite, descoloração, presença de grumos, pus ou sangue. Por outro lado, a mastite subclínica torna-se mais difícil de ser detectada uma vez que o quarto mamário e o leite estão aparentemente normais. Contudo, pode ser considerada, em todo o mundo, como a principal doença que afeta o gado leiteiro e também aquela que causa as maiores perdas econômicas na exploração leiteira.

Além de provocar abortos, perda da glândula mamária e até mesmo a morte do animal, o leite mastítico pode provocar doenças sérias nas pessoas que o consomem, como meningite, brucelose e septicemias (Costa, 1999).

Além da queda de produção de leite, que é responsável pela maior parcela de prejuízo, gastos com medicamentos, leite descartado, serviços veterinários, descarte prematuro de animais contribuem para que o prejuízo seja maior. Sem contar com as perdas ocasionadas na indústria de laticínios devido a resíduos de antibiótico e às alterações na composição química do leite, diminuindo a qualidade do produto (Costa, 1999; Faria et al., 2000; Santos, 2000).

A mastite é um dos fatores que mais causam prejuízos à produção leiteira, uma vez que pode ser facilmente transmitida de um animal para outro na ausência de medidas preventivas necessárias e sua percentagem de cura espontânea normalmente é baixa (Laranja da Fonseca e Pereira, 1999; Costa, 1999). De acordo com o Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira (NAPGAMA), nos Estados Unidos, calcula-se que a doença cause um prejuízo médio anual de US\$180 a US\$200 por vaca. No Brasil, não há uma estimativa geral. Entretanto, levantamentos realizados pelo mesmo núcleo mostraram índices de cerca de US\$330 por vaca/ano nas regiões de São Paulo e sul de Minas Gerais, enquanto que, com medidas preventivas, seriam gastos apenas US\$25vaca/ano (Costa et al., 1999).

2.2.1 Agentes etiológicos

Apesar de os agentes etiológicos da mastite serem numerosos, aproximadamente 95% de todas as infecções são causadas por *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. Os 5% restantes são causados por outros organismos, dentre os quais podem ser destacados *Pseudomonas aeruginosa*,

Corynebacterium spp, *Nocardia* spp e *Bacillus* spp (Bray e Sheare, 1993; Jones, Baley e Roberson, 1998).

Dentre os microrganismos acima mencionados, o que assume maior importância na maioria dos países onde o problema existe, inclusive no Brasil, é o *Staphylococcus aureus*. Ele apresenta grande resistência aos tratamentos convencionais, pois pode aderir aos tecidos mais profundos da glândula mamária, o que dificulta a ação de antibióticos e, conseqüentemente, permite a manifestação da doença de forma crônica (Gomes e Gallo, 1995; Faria et al., 2000).

Vieira da Mota et al. (2000) afirmam que as espécies pc- (plasma coagulase negativo) também podem estar envolvidas em quadros de mastite. No Brasil, em 1996, foi detectado um índice de 38% de estafilococos pc- em rebanhos no estado do Paraná. Os estafilococos pc- atualmente têm sido considerados como um dos principais microrganismos emergentes envolvidos em mastite (Santos, 2000; Ruegg, 2001).

Para Santos (2000), a mastite pode ser causada por mais de 140 espécies diferentes de microrganismos, os quais podem ser agrupados em agentes contagiosos, ambientais e oportunistas. Segundo o autor, estes microrganismos raramente constituem risco de saúde pública, pois podem ser destruídos pela pasteurização. Entretanto vários autores citam que em concentrações acima de 10^4 UFC/mL de estafilococos no leite, há um aumento da probabilidade de produção de enterotoxinas, que uma vez ingeridas, poderão provocar intoxicações (Brabes, 1999; Leite, 2000; Kendall, 1998).

2.2.1.1 Staphylococcus sp

Bactérias do gênero *Staphylococcus* podem ser caracterizadas como cocos gram-positivos, catalase positivos, normalmente β -hemolíticos, que tendem a formar grupamentos característicos, semelhantes a cachos de uva. São

amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. São também patógenos de seres humanos e outros mamíferos. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* contém 33 espécies que, tradicionalmente, são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos. Essa divisão é baseada na capacidade de coagulação do plasma, que é uma propriedade considerada como importante marcador de patogenicidade dos estafilococos (Behme et al., 1996; Kotilainen, Huovinen e Eerola, 1991; Trabulsi et al., 1999; Gay e Fox, 2000).

2.1.1.1.1 *Staphylococcus* spp e suas toxinas

Staphylococcus spp, em especial *Staphylococcus aureus*, além de ser considerado uns dos principais agentes causadores da mastite, está diretamente relacionado com vários surtos de toxinfecções alimentares, representando um risco considerável para a saúde humana. Os sintomas destas toxinfecções (náuseas, diarreia, dores abdominais e vômito) são decorrentes da ação de toxina termoestáveis, pré-formadas no alimento, que permanecem ativas, mesmo após processamento a altas temperaturas (Brabes, 1999; Leite, 2000; Silva et al., 2000).

As enterotoxinas estafilocócicas (EEs) formam um grupo de proteínas globulares de cadeia simples, solúveis em água, termoestáveis e com peso molecular entre 28.000 a 35.000 Daltons. Atualmente, são conhecidos sete grupos imunologicamente distintos e envolvidos com toxinfecções alimentares. São: A, B, C (com os subgrupos C₁, C₂ e C₃), D, E, e H (Valle et al., 1990; Brabes, 1999; Trabulsi et al., 1999; Leite, 2000).

Para evitar o consumo de produtos contaminados, é de grande importância que o leite e seus derivados sejam submetidos a um eficiente controle de qualidade (Sincoweay, Miyagawa e Kume, 1981; Brabes, 1990; Leite, 2000).

2.3 Taxonomia microbiana

As descobertas relacionadas à crescente diversidade de organismos isolados vêm induzindo à necessidade de arranjar estas bactérias em grupos distintos. A forma mais fácil para a execução desta tarefa é colocá-las em grupos com propriedades comuns, estudar o relacionamento de tais grupos e o seu papel na natureza e, pelo desenvolvimento de métodos, permitir que os cientistas e pesquisadores possam identificar novos isolados pela comparação destes com os grupos já existentes. Tais estudos pertencem ao campo da sistemática, um termo relacionado e freqüentemente utilizado como taxonomia. Logo, em ambos os casos, trata-se da classificação ou arranjo sistemático de organismos em grupos ou categorias (Staley e Krieg, 1986).

Cowan (1968) definiu sistemática como o estudo científico de organismos com o objetivo de caracterizá-los e arranjá-los de uma maneira ordenada. O autor também sugere que a taxonomia deve incluir aspectos de ecologia, bioquímica, genética, patologia, biologia molecular e microscopia, consistindo em três áreas separadas, porém inter-relacionadas: 1) classificação, que se preocupa com o arranjo ordenado de unidades em grupos; 2) nomenclatura, que se preocupa com a nomeação das unidades definidas pela classificação e 3) identificação de unidades não conhecidas com unidades já classificadas e nomeadas, isto é, a aplicação prática da classificação e nomenclatura.

Mais tarde, Bronz e Olsen (1986) confirmaram a definição dada por Cowan: “A taxonomia inclui a classificação, identificação e nomenclatura de microrganismos”. Assim sendo, os microrganismos poderiam ser classificados de acordo com suas similaridades e correlações, seguidas por análises de clusters.

De acordo com revisão de Trüper e Schleifer (1991), a taxonomia bacteriana começou quando Ferdinand Cohn, em 1872, agrupou bactérias de acordo com suas características morfológicas globais em cocos, bacilos curtos, bacilos longos e espiralados. Uma nova era na taxonomia, denominada por fisiologia, começa com o sistema de Classificação de Orla-Jensen, em 1909. Numerosas propriedades fisiológicas de culturas bacterianas foram determinadas por caracterização e usadas predominantemente para a identificação. Mais tarde, enzimas foram estudadas e as vias metabólicas elucidadas. Com o avanço tecnológico, novos e melhores métodos foram surgindo e técnicas mais complexas, como hibridização de DNA-RNA, foram recomendadas para a designação de uma espécie. Entretanto, é altamente improvável que todos os possíveis organismos procariotos já tenham sido isolados e observados em estudos.

O aumento no conhecimento da composição química dos constituintes celulares fez com que métodos quimiotaixonômicos passassem a ser amplamente utilizados, em particular para aqueles microrganismos cujas características morfológicas e fisiológicas não foram suficientes para fornecer uma classificação satisfatória. Com isso, pôde haver maior objetividade na classificação e identificação, tornando a taxonomia bacteriana mais prática e com menores variações dos resultados, como freqüentemente ocorre quando são realizados testes fisiológicos e bioquímicos para a identificação de uma espécie (Welch, 1991).

2.4 Quimiotaixonomia

Pesquisas têm sido conduzidas a fim de alcançar rapidamente a classificação e identificação de bactérias, quando em quantidades mínimas de biomassa, tais como uma simples colônia bacteriana. Obviamente, cada método tem vantagens e desvantagens, o que confere à combinação de técnicas maior

valor do que qualquer técnica isolada. Nesse contexto, a quimiotaxonomia pode contribuir para uma melhor classificação das bactérias, estabelecendo correlação entre elas, localizando aspectos da evolução e da identificação de organismos clínica e microbiologicamente importantes (Brondz e Olsen, 1986).

Apesar de não se tratar de um assunto novo, a quimiotaxonomia foi recentemente definida como o estudo da variação das características químicas dos organismos vivos, na classificação e identificação dos mesmos. Fundamentalmente, ela se preocupa com a distribuição dos constituintes das células bacterianas, bem como de substâncias por estas produzidas. Um grande passo para a quimiotaxonomia foi dado com o emprego da cromatografia gasosa e da eletroforese em gel de amido e poliacrilamida. Procedimentos integrados a quimiotaxonomia foram desenvolvidos estabelecendo os perfis dos componentes bacterianos, tais como lipídios, aminoácidos e açúcares da mesma biomassa, sendo que grande ênfase tem sido dada aos sistemas automatizados para trabalhos de rotina. Como resultado, tem-se que vários métodos já estão disponíveis para estudos da química de células microbianas (Goodfellow e Minnikin, 1985; Austin e Priest, 1986; Brondz e Olsen, 1986).

Komagata e Suzuki (1987) sugeriram que a análise simples e rápida dos constituintes da parede celular pode ser utilizada para diferenciar os grupos de bactérias, desde que três condições sejam satisfeitas: a) estes constituintes devem ser distribuídos universalmente entre os microrganismos para serem estudados; b) serem homólogos entre linhagens num mesmo táxon, e apresentar diferenças significantes entre taxa diferente, c) devem proporcionar análises que sejam facilmente realizadas em um grande número de amostras.

2.4.1 Lipídeos na sistemática bacteriana

A membrana envolve a célula, define seus limites e mantém as diferenças essenciais entre o citosol e o meio extracelular. É uma estrutura

dinâmica, fluida, sendo a maior parte de suas moléculas capaz de mover-se lateralmente. Apesar de suas diferentes funções, todas as membranas biológicas têm uma estrutura geral comum: cada uma é um filme muito fino de moléculas de lipídios e proteínas ligadas não covalentemente. Essas proteínas atuam como sensores de sinais externos, permitindo à célula mudar o seu comportamento em resposta a sinais ambientais. As moléculas de lipídios são arranjadas como uma bicamada, com cerca de 5nm de espessura, formando a estrutura básica da membrana e atuando como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis (Alberts et al., 1997).

Em área de $1\mu\text{m}^2$ de membrana bacteriana há cerca de 5×10^6 moléculas lipídicas, o que corresponde a algo em torno de 50%, na maioria de tais membranas. Todas as moléculas lipídicas são anfipáticas, isto é, elas têm uma extremidade hidrofílica e outra hidrofóbica, sendo os fosfolipídios e glicolipídios os mais abundantes (Shaw, 1975).

As partes hidrofóbicas dos lipídios correspondem a longas cadeias hidrocarbônicas, vulgarmente chamadas de caudas, que têm como origem AG que podem diferir em vários aspectos. Um parâmetro que influencia de forma significativa a composição de AG da bicamada lipídica é a temperatura. Bactérias, leveduras e outros organismos cuja temperatura flutua de acordo com a do ambiente, ajustam a composição de AG dos lipídios de suas membranas, de modo a manter uma fluidez relativamente constante. Quando a temperatura cai, por exemplo, são sintetizados mais AG com duplas ligações *cis*, evitando o decréscimo na fluidez da bicamada (Miller, 1982; Tornabene, 1985; Alberts et al., 1997).

2.4.2 Ácidos graxos

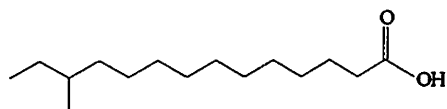
Entre os componentes mais comumente utilizados para propósitos taxonômicos estão os AG, que podem ser definidos como ácidos carboxílicos de

cadeia longa, localizados em grande parte nas membranas citoplasmática e externa. Os de origem bacteriana geralmente contêm entre 9 e 20 átomos de carbono e, além disso, também podem ter hidroxilas ligadas às suas cadeias, insaturações com diferentes arranjos espaciais, ramificações e ciclizações que podem afetar a fluidez da membrana e, conseqüentemente, seus processos de transporte e atividades enzimáticas, que são de grande importância biológica. Sabe-se que mais de cem AG de origem bacteriana já foram identificados, sendo que a composição de tais substâncias pode variar quantitativamente e qualitativamente entre as espécies (Welch, 1991; Lehninger, Nelson e Cox, 1995).

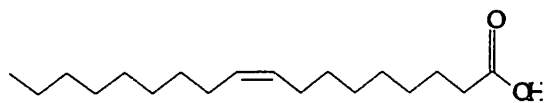
Com base na composição de AG celulares, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: um contém como maiores componentes, AG ramificados *iso* e/ou *anteiso*; o outro grupo apresenta principalmente compostos de AG lineares, incluindo os saturados e mono-insaturados. Muitas bactérias aeróbias, gram-positivas, como *Bacillus* spp, *Micrococcus* spp, *Staphylococcus* spp e *Arthrobacter* spp, contêm ácidos ramificados, principalmente anteiso saturados com 15 (*anteiso-C_{15:0}*) e 17 (*anteiso-C_{17:0}*) átomos de carbono, que geralmente são os maiores componentes.

Estes padrões de composição não são encontrados entre as bactérias Gram-negativas, que têm como ácido graxo predominante o de 15 átomos de carbono com ramificação na última posição (*iso-C_{15:0}*), como é o caso de *Xanthomonas* spp, *Flavobacterium* spp, *Legionella* spp e *Thermus* spp. Já os padrões de AG de cadeia linear saturada e insaturada são encontrados tanto em bactérias gram-positivas, como aquelas dos gêneros *Clostridium* spp e *Corynebacterium* spp, quanto nas gram-negativas, que podem ser exemplificadas por Enterobacteriaceae, *Campylobacter* spp, *Pseudomonas* spp e *Thiobacillus* spp, as quais geralmente apresentam como principais AG, n-C_{16:0}.

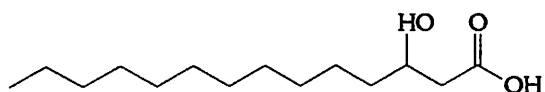
$C_{16:1}$, $C_{18:1}$ e $C_{18:0}$. Algumas destas estruturas podem ser observadas na Figura 1 (Komagata e Suzuki, 1987).



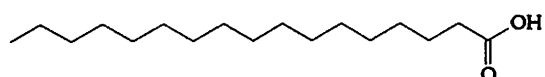
Anteiso-C_{15:0}
 Ácido 12-metiltetradecanóico



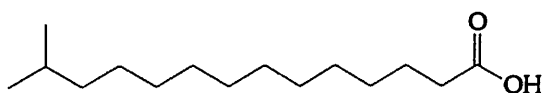
C_{18:1n-9c}
 Ácido *cis*-9-octadecenóico
 Ou Ácido oléico



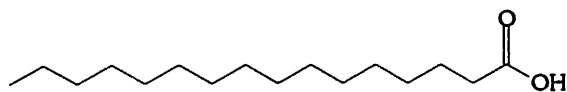
3-OH-C_{14:0}
 Ácido 3-hidroxitetradecanóico ou
 Ácido β-hidroximirístico



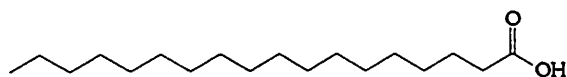
C_{17:0}
 Ácido heptadecanóico ou
 Ácido margárico



Iso-C_{15:0}
 Ácido 13-metiltetradecanóico



C_{16:0}
 Ácido hexadecanóico ou
 Ácido palmítico



C_{18:0}
 Ácido octadecanóico ou
 Ácido esteárico

FIGURA 1. Estrutura de alguns ácidos graxos

2.5 Cromatografia gasosa

Segundo Collins (1999), os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” foram utilizados pela primeira vez por Mikhael Semenovich Tswett, para descrever suas experiências, em 1906, que consistiam na separação dos componentes de extratos foliares e de gema de ovo com éter de petróleo (fase móvel), utilizando colunas de vidro preenchidas com vários sólidos (fase estacionária).

A partir de então, foram feitas várias alterações no sistema desenvolvido por Tswett, o que levou ao aparecimento de várias técnicas cromatográficas como, por exemplo, a cromatografia gasosa. Porém, seu desenvolvimento só foi acelerado a partir de 1952, depois da introdução da cromatografia gás-líquido. Hoje é uma técnica muito utilizada na maioria dos laboratórios que realizam análises químicas (Bonato, 1999).

Na cromatografia gasosa, as amostras a serem analisadas são inseridas no sistema cromatográfico através de um injetor e eluídas com uma fase móvel inerte (geralmente H_2 , N_2 ou He) por meio de uma coluna contendo alguma fase estacionária, com a qual os componentes de tal amostra podem interagir. As diferenças em tais interações e nas pressões de vapores desses componentes fazem com que cheguem em tempos distintos ao final da coluna, que é acoplada a um detector. Este emite sinais eletrônicos, que são alterados ao perceber a chegada de alguma substância. Tais sinais são convertidos pelo sistema computacional em um gráfico que, geralmente, é de corrente *versus* tempo. Como a área de cada pico gerado pode ser correlacionada à quantidade do componente que lhe deu origem, além de detectar, pode-se também quantificar substâncias por cromatografia gasosa (Mitruka e Bonner, 1967).

No início da história da cromatografia gasosa (CG), esforços foram feitos para analisar os AG. O problema principal a ser superado na época era:

exigência de fases líquidas para operar a temperaturas altas, associação molecular de ácidos no estado de vapor e adsorção ácida na coluna. Recentemente, melhorias consideráveis em CG permitiram a estabilização da fase estacionária a temperaturas relativamente altas. Isto tornou possível a separação de vários AG. No entanto, por produzir melhores resultados, o usual é converter os AG aos ésteres metílicos correspondentes, que podem ser facilmente analisados por CG (Bronz e Olsen, 1986).

2.5.1 Aplicação das técnicas cromatográficas em bacteriologia

As aplicações iniciais da CG na análise de componentes celulares, com fins taxonômicos, datam da década de 60 (Ballows et al., 1991). Desde então, vários procedimentos foram desenvolvidos, sendo que para a identificação de bactérias merece grande destaque a análise de AG. Para tanto, após o cultivo em meios apropriados, em geral as células são submetidas a condições de hidrólise em meio ácido ou básico. A seguir, os AG liberados são esterificados e avaliados por cromatografia gasosa. Com isto, tem-se um método de rápida execução e de boa reprodutibilidade para a identificação de bactérias. Além disso, como tal metodologia tem menor demanda por técnicos especializados do que os métodos clássicos, o custo da análise também tende a ser menor. No entanto, é indispensável que as condições de cultivo sejam cuidadosamente controladas, uma vez que variações de parâmetros como temperatura e pH do meio, por exemplo, podem afetar a composição dos AG (Moss et al., 1970; Mitruka e Bonner, 1967; Welch, 1991).

Como já mencionado, a análise dos AG celulares por CG envolve a separação de ésteres metílicos de AG, o que é realizado de forma mais eficiente em coluna capilar. Para a identificação de cada componente, seus tempos de retenção são comparados com aqueles provenientes de misturas de padrão

disponíveis comercialmente (Welch, 1991). Alguns dos resultados mais antigos podem ser encontrados na Tabela 1.

TABELA 1. Componente celular bacteriano analisado por cromatografia gasosa

Bactéria	Componente
Espécies de <i>Corynebacterium</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i>	AG
<i>Streptococcus</i> (10 linhagens)	AG (C14 – C18)
<i>Staphylococcus</i> spp e <i>Micrococcus</i>	AG e açúcares neutros, glicolípídeos, fosfolípídeos e lipídeos neutros.
<i>Bacillus</i> sp.	AG (cadeia longa)
<i>Thiobacillus</i> (10 linhagens de 10 espécies, incluindo <i>T. neopolitanus</i> e <i>T. thioparus</i>)	AG (C8-C20)
<i>Gaffkya</i> e <i>Veillonella alcalescens</i>	AG (C9-C20)
<i>Vibrio cholerae</i>	AG (C14-C19)
<i>Arthrobacter globiformis</i>	AG (C14-C17)
<i>Escherichia coli</i> e outras Enterobacteriaceas	Carboidratos, Fosfolípídeos e Lipídeos neutros, Ácidos carboxílicos (C10-C22).
<i>Proteus</i> sp. (formas L e bacilares)	AG e lipopolissacarídeos purificados
<i>Mycobacterium</i> (90 linhagens incluindo 25 linhagens atípicas)	AG (C8-C24)
<i>Mycoplasma neurolyticum</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. fermentans</i> , <i>M. salivarium</i>	Glicolípídeos e AG (cadeia longa)
<i>Listeria monocytogenes</i>	AG (C12-C23)
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. cepacia</i> e <i>P. maltophilia</i>	Ácidos orgânicos e AG
<i>Clostridium</i> sp. (41 linhagens e 13 espécies incluindo <i>C. perfringens</i> e <i>C. bifermentans</i>)	AG (C12-C20)

Fonte: Mitruka e Bonner, 1967.

Dentre os estudos mais recentes, pode-se citar a identificação da composição bacteriana da rizosfera da soja. Foram identificados 576 isolados,

sendo que 324 eram pertencentes ao gênero *Bacillus*, 121 ao gênero *Pseudomonas* e 40 ao gênero *Arthrobacter* (Cattelan, Hartel e Fukrmann, 1998).

Outro exemplo consiste no trabalho com linhagens de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Agrobacterium*; 215 isolados foram identificados por meio da análise de seus AG por CG (Jarvis et al., 1996).

Em trabalho com *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, que, de modo geral, podem ser associadas à contaminação de alimentos, a análise de AG também demonstrou ser satisfatória. Foram 115 isolados do primeiro e 315 do segundo (Steele et al., 1997).

Boe e Gjerde (1980) obtiveram bons resultados na identificação, também por cromatografia gasosa, de 23 linhagens representando a família Enterobacteriaceae e Vibrionaceae e conseguindo a separação em espécies.

Lactobacillus sake e *L. curvatus*, que geralmente dominam a microflora em carnes processadas, também foram submetidos à mesma metodologia, por meio da qual foram identificados 29 isolados. Concluíram os autores que tais análises são reprodutíveis, desde que fatores experimentais sejam cuidadosamente padronizados (Rementzis e Samelis, 1996).

Outro estudo que serviu para a confirmação de que tal metodologia é de grande valia, foi realizado por Stoakes et al. (1994), que identificaram, pela análise dos AG, bactérias do gênero *Staphylococcus*, que são consideradas de grande importância na deterioração e contaminação de alimentos devido às suas características patogênicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

Foram coletadas amostras de leite mastítico de quarenta vacas adultas de seis diferentes propriedades, pertencentes a pequenos e médios produtores, da região sul de Minas Gerais. As amostras, em volume de 500mL, foram coletadas de tetos com resultado positivo para o CMT (California Mastitis Test), após higienização do úbere com água e sabão, secagem com papel toalha e desinfecção com álcool iodado 10%. Após desprezar os primeiros jatos de leite, coletou-se a amostra em frascos estéreis, identificados com os dados de cada animal, sendo fechados imediatamente e acondicionados em caixa isotérmica com gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, MG, onde foram realizados todos os procedimentos.

3.2 Análises microbiológicas

Foram utilizados métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Marshall, 1992).

3.2.1 Contagem total

Depois de feitas as diluições das amostras em água peptonada 0,1%, foram retirados alíquotas de 0,1mL para semeadura em superfície, realizada em duplicata, utilizando-se BP ágar (Baird-Parker ágar – MERCK) enriquecido com gema de ovo e telurito. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para a contagem dos microrganismos. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens e retiradas colônias típicas e atípicas para posterior estudo.

3.2.2 Obtenção e purificação dos isolados

A purificação das colônias foi realizada pelo método de estria de esgotamento em BP ágar e incubação a 37°C por 48 horas. Após o crescimento bacteriano, a pureza da colônia foi observada por exames macro e microscópicos, por meio de esfregaços para a coloração de gram.

3.2.3 Preservação das colônias isoladas

Após a confirmação da pureza, as colônias foram mantidas viáveis em PCA inclinado (Plate Count agar – DIFCO), cobertas com óleo mineral estéril e mantidas sob refrigeração, de onde periodicamente eram retiradas para reativação e aplicação de testes utilizados na identificação das mesmas.

3.2.4 Caracterização preliminar das colônias

A caracterização das colônias foi realizada com base nos resultados da verificação das características de crescimento em BP ágar, assim como na determinação de morfologia, arranjo, tamanho e coloração (Siqueira, 1995).

3.2.5 Identificação dos microrganismos

As técnicas e interpretação dos testes bioquímicos basearam-se em provas agrupadas em tabela por Kloos e Schleifer (1986), que são: catalase, produção de coagulase, fermentação de glicose em aerobiose e anaerobiose, crescimento em NaCl 15% e presença de termonuclease, conforme citado por Sabioni e Maia. (1998).

3.3 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas

As cepas isoladas e identificadas como *Staphylococcus* spp, foram enviadas para o Laboratório de Anaeróbios e Epidemiologia Molecular da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em Belo Horizonte – Minas Gerais, onde as toxinas estafilocócicas foram pesquisadas por meio de reação de aglutinação reversa em látex (Igarashi et al., 1986; Sanjeev e Suredran, 1992).

3.4 Caracterização da composição dos AG celulares

Inicialmente, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus* spp, isoladas de alimentos em pesquisas anteriormente realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. Todas as cepas utilizadas foram reavaliadas para confirmação da identificação e, com os dados obtidos foi gerado um banco de dados. Na segunda etapa, microrganismos isolados de leite mastítico e identificados como *Staphylococcus* spp foram submetidos ao mesmo processo descrito acima e os resultados foram utilizados para comparar os dados obtidos com os do banco de dados gerado, avaliando a reprodutibilidade e eficiência da metodologia utilizada para a identificação de *Staphylococcus* spp.

3.4.1 Preparo das amostras para a análise cromatográfica.

As cepas foram repicadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, o caldo contendo os microrganismos foi estriado em triplicata, em placas contendo BP ágar, divididas em quatro quadrantes. Realizaram-se três cultivos, sendo que, de um cultivo para outro, foi coletado material do terceiro quadrante. Após o terceiro cultivo, lavou-se a massa celular bacteriana com 0,7mL de água destilada, que foi coletada em

~~CONFIDENTIAL~~

tubos de centrífuga Jouan BR4i. Após centrifugação por 10 minutos a 10.000g e 4°C (Rementzis e Samelis, 1996), os pellets obtidos foram colocados em tubos de vidro, com tampas de rosca e vedação, nos quais se colocou 1mL de NaOH 15% em metanol e água (1:1).

Os tubos foram agitados e aquecidos em banho-maria a 100°C por 30 minutos. Acidificou-se a mistura obtida com 2mL de HCl 3,25M em metanol e, após nova agitação, a mistura foi aquecida em banho-maria a 80°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5mL de hexano e os tubos foram agitados. A fase hexânica foi retirada e lavada com 1mL de solução saturada de NaHCO₃, tratada com Na₂SO₄ anidro para eliminar possíveis resíduos de água e então filtrada em algodão. Ao final, as amostras foram acondicionadas em tubo de vidro vedado com papel alumínio e tampa rosqueada, sendo então mantidas a -10°C. A metodologia foi adaptada com base em de Miller (1982), Eerola e Lehtonen (1998), Welch (1991).

3.4.2 Análise das amostras por cromatografia gasosa

As amostras, obtidas conforme descrito em 3.4.1, foram analisadas em um cromatógrafo gasoso modelo 5890 Series II, Hewlett-Packard, equipada com injetor automático do tipo split-splitless, com coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,2mm x 0,25µm) recoberta com 5% de fenilmetisilicone (HP-5) e detector de ionização em chama. Como gás carreador utilizou-se nitrogênio. Todas as amostras foram analisadas nas seguintes condições: temperatura inicial= 180°C (3 minutos); taxa de variação de temperatura= 10°C/min; temperatura final= 300°C (5 minutos) Empregou-se como padrão uma solução contendo tetradecanoato de metila (C_{14:0}), heptadecanoato de metila (C_{17:0}) e nonadecanoato de metila (C_{19:0}).

3.4.3 Identificação dos ésteres metílicos de AG

3.4.3.1 Comparação com dados cromatográficos encontrados na literatura.

As substâncias, cujos tempos de retenção foram superiores ao do tetradecanoato de metila ($C_{14:0}$) e inferiores ao de heptadecanoato de metila ($C_{17:0}$), foram submetidas à seguinte fórmula:

$$R = \frac{t_R(\text{éster}) - t_R(C_{14:0})}{t_R(C_{17:0}) - t_R(\text{éster})}$$

em que:

$t_R(\text{éster})$ = tempo de retenção da substância a ser identificada

$t_R(C_{14:0})$ = tempo de retenção do tetradecanoato de metila

$t_R(C_{17:0})$ = tempo de retenção do heptadecanoato de metila.

Já as substâncias com tempos de retenção superiores ao do heptadecanoato de metila, foram submetidas a seguinte fórmula:

$$R = \frac{t_R(\text{éster}) - t_R(C_{17:0})}{t_R(C_{19:0}) - t_R(\text{éster})}$$

em que:

$t_R(C_{19:0})$ = tempo de retenção do nonadecanoato de metila.

3.4.3.2 Espectrometria de massas.

As amostras 9.2.V, 23.1.V e padrão foram analisadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, o que permitiu a

obtenção de espectros de massas. As condições cromatográficas foram análogas às descritas no item 3.4.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem

Os resultados obtidos do cálculo das médias da contagem em BP ágar podem ser observados no gráfico apresentado na Figura 2.

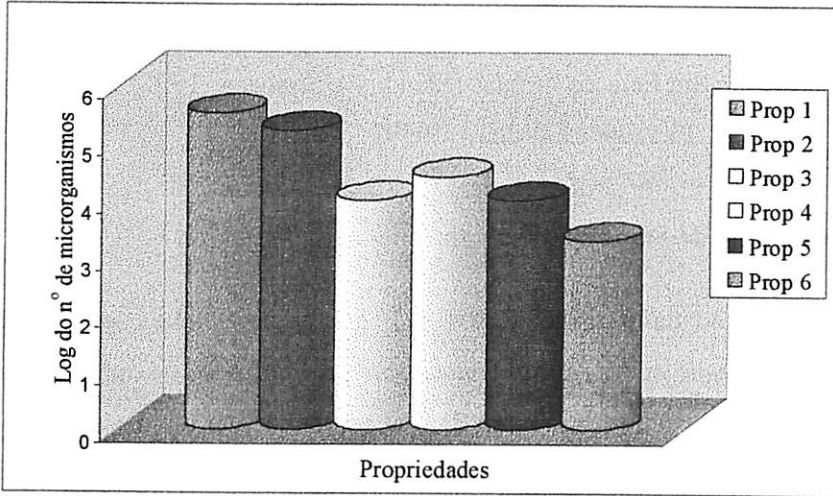


FIGURA 2. Médias das contagens de *Staphylococcus* spp por propriedade

Nele verifica-se que o leite proveniente de vacas mastíticas apresentou uma contagem média de $3,4 \times 10^5$, $0,6 \times 10^5$, $1,0 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^4$, $2,0 \times 10^3$ UFC/mL (unidade formadora de colônia/mililitros) de *Staphylococcus* spp nas propriedades 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. As contagens obtidas coincidem com os resultados de Leite (2000) que, analisando a qualidade microbiológica de queijos “Minas Frescal” e “Minas Padrão”, encontrou contagens para *Staphylococcus* spp de $3,6 \times 10^6$ UFC/mL no leite mastítico que foi utilizado para fabricação dos mesmos.

Uma vez que já foi constatada a produção de toxinas em concentrações acima de 10^4 UFC/mL (Brabes, 1999), excetuando-se as amostras da

propriedade 6, cuja contagem foi inferior, acredita-se que exista a possibilidade de detecção de enterotoxinas no leite estudado.

Esse alto índice de contaminação por *Staphylococcus* spp está de acordo com dados encontrados na literatura, que demonstram a prevalência de tais microrganismos em leite proveniente de vacas mastíticas (Brant e Figueiredo, 1994; El Sukhon, 1995; Costa et al. , 1995; Mahbub et al., 1996; Shoukry e Shabana, 1997). De forma análoga, também se observa a prevalência de *Staphylococcus* spp em leite de búfalas (Shoukry e Shabana, 1997) e em éguas com mastite (Prestes, Langoni e Cordeiro, 1999).

4.2 Caracterização de *Staphylococcus* sp.

Com exceção das propriedades 4 e 5, que apresentaram contagem de *Staphylococcus aureus* inferior a *Staphylococcus* pc-, em todos os outros casos, a espécie *S. aureus* prevaleceu (Figura 3). Tal resultado está de acordo com a totalização dos resultados das 135 cepas isoladas nesta pesquisa, segundo a qual 62% correspondiam a este mesmo microrganismo (Figura 4).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem

Os resultados obtidos do cálculo das médias da contagem em BP ágar podem ser observados no gráfico apresentado na Figura 2.

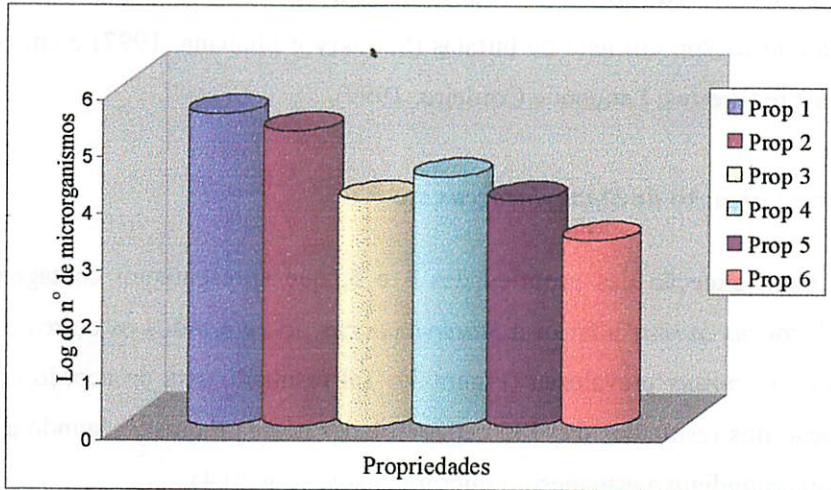


FIGURA 2. Médias das contagens de *Staphylococcus* spp por propriedade

Nele verifica-se que o leite proveniente de vacas mastíticas apresentou uma contagem média de $3,4 \times 10^5$, $0,6 \times 10^5$, $1,0 \times 10^4$, $3,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^4$, $2,0 \times 10^3$ UFC/mL (unidade formadora de colônia/militros) de *Staphylococcus* spp nas propriedades 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. As contagens obtidas coincidem com os resultados de Leite (2000) que, analisando a qualidade microbiológica de queijos “Minas Frescal” e “Minas Padrão”, encontrou contagens para *Staphylococcus* spp de $3,6 \times 10^6$ UFC/mL no leite mastítico que foi utilizado para fabricação dos mesmos.

Uma vez que já foi constatada a produção de toxinas em concentrações acima de 10^4 UFC/mL (Brabes, 1999), excetuando-se as amostras da

propriedade 6, cuja contagem foi inferior, acredita-se que exista a possibilidade de detecção de enterotoxinas no leite estudado.

Esse alto índice de contaminação por *Staphylococcus* spp está de acordo com dados encontrados na literatura, que demonstram a prevalência de tais microrganismos em leite proveniente de vacas mastíticas (Brant e Figueiredo, 1994; El Sukhon, 1995; Costa et al. , 1995; Mahbub et al., 1996; Shoukry e Shabana, 1997). De forma análoga, também se observa a prevalência de *Staphylococcus* spp em leite de búfalas (Shoukry e Shabana, 1997) e em éguas com mastite (Prestes, Langoni e Cordeiro, 1999).

4.2 Caracterização de *Staphylococcus* sp.

Com exceção das propriedades 4 e 5, que apresentaram contagem de *Staphylococcus aureus* inferior a *Staphylococcus* pc-, em todos os outros casos, a espécie *S. aureus* prevaleceu (Figura 3). Tal resultado está de acordo com a totalização dos resultados das 135 cepas isoladas nesta pesquisa, segundo a qual 62% correspondiam a este mesmo microrganismo (Figura 4).

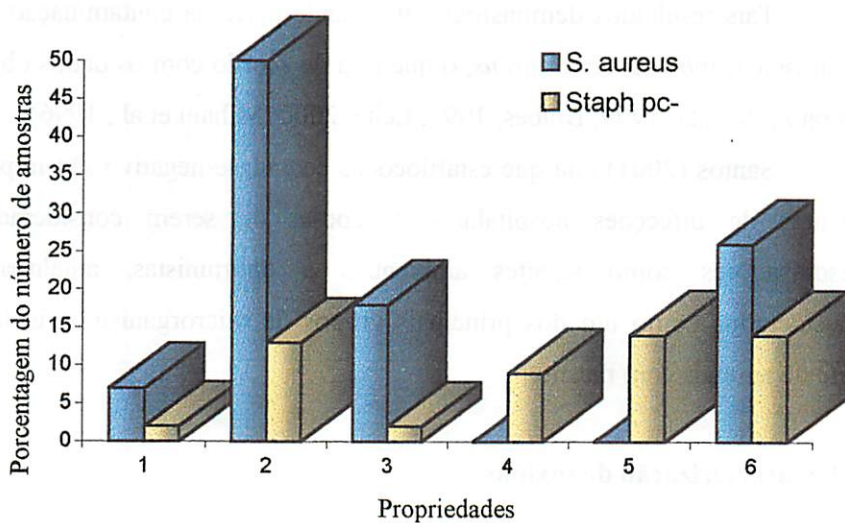


FIGURA 3. Porcentagem de *Staphylococcus aureus* e pc- isolados das amostras de leite por propriedades.

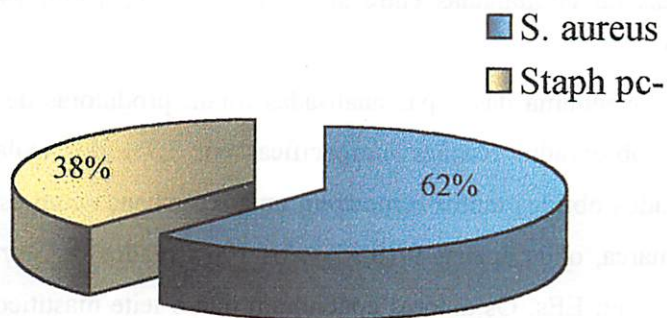


FIGURA 4 Porcentagem de *Staphylococcus aureus* e pc- isolados das amostras de leite.

Tais resultados demonstram que grande parte da contaminação do leite se deve a *Staphylococcus aureus*, o que está de acordo com os dados obtidos na literatura (Costa, 1999; Brabes, 1999; Leite, 2000; Mihaiu et al., 1996).

Santos (2001) cita que estafilococos coagulase-negativo são importantes agentes de infecções hospitalares e, apesar de serem considerados por pesquisadores como agentes ambientais e oportunistas, atualmente são considerados como um dos principais grupos de microrganismos isolados do leite de animais com mastite.

4.3 Caracterização de toxinas

A presença de *Staphylococcus aureus* no leite indica um risco potencial à saúde pública, principalmente quanto à formação de enterotoxinas termolábeis, que, quando ingeridas, podem causar intoxicações alimentares (Brabes, 1999; Pinheiro de Sá et al., 2000; Kendall, 1998). Atualmente, são conhecidos sete tipos de enterotoxinas estafilocócicas sorologicamente distintas, identificadas como A, B, C (com os subgrupos C₁, C₂ e C₃), D, E, G, H. As que estão mais envolvidas em surtos de toxinfecção são as enterotoxinas A e D, podendo estar isoladas ou combinadas entre si (Trabulsi et al., 1999; Brabes, 1999; Leite, 2000).

Nenhuma das cepas analisadas foram produtoras de toxina. Entretanto, foram observadas reações inespecíficas em 3,7% dos isolados (5 cepas). Os resultados obtidos também mostram uma semelhança com estudos realizados na Dinamarca, onde apenas 9 (8,5%) dos 106 isolados de *Staphylococcus aureus* produziram EEs. Os autores concluíram que o leite mastítico não constitui uma grande fonte de contaminação de alimentos pela toxina produzida por *Staphylococcus aureus* (Aarestrup, Andersen e Jensen, 1995).

Outro estudo que apresentou resultados semelhantes foi realizado por Leite (2000), que avaliou a qualidade do leite cru proveniente de vacas

TABELA 2 Valores de R

R _{Lit} ¹	R _{obt.} ²	tR	Composto
			Entre C ₁₄ e C ₁₇
3.22	3.32	4.58	12-metiltetradecanoato de metila
0.48	0.51	5.84	Palmitato de metila
0.09	0.10	6.55	14-metilexadecanoato de metila
			Entre C ₁₇ e C ₁₉
1.60	1.63	7.55	Oleato de metila
0.96	0.98	7.78	Estearato de metila
0.07	0.16	8.45	Cis-9,10-metilenoctadecanoato de metila
			Acima de C ₁₉
0.32	0.31	9.58	Araquidato de metila

¹R_{lit.} Valores de R obtidos dos cálculos envolvendo as distâncias entre os picos citados na literatura

²R_{obt.} Valores de R obtidos dos cálculos envolvendo as distâncias entre os picos detectados na análise cromatográfica da amostra referente à cepa nomeada por 9.2.V e padrões

³tR Tempo de retenção.

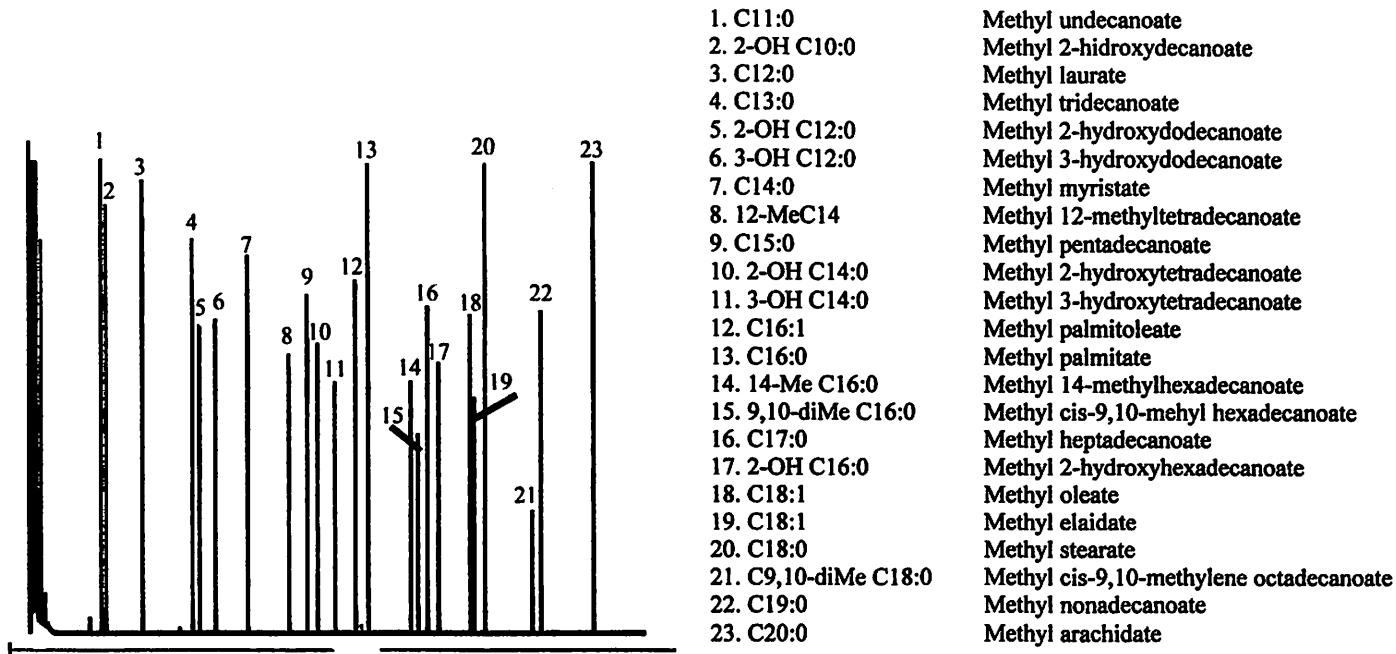


FIGURA 5. Ácidos graxos mais comumente encontrados em bactérias (Adaptado de J&W Scientific, 1998/99).

Pela análise por espectrometria de massas, observa-se que todas as substâncias com tempos de retenção iguais a 4,58; 5,84; 6,55; 7,55; 7,78, 8,45 e 9,57min , apresentam um pico intenso em 74 (m/z). Tal resultado está de acordo com a literatura, que relata tal pico como o principal em espectros de massas de ésteres metílicos de AG e o atribui ao rearranjo de McLafferty (Silverstein e Webster, 1998).

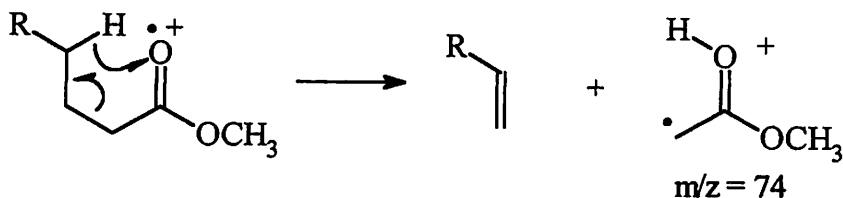


FIGURA 6. Rearranjo de McLaffert

No caso específico da substância com tempo de retenção igual a 4,58min, à qual foi atribuída a estrutura do α -C_{15:0} (12-metiltetradecanoato de metila) por comparação com os dados apresentados na Figura 5, não foi possível observar picos com relação m/z superior a 213. Este valor provavelmente é obtido com a perda de fragmento com massa igual a 43, partindo do íon molecular (256), cuja visualização é relativamente difícil para os AG (Silverstein e Webster, 1998).

Enfim, tais valores sugerem que realmente se trate de um éster metílico de ácido graxo com fórmula C₁₆H₃₂O₂. Entretanto, não dá para definir a estrutura que, em princípio, pode corresponder a iso-C_{15:0} ou α -C_{15:0} (13-metiltetradecanoato de metila ou 12-metiltetradecanoato de metila). Tal dedução está de acordo com trabalhos encontrados na literatura, segundo os quais tais ácidos graxos estão presentes em grandes quantidades em espécies do gênero *Staphylococcus*. (Durham e Kloos, 1978; Komagata e Suzuki, 1987; Schleifer e Kroppenstedt, 1990; Kotilainen, Huovinen e Eerola, 1991).

Para a substância com tempo de retenção igual a 8,45min, o pico do íon molecular deveria apresentar relação m/z igual a 312 ($C_{20}H_{40}O_2$). No entanto, tal valor não foi observado e, conseqüentemente, não foi possível fazer atribuição estrutural neste caso.

Na análise por espectrometria de massas, os espectros correspondentes às substâncias com tempos de retenção iguais a 7,55 e 7,78min foram sobrepostos. Isso provavelmente deve ter ocorrido em decorrência da baixa resolução da coluna existente no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas. Observou-se um pico com relação m/z igual a 298, que parece corresponder ao pico do íon molecular de um éster metílico com fórmula molecular $C_{19}H_{38}O_2$. Tal resultado está de acordo com a atribuição da estrutura do estearato de metila ao pico com tempo de retenção igual a 7,78min, com base nos valores de R (Tabela 2).

As atribuições das estruturas acima citadas, tendo como base os valores de R e dados da análise por espectrometria de massas, estão de acordo com estudos encontrados na literatura. Como exemplo, pode ser citado o trabalho realizado por Kotilainen, Huovinen e Eerola (1991) que, estudando a composição de *Staphylococcus* spp, constataram que os AG mais abundantes neste grupo foram: 12-metiltetradecanoato de metila ou 13-metiltetradecanoato de metila (anteiso ou iso de $C_{15:0}$), oleato de metila ($C_{17:0}$) e estearato de metila ($C_{18:1}$). Foram também encontradas quantidades moderadas e pequenas de 14-metilpentadecanoato de metila (i- $C_{16:0}$), palmitato de metila ($C_{16:0}$), linoleato de metila ($C_{18:2}$), oleato de metila ($C_{18:1}$) e araquidato de metila ($C_{20:0}$).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que destacam a análise dos AGs celulares por CG como ferramenta útil na identificação de bactérias. A priori, dados confiáveis podem ser obtidos em tempos relativamente curtos quando comparados aos métodos convencionais, desde que fatores extrínsecos sejam cuidadosamente controlados ou até mesmo padronizados para todas as

espécies a serem identificadas (Welch, 1991; Gilarová et al, 1994; Chou et al., 1996; Rementis e Samelis, 1996; Steinbrueckne et al., 1998).

Entretanto, no desenrolar desta pesquisa, observou-se que as quantidades relativas dos ésteres metílicos dos ácidos graxos variavam entre limites consideravelmente altos, como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5. Tal variação sugere que a composição de ácidos graxos de *Staphylococcus* spp não deve ser utilizada isoladamente para a identificação do gênero, ou até mesmo diferenciação entre as várias espécies estafilocócicas. Esta constatação vem colaborar com o trabalho realizado por Wauthoz, El Lique e Decallonne (1995), os quais sugeriram que a caracterização de espécies bacterianas pela análise de seus AG celulares deve ser utilizada para complementar outros métodos taxonômicos.

Tendo-se o pico com tempo de retenção igual a 4,57 min como referencial (área = 100%), observa-se, por exemplo, que a área correspondente ao pico 5,84min varia entre 233,47% e 26% da área do pico 4,57min. De forma semelhante, os picos 6,55 (47-6%), 7,55 (325,22-36%); 7,78 (107,15%), 8,45 (22,72-3%), apresentaram consideráveis variações em suas áreas relativas (Tabela 4).

Durham e Kloos (1978), determinando a composição de AG de 100 estafilococos representando dez espécies diferentes, encontraram que a composição de todas as linhagens foi qualitativamente similar. Eerola e Lehtonen (1998), realizando a análise da composição de AG de várias bactérias, incluindo três espécies de *Staphylococcus*, concluíram que as ocorrências e quantidades dos vários ácidos graxos detectados foram geralmente constantes para membros de uma mesma espécie. Kotilain, Hoovinen e Eerola (1991) na tentativa de agrupar 7 espécies de *Staphylococcus* com base na composição de seus AGs, encontraram subjetividade para as análises de clusters realizadas. Acrescentaram que algumas linhagens foram incongruentemente posicionadas

Acrescentaram que algumas linhagens foram incongruentemente posicionadas em vários clusters, devido à similaridades na composição de AGs. Todos estes dados coincidem com a presente pesquisa, segundo a qual os resultados obtidos demonstraram ser inviável diferenciar *S. aureus* de *Staphylococcus pc-* com base na composição de ácidos graxos. Exemplos de cromatogramas dos ésteres metílicos de ambos os grupos de estafilococos podem ser encontrados na Figura 7.

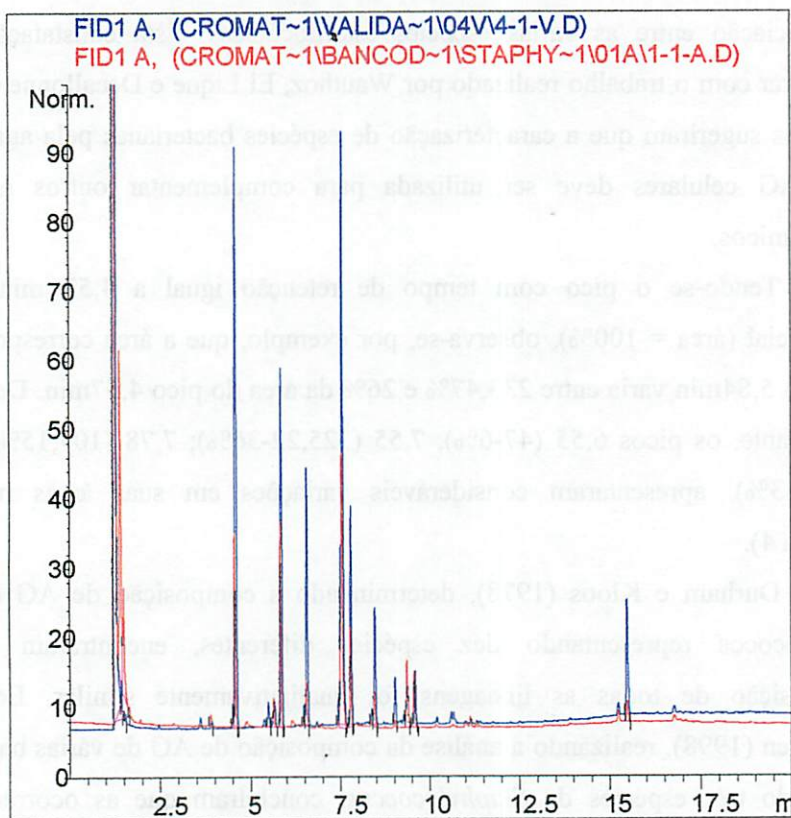


FIGURA 7 AG celulares detectados em estafilococos pc+ (em vermelho) e pc- (em azul).

Os tempos de retenção e áreas relativas aos principais picos detectados podem ser observados nas Tabelas 3 e 4.

TABELA 3 Tempos de retenção e áreas relativas aos picos detectados na análise cromatográfica de cepas de *Staphylococcus aureus*

	TR	AR	TR	AR	TR	AR	TR	AR	TR	AR	TR	AR	TR	AR
Cepa 1A	4,57	100	5,83	128,90	6,55	26,21	7,55	228,23	7,78	58,64	8,45	19,55	9,57	38,28
CEPA 10	4,58	100	5,84	50,14	6,55	11,36	7,56	88,02	7,79	30,00	8,45	7,25	9,58	19,34
CEPA 11	4,58	100	5,84	35,10	6,55	12,97	7,55	73,90	7,78	23,27	8,45	7,04	9,57	15,50
CEPA 12	4,57	100	5,83	46,07	6,55	11,51	7,55	101,83	7,78	20,96	8,45	5,34	9,56	11,94
CEPA 13	4,58	100	5,84	58,49	6,55	11,46	7,56	123,31	7,79	20,60	8,46	7,50	9,57	10,77
CEPA 14	4,56	100	5,83	73,27	6,54	5,42	7,54	95,43	7,77	29,08	8,44	4,56	9,55	23,92
CEPA 15	4,58	100	5,84	79,68	6,55	5,60	7,56	99,82	7,79	27,88			9,56	33,03
CEPA 27	4,56	100	5,83	141,00	6,53	6,92	7,54	257,74	7,77	62,94			9,56	32,28
CEPA 28	4,56	100	5,82	185,58			7,54	274,62	7,77	84,77			9,54	363,05
CEPA 30	4,57	100	5,83	149,10			7,54	229,04	7,78	57,67			9,56	23,77
CEPA 37	4,57	100	5,83	45,64	6,55	40,75	7,55	76,44	7,78	23,23	8,45	16,89	9,57	5,59
CEPA 44	4,57	100	5,83	31,16	6,55	37,17	7,55	43,11	7,78	20,65	8,45	19,04	9,57	8,76
CEPA 45	4,57	100	5,83	43,79	6,55	37,34	7,55	59,08	7,78	24,25	8,45	17,29	9,57	7,23
CEPA 54A	4,57	100	5,83	233,47	6,54	16,64	7,54	325,22	7,77	107,15	8,44	9,60	9,54	82,51
CEPA 56A	4,56	100	5,82	149,57	6,54	12,39	7,54	169,49	7,77	82,11	8,58	16,55	9,54	62,81
CEPA 59B	4,57	100	5,83	111,33	6,55	21,61	7,55	199,03	7,78	56,04	8,44	10,46	9,57	24,56
CEPA 65	4,57	100	5,83	34,59	6,54	30,18	7,55	47,76	7,78	20,14	8,44	12,12	9,57	7,30
CEPA 66	4,57	100	5,83	91,68	6,55	20,47	7,55	177,29	7,78	45,28	8,45	8,50	9,56	31,06

...continua...

TABELA 5, Cont.

CEPA 69	4,57	100	5,83	47,75	6,55	32,94	7,55	78,77	7,78	32,50	8,45	15,54	9,57	12,96
CEPA 71	4,57	100	5,83	88,06	6,55	8,23	7,55	134,13	7,78	33,67	8,44	3,34	9,55	54,83
CEPA 74	4,57	100	5,83	42,32	6,55	32,00	7,55	63,92	7,78	32,45	8,45	14,98	9,57	15,96
CEPA 75	4,57	100	5,83	43,48	6,55	34,40	7,55	64,16	7,78	32,05	8,45	17,91	9,57	16,34
CEPA 02V	4,57	100	5,83	54,69	6,55	33,18	7,55	100,11	7,78	20,95	8,45	6,87	9,57	3,87
CEPA 05V	4,58	100	5,84	46,54	6,55	44,75	7,55	96,80	7,78	32,31	8,45	18,86	9,57	9,80
CEPA 06V	4,57	100	5,84	40,57	6,55	44,34	7,55	78,03	7,78	25,61	8,45	12,42	9,57	5,73
CEPA 07V	4,58	100	5,84	34,70	6,55	42,29	7,55	74,08	7,78	22,42	8,45	13,01	9,57	5,04
CEPA 08V	4,58	100	5,84	25,97	6,55	47,74	7,55	55,86	7,78	19,52	8,45	21,08	9,57	6,11
CEPA 09V	4,58	100	5,84	34,40	6,55	47,38	7,55	64,33	7,78	25,57	8,45	14,53	9,57	7,14
CEPA 10V	4,58	100	5,84	36,92	6,55	50,22	7,55	72,49	7,78	25,55	8,45	22,72	9,57	8,49
CEPA 11V	4,57	100	5,83	26,97	6,55	45,34	7,55	51,17	7,78	22,52	8,45	17,06	9,57	7,83
CEPA 14V	4,57	100	5,83	27,85	6,55	27,95	7,55	36,55	7,78	9,63	8,45	5,537	9,57	2,05
CEPA 15V	4,58	100	5,84	39,97	6,55	34,77	7,55	53,08	7,78	18,47	8,45	10,27	9,57	4,32
CEPA 18V	4,58	100	5,84	39,97	6,55	34,77	7,55	53,08	7,78	18,47	8,45	10,27	9,57	4,32
CEPA 20V	4,57	100	5,83	58,05	6,55	41,89	7,55	87,03	7,78	26,60	8,45	11,12	9,57	3,92
CEPA 21V	4,58	100	5,84	52,11	6,55	36,32	7,55	100,86	7,78	21,32	8,45	8,91	9,57	3,26
CEPA 23 V	4,56	100	5,83	38,56	6,54	25,05	7,54	48,69	7,77	12,42	8,44	8,67	9,56	2,94
CEPA 27V	4,58	100	5,84	29,61	6,55	37,67	7,55	53,14	7,78	17,13	8,45	7,45	9,57	3,34
CEPA 28V	4,58	100	5,84	33,57	6,55	44,68	7,55	64,99	7,78	26,32	8,45	13,62	9,57	6,87
CEPA 29V	4,57	100	5,83	83,23	6,55	32,30	7,55	143,47	7,78	34,29	8,45	9,11	9,57	5,47

38

¹ tR tempo de retenção² AR porcentagem da área em relação ao tempo de retenção 4,5

TABELA 4 Tempos de retenção e áreas relativas aos picos detectados na análise cromatográfica de cepas de estafilococos pc-

Colônia	1TR	2AR	TR	AR	TR	AR	TR	AR	TR	AR	TR	AR
CEPA 09	4,57	100	5,83	51,18	6,54	9,10	7,54	81,81	7,78	20,46	8,44	4,55
CEPA 18	4,57	100	5,83	26,13	6,55	38,34	7,55	33,91	7,78	23,64	8,45	14,63
CEPA 24	4,58	100	5,84	50,45	6,55	19,60	7,55	79,26	7,78	40,53	8,45	7,94
CEPA 29	4,56	100	5,82	24,40	6,53	19,54	7,53	36,26	7,76	21,30	8,43	6,85
CEPA 31	4,57	100	5,83	28,72	6,55	35,28	7,55	31,93	7,78	9,60	8,44	2,78
CEPA 33	4,57	100	5,83	24,52	6,54	25,62	7,54	36,40	7,78	14,69	8,44	6,66
CEPA 34	4,57	100	5,83	11,48	6,55	19,14	7,55	17,72	7,78	11,16	8,45	4,74
CEPA 35	4,57	100	5,84	27,57	6,55	55,68	7,55	30,21	7,78	19,20	8,45	18,15
CEPA 36	4,56	100	5,83	25,47	6,54	24,96	7,54	31,91	7,77	8,73	8,44	8,45
CEPA 38	4,57	100	5,83	36,27	6,55	33,66	7,55	47,51	7,78	18,08	8,45	9,64
CEPA 39	4,57	100	5,84	28,49	6,55	29,73	7,55	37,97	7,78	15,52	8,45	10,33
CEPA 64	4,57	100	5,83	46,19	6,55	6,64	7,55	53,29	7,78	23,52	8,45	6,36
CEPA 04V	4,57	100	5,83	98,93	6,55	52,32	7,55	219,87	7,78	51,64	8,45	23,45
CEPA 16V	4,57	100	5,83	55,11	6,54	56,94	7,54	80,92	7,77	27,06	8,44	14,24
CEPA 26V	4,58	100	5,84	39,09	6,55	22,67	7,55	74,98	7,78	18,45	8,45	15,68
CEPA 30V	4,58	100	5,84	40,93	6,55	20,41	7,55	71,37	7,78	16,35	8,45	12,26

¹ tR tempo de retenção

² AR porcentagem da área em relação ao tempo de retenção 4,5min

5 CONCLUSÕES

Das 135 cepas isoladas das amostras de leite coletado em seis propriedades, 62% corresponderam a *Staphylococcus aureus*, enquanto que 38% eram *Staphylococcus pc-* (plasma coagulase negativo).

Na maioria das propriedades o microrganismo mais frequentemente isolado foi *Staphylococcus aureus*, exceto em duas propriedades, nas quais foi observado um maior isolamento de estafilococos *pc-*.

Nenhum dos isolados analisados foi produtor de toxina.

As concentrações de *Staphylococcus spp* encontradas nas propriedades são preocupantes, pois não estão somente associadas a um efeito negativo sobre a qualidade do produto final que chega ao consumidor, mas também relacionadas com riscos à saúde humana.

Pela comparação dos tR obtidos com aqueles da literatura e pela análise do espectro de massas, conclui-se que os principais AG detectados em *Staphylococcus spp* correspondem a i-C_{15:0} ou a- C_{15:0} (12-metiltetradecanoato de metila ou 13-metiltetradecanoato de metila); C_{17:0} (hexadecanoato de metila); C_{18:0} (oleato de metila); C_{18:1} (estearato de metila) e C_{20:0} (araquidato de metila).

Não foram observadas diferenças entre a composição de AG de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pc-*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F. M.; ANDERSEN, J. K.; JENSEN, N. E. Lack of staphylococcal enterotoxin production among strains of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Denmark, v. 36, n. 2, p.273-275, 1995.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA.. ANVISA. Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1232p.
- ARAUJO, W. C. *Staphylococcus aureus* em leite cru: produção de enterotoxinas, caracterização da origem provável humana ou bovina a partir de cepas isoladas. São Paulo: USP, 1984. 120p. (Tese Mestrado).
- AUSTIN, B.; PRIEST, F. **Modern bacterial taxonomy**. Worcester: Billing & Sons, 1986. Cap.3, p.50-94.
- BALOWS, A; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application**. 2ª ed. New York: Springer -Verlang, 1991, v.1, cap.5, p.126-144.
- BEHME, R. J.; SHUTTLEWORTH, R.; McNABB, A.; COLBY, W. D. Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.34, n.12, p.3075-3084, Dec. 1996.
- BOE, B.; GJERDE, J. Fatty acid patterns in the classification of some representatives of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae, *Journal General Microbiology*, Great Britain, v.116, n.1, p.41-49, Jan. 1980.
- BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1999. p.141-181.
- BRABES, K. C. S. Detecção de *Staphylococcus* spp e suas enterotoxinas em leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite. Lavras: UFLA, 1999. 74p. (Dissertação Mestrado em Microbiologia de Alimentos).

- BRANT, M. C.; FIGUEIREDO, J.B. Incidence of clinical mastitis and milk production losses in dairy cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.46, n.6, p.595-606, 1994.
- BRAY, D. R.; SHEARER, J. K. Milking Management II – Mastitis. **Fact Sheet DS 63, Florida**, [on line] Apr. 1993. Disponível: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/DS/DS11100.pdf> [Capturada em jan. 2001].
- BRITO, R. F. B; CALDEIRA, G. A. F; VERNEQUE, R. S.; BRITO, M.A.V. P. Sensibilidade e especificidade do “Califórnia Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p.49-53, abr./jun. 1997.
- BRONDZ, I.; OLSEN, I. Whole-Cell methanolysis as a rapid method for differentiation between *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.11, n.4, p.347-353, 1984.
- BRONDZ, I.; OLSEN, I. Microbial chemotaxonomy – chromatography electrophoreses and relevant profiling techniques. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.379, n.4, p.367-411, 1986.
- BRONDZ, I.; OLSEN, I. Chemotaxonomy at a crossroads? Gas chromatographic analysis of a single colony from the bacterium *Haemophilus aphrophilus*. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.374, n.2, p.119-124, 1986.
- CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Bacterial composition in the rhizosphere of nodulating and non-nodulating soybean. **Soil Society of American Journal**, Madison, v.62, n.6, p.1549-1555, Nov/Dec, 1998.
- CHOU, S.; CHEDORE, P.; HADDAD, A.; PAUL, N.R.; KASATTIYA, S. Direct identification of mycobacterium species in bactec 7H12B medium by gas-liquid chromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, n.5, p.1317-1320, May 1996.
- COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas: UNICAMP, 1999, p. 279.

- COSTA, E. O. O fantasma da mastite. **Pardo-Suiço em Revista** [on line] ed.39 Anuário 98/99. Disponível: <http://www.bihboonline.com.Br/artigo/ps0012.htm> [capturado em jan. 2001].
- COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; SILVA, L. A. B.; GARINO JR., F.; BENITES, N. R.; HORIUTI, A. M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **NAPGAMA**, São Paulo, v.2, n.2, p.16-20, mar/abr. 1999.
- COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; COSTA, E. O. da; BENITES, N. R.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; COSTA, E. O. Aetiological study of bovine clinical mastitis. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.17, n. 4, p.156-158, jul/ago. 1995.
- COWAN, S. T. **A dictionary of microbial taxonomic usage**. Edinburgh: Oliver & Boyd, 1968. 118p.
- DURHAM, D. R.; KLOOS, W. E. Comparative study of the cellular fatty acids Staphylococcus species of human origin. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading. v.28, n.2, p.223-228, Mar/Abr. 1978.
- EEROLA, E.; LEHTONEN, O. P. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, n.9, p.1745-1753, Sept. 1998.
- EL SUKHON, S. N. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Jordam. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**. Nairobi, v.43, n.4, p.231-235, Oct/Dec. 1995.
- FARIA, J. E.; PINTO, S. M.; DALE, R.; ZAMPERLINI, B. Influência da vacinação sobre o nível de infecção estafilocócica da glândula mamária de vacas leiteiras submetidas a desafios naturais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.104-108, maio/ago. 2000.
- FERREIRO, L. Agentes etiológicos e terapêuticos da mastite bovina no Brasil. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.6, n.1, p.77-88, dez. 1978.

FERREIRO, L.; SANTOS, E. C.; SILVA, N. Ocorrência e etiologia da mastite na "Zona da Mata" do Estado de Minas Gerais. **Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p.31-37, abr. 1981.

FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus*, isolados de vacas com mastite. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.315-319, 1990.

FURLANNETO, S. M. P.; NADER FILHO, A.; WILSON, D. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.18, n.2, p.138-143, 1987.

GAY, J. M.; FOX, L. K. **Staphylococcus aureus detection: does the STAPH-AB test fit? 2000.** [on line] Disponível: <http://www.edu.biotech/worksnop/activity/act16/annexd3.htm>. [capturado em jan. 2001].

GILAROVÁ, R.; VOLDRICH, M.; DEMNEROVÁ, K.; CEROVSKY, M.; GOBIÁS, J. Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, p.315-319, 1994.

GOMES, H. A.; GALLO, C. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "Minas Frescal" comercializados em Piracicaba-SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.15, n.2, p.158-161, jul/dez. 1995.

GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D.E. (ed). **Chemical methods in bacterial systematic**. London: Academic Press, 1985, 410p.

HARROP, M. H. V.; PEREIRA, L. J. G.; BRITO, J. R. F. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da Zona do Agreste Meridional de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, Brasília, v.10, p.595-598, 1975.

IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHIGAKI, M.; BERGDOLL, M. S. Látex agglutination test for staphylococcal toxin shock syndrome. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.23, n.3, p.509-512, 1986.

J & W SCIENTIFIC, 1998 Catalog, Technical Reference & Coorbook. [on line] Disponível: <http://www.chem.agilent.com/cag/cabu/pdf/c068.pdf> [capturado em jan.2001].

- JARVIS, B. D. W.; SIVAKUMARAM, S.; TIGHE, S. W.; GILLIS, M. Identification of agrobacterium and rhizobium species based on cellular fatty acid composition. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.184, p.143-158, 1996.
- JONES, G. M.; BAILEY JR., T. L.; ROBERSON, J. R. *Staphylococcus aureus* mastitis: cause, detection, and control. **Dairy Science**. Publication 404-229. 1998. [on line] Disponível em <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-229/404-229.pdf>. [capturado em nov. 2000].
- KENDALL, P. **Bacterial food-borne illness**. Colorado State University Cooperative Extension. Food & Nutrition. 1998 [on line]. Disponível: <http://www.ext.colostate.edu/pubs/foodnut/09300.htm> [capturado em jan. 2001].
- KOMAGATA, K., SUZUKI, K. I. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics, **Methods in Microbiology**, Tokyo, v.19, n.2, p.161- 207, 1987.
- KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P.; EEROLA, E. Application of gas-chromatography analysis of cellular fatty acids for species identification and typing of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, n.2, p.315-322, Feb. 1991.
- LANGENEGGER, J.; COELHO, N. M.; LANGENEGGER, C. H. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.5, p.437-440, maio 1997.
- LARANJA DA FONSECA, L. F.; PEREIRA, C. C. Importância, fatores determinantes e métodos de controle da qualidade microbiológica de leite. **Revista Raça Jersey**, [on line]. n.24. mar/abr. 1999. Disponível: <http://www.bichonline.com.br/artigo/jersey0002.htm>. [capturado em jan. 2001].
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M., **Princípios da Bioquímica**, 2. ed., São Paulo: SARVIER, 1995, 839p.
- LEITE, R.L. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo “Minas Frescal” e “Minas Padrão” elaborados com leite proveniente de vacas com mastite subclínica. Lavras: UFLA, 2000. 68p. (Dissertação – Mestrado em Microbiologia de Alimentos).

- MAHBUB, E.; ELAHI, A. T. M.; RAHMAN, M. A.; RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. M.; RAHMAN, M. M.; PRODHAN, M. A. M. Isolation and identification of bacteria from different quarters of mastitis affected dairy cows in Bangladesh. **Bangladesh Veterinary Journal**, Mymensingh, v.30, n.1/2, p.63-65, Jan/June. 1996.
- MARSHALL, R. P. **Standard methods of the examination of dairy products**. 16.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 416p.
- MIHAIU, M.; ROTARU, O.; MIHAIU, R. E.; GUS, C. Studies on the correlation between milk somatic cell count and microbial flora. **Buletinul Universitatii de Stiinte Agricole Cluj Napoca. Seria Zootehnie si Medicina Veterinara, Romania**, v.50, p.89-92, 1996.
- MILLER, L. T. Single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. **Journal Clinical Microbiology**, Pennsylvania, v.16, n.3, p.584-586, Sept. 1982.
- MITRUKA, B. M.; BONNER, M. J., **Methods of detection and identification of bacteria**. United States: CRC Press, Inc. 1967, 255 p.
- MOSS, C. W.; HOWELL, R. T.; FARSHY, D. C.; DOWELL, V. R.; BROOKS, J. B. Volatile acid production of *Clostridium botulinum* type F. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.16, n.3, p.421, Mar. 1970.
- NARDER FILHO, A; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JUNIOR, O. D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite tipo B. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.36, n.5, p.621-629, 1983.
- NARDER FILHO, A; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JUNIOR, O. D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2%. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 36, n. 5, p. 549-558, out, 1984.
- NARDER FILHO, A; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JUNIOR, O. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Belo Horizonte, v.5, n.2, p.53-56, out. 1985.

- OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. [on line] Disponível: <http://www.bichoonline.com.br/artigo/ha0012.htm>. [capturada em fevereiro. 2001].
- PINHEIRO DE SÁ, M. E; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I.; OLIVEIRA, A. A. F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Pernambuco, v.7, n.2, p.100-103, maio/ago. 2000.
- PRESTES, N. C.; LANGONI, H.; CORDEIRO, L. A. V. Estudo do leite de éguas sadias ou portadoras de mastite subclínica, pelo teste de Whiteside, análise microbiológica e contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. [on line]. São Paulo, v.36, n.3, 1999. Disponível: <http://www.scielo.br/cgi-bin/fbpe/fbtext?...id=S1413-95961999000300007&lng=pt&nrm=iso>. [capturada em dez. 2000].
- REMENTZIS, J.; SAMELLIS, J. Rapid GC analysis of cellular fatty acids for characterizing *Lactobacillus sake* and *Lact. curvatus* strains of meat origin. **Letters in Applied Microbiology**, Athens, v.23, n.6, p.379-84, Dec. 1996.
- RUEGG, P. **Emerging mastitis pathogens: are these “bugs” in your future?** [on line]. Disponível: <http://www.wisc.edu/dysci/uwex/milk/pubs/newpath.pdf>. [capturado em jan/ 2001].
- SABIONE, J. G.; MAIA, A. R. P. Correlação entre a população de *Staphylococcus aureus* e a atividade de termonuclease, em queijos Minas-Frescal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.54, p.48-50, mar/abr. 1998.
- SANJEEV, A.; SURENDRAN, P. K. Evaluation of reversed latex agglutination test kits for the detection of staphylococcal enterotoxin A, B, C and D in fishery products. **Journal of Food Science Technology**, Mysou, v.29, n.5, p.311-312, Sept/Oct. 1992.
- SANTOS, M. V. **Estafilococos coagulase-negativo – mastite ou contaminação?** 2001. [on line]. Disponível: <http://www.milkpoin.com.br/secoes/radar/detradar.asp?dicasid=291&secoesid=6>. [capturado em jan.2001]

- SANTOS, M. V. **Mastite clínica reduz a produção e aumenta o descarte de leite.** 2000. (on line). Disponível: <http://www.milkpoin.com.br/secoes/radar/detradar.asp?dicasid=143&secoesid=6>. [capturado em jan. 2001].
- SCHLEIFER, K. H.; KROPENSTEDT, R. M. Chemical and molecular classification of staphylococci. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.69, n.9, p.9S-24S, Aug. 1990.
- SHAW, N. Bacterial glycolipids and glycophospholipids. **Advances in Microbiology and Physiology**, San Diego, v.12, p.141-167, 1975.
- SHOUKRY, S.; SABANA, M. S. Prevalence of bovine subclinical mastitis en dairy cows and buffaloes in some villages in Ismailia Governorate. **Egyptian Journal of Agricultural Research**, Giza, v.75, n.3, p.799-809, 1997.
- SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.2, p.103-106, Abr/Jun. 2000.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos 6ª edição, Rio de Janeiro: LTC, 1998, 460p.
- SINCOWEAY, H.; MIYAGAWA, E.; KUME, T. Cellular fatty acid composition in staphylococci isolated from bovine milk. **National Institute of Animal Health Q (J pn.)**, Tokyo, v.21, p.14-20, 1981.
- SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPPTAA, 1995. 159p.
- STALEY, J. T.; KRIEG, N. R. Classification of prokaryotic organism: an overview In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. United States: Wavely Press, 1986. v.2, p.965-968.
- STEELE, M.; MCNAB, W.B.; READ, S.; POPPE, C.; HARRIS, L.; LAMMERDING, A.M.; ODUMERU, J.A. Analysis of Whole-cell fatty acid profiles of verotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* with the microbial identification system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.2, p.757-760, Feb. 1997.

- STEINBRUECKNER, B.; HAERTER, G.; PELZ, K.; BURNENS, A.; KIST, M. Discrimination of *Heliobacter pullorum* and *Campylobacter lari* by analysis of whole cell fatty acids extracts, **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.168, p.209-212, Sept. 1998.
- STOAKES, L.; JOHN, M. A.; LANNIGAN, R.; SCHIEVEN, B. C.; RAMOS, M.; HARLEY, D.; HUSSAIN, Z. Gas-liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.24, n.8, p.1908-1910, Aug. 1994.
- TORNABENE, T.G. Lipid analysis and the relationship to chemotaxonomy In: GOODFELLOW, M.; BOARD R. G. (eds). **Methods in Microbiology**, London: Academic Press, 1985. v.18, p.209-234.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999. 586p.
- TRÜPER, G. H.; SCHLEIFER, D.H. Characterization and identification In BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDES, W.; SCHLEIFER, D. H. e SCHLEIFER, K. H., **The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria: exophysiology, isolation, identification, applications**. New York: Springer-Verlag, 1991. v.1, cap.5, p.126-148.
- VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J. A. VADILLO, S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.5, p.1323-1326, 1990.
- VIEIRA DA MOTA, O; DONATELE, D.M.; OLIVEIRA, P.R.; FOLLY, M.M. *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina provenientes de leite mastítico no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v.7, n.2, p.123-126, maio/ago. 2000.
- WAUTHOUZ, P; EL LIQUE, M.; DECALLONE, J. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids in the identification of foodborne bacteria, **Journal of Food Protection**, Belgium, v.58, n.11, p.1234-40, Nov. 1995.
- WELCH, D. F. Applications of cellular fatty acid analysis **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 4, n.4, p.422-438, Oct/Dec. 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2000. Austrália. [on line]. Disponível: <http://www.health.gov.au/pubhlth/cdiht.htm>. [capturado em janeiro 2001].

ZECCONI, A. Mastiti causate da streptococcus agalactiae e staphylococcus aureus. **L'Informatore Agrário**, [on line], v.10, n.36, Sept. 1996. Disponível: <http://www.aral.lom.it/biblio/latte/1a.htm>. [capturado em setembro de 2000].

ANEXOS A

FIGURA 8 - Cromatograma referente a cepa <i>S. aureus</i> utilizado para o cálculo de R.....	52
FIGURA 9 - Cromatograma referente aos padrões utilizados para o cálculo de R	53
FIGURA 10 - Cromatograma obtido pelo equipamento acoplado ao EM.....	54
FIGURA 11 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 4,58 min	55
FIGURA 12 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 5,84 min	56
FIGURA 13 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 7,55 min	57
FIGURA 14 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 7,78 min	58
FIGURA 15 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 8,45 min	59
FIGURA 16 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 9,75 min	60

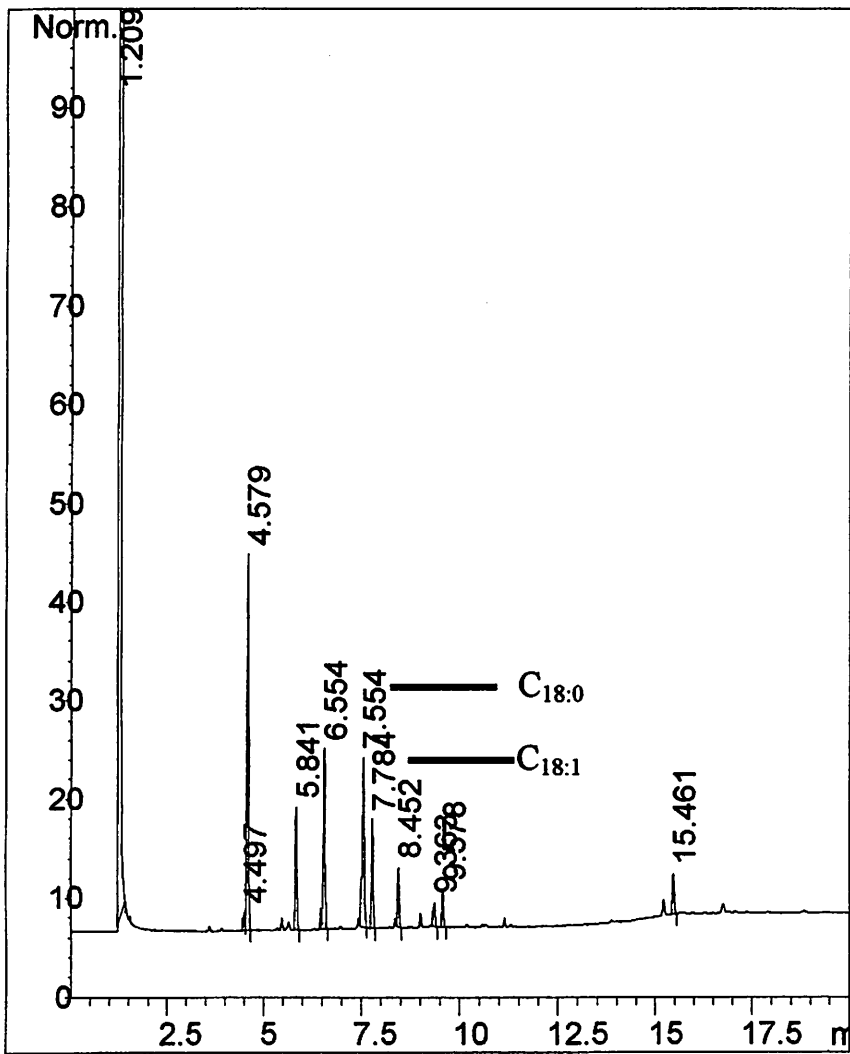


FIGURA 8 - Cromatograma referente à cepa *S. aureus* utilizado para o cálculo de R

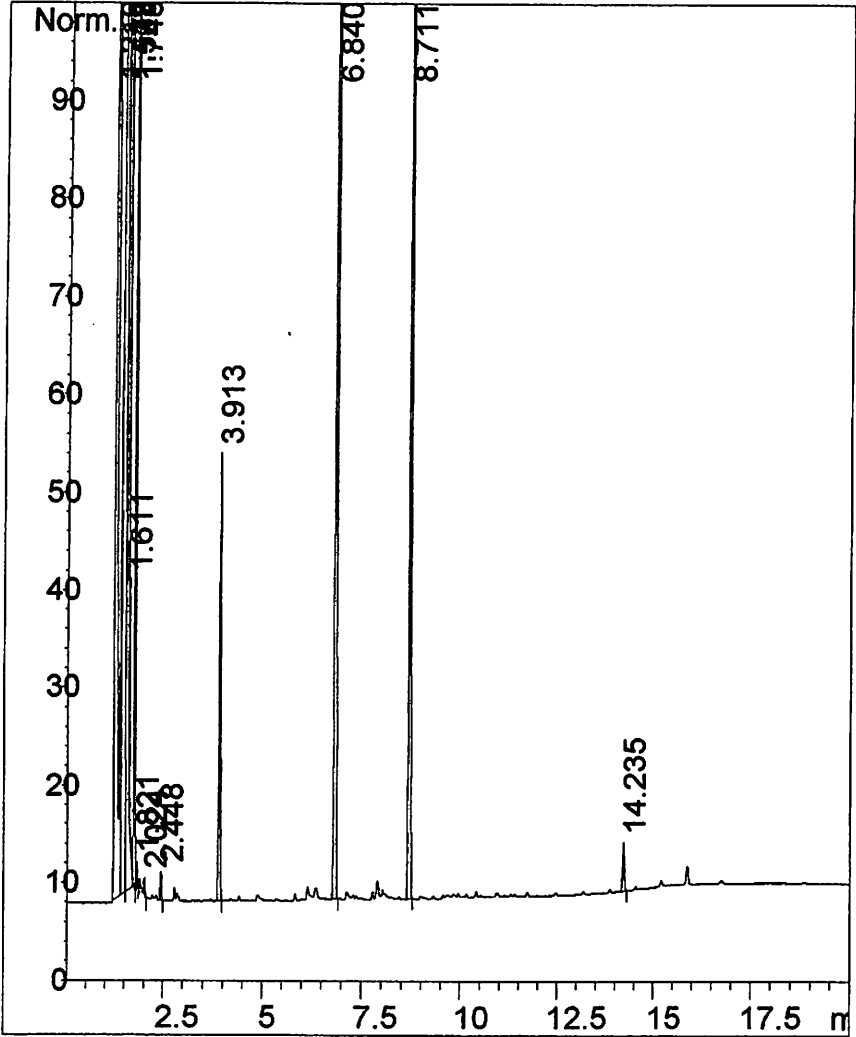
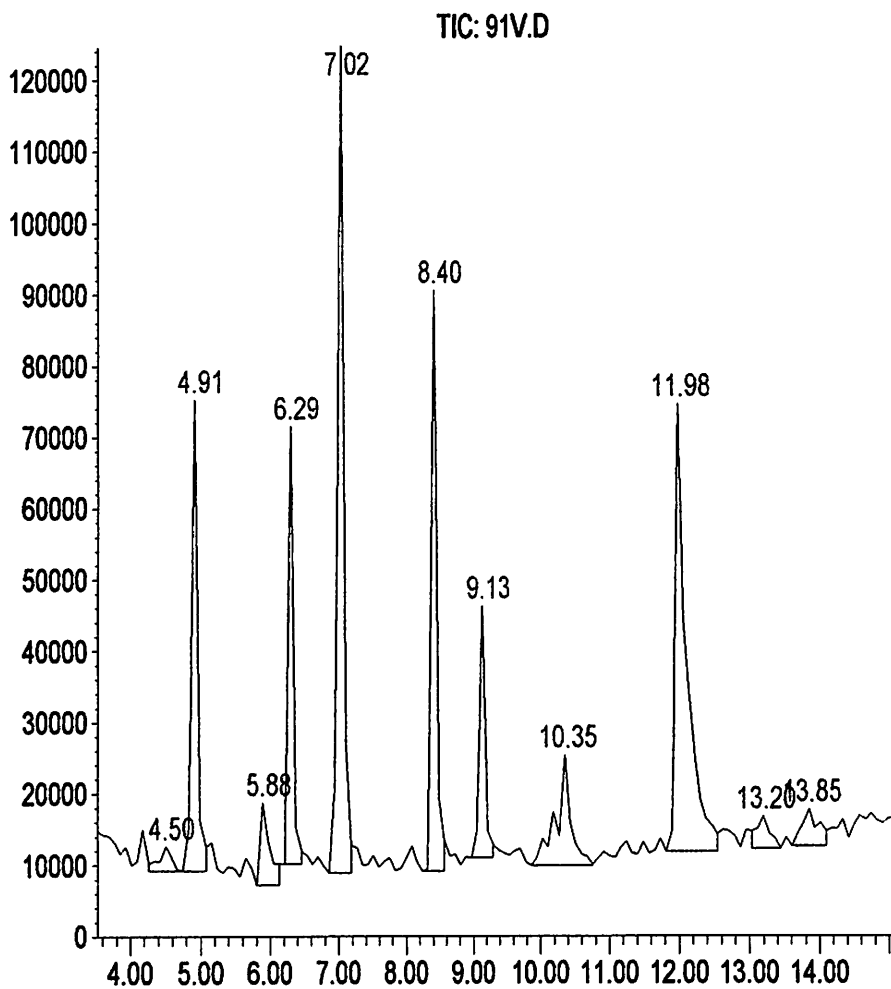


FIGURA 9 - Cromatograma referente aos padrões utilizados para o cálculo de R

Abundance



Time-->

FIGURA 10 - Cromatograma obtido pelo equipamento acoplado ao EM

Abundance

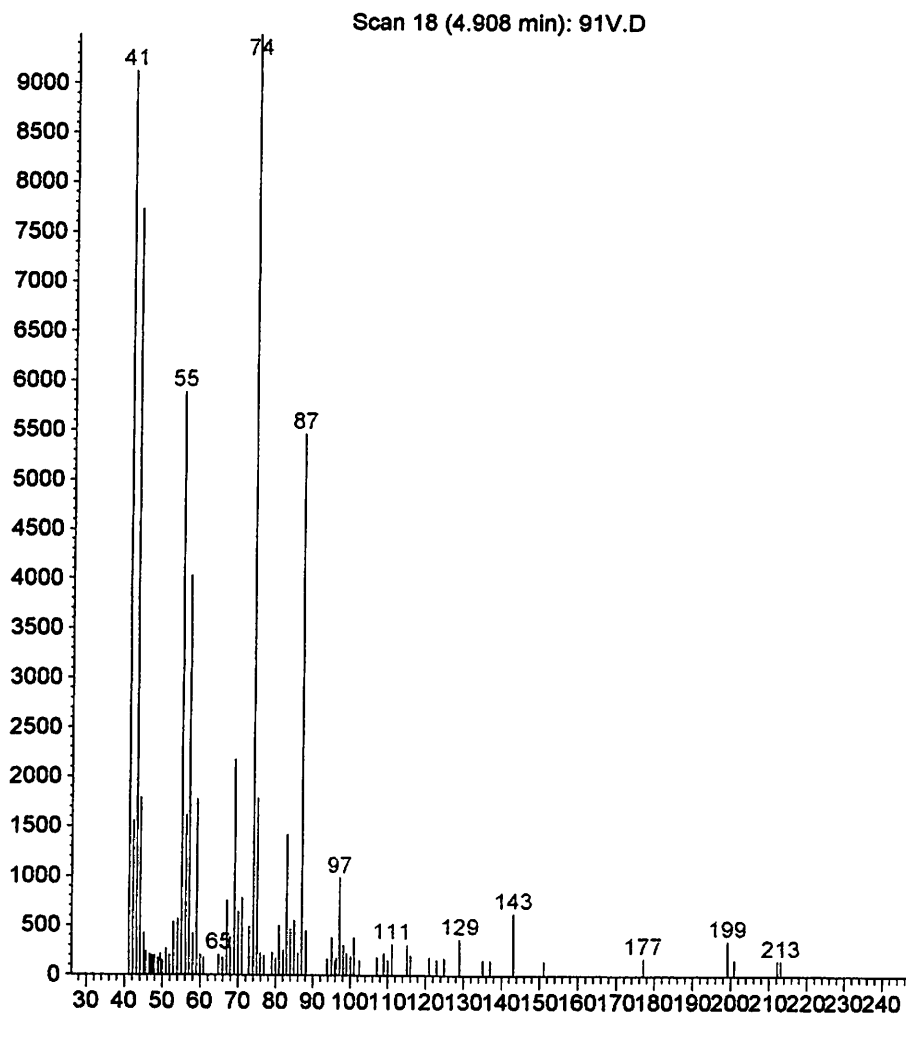


FIGURA 11 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 4,58min.

Abundance

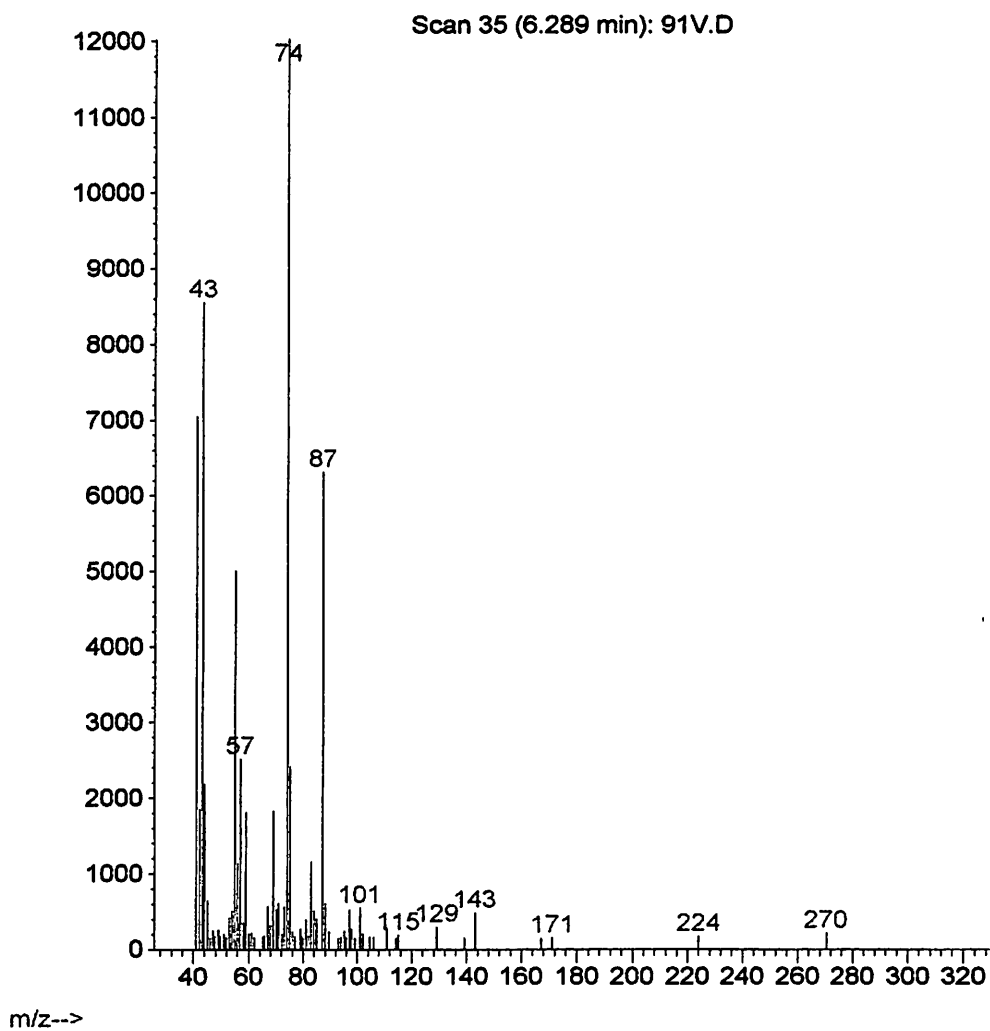


FIGURA 12 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 5,84min.

Abundance

Scan 61 (8.402 min): 91V.D

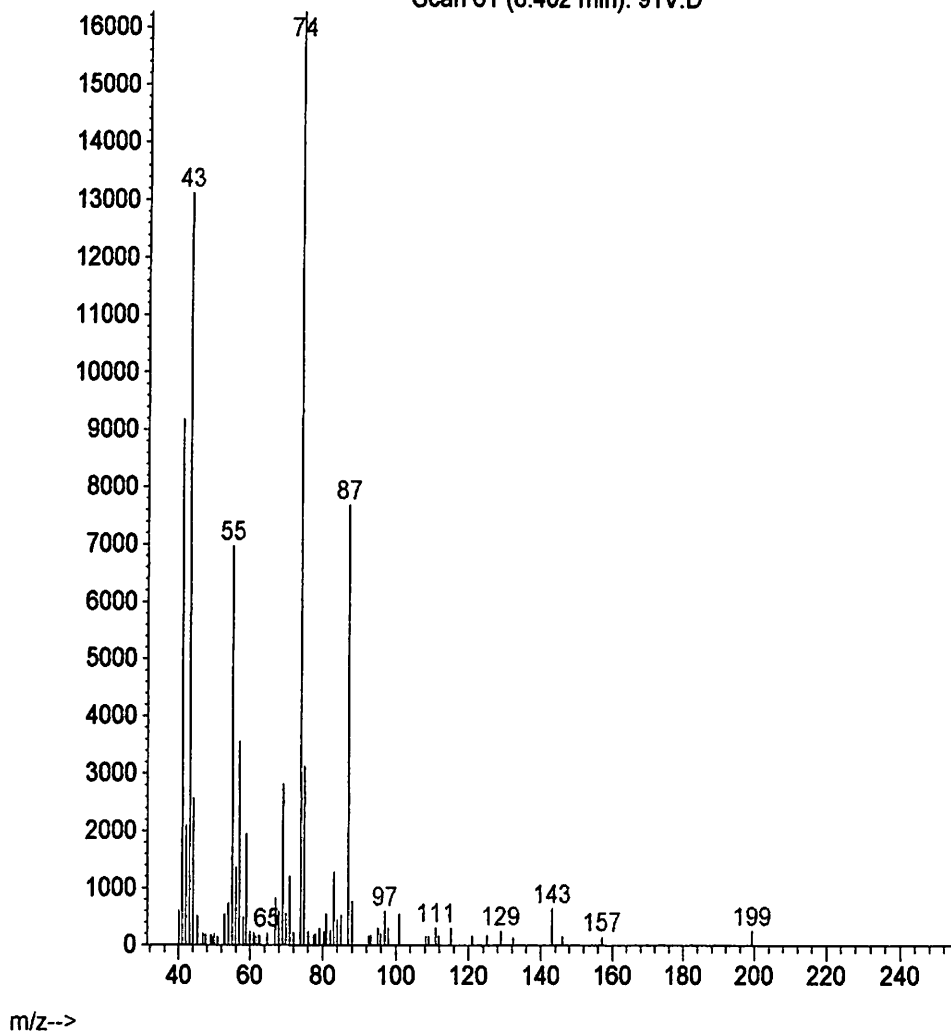
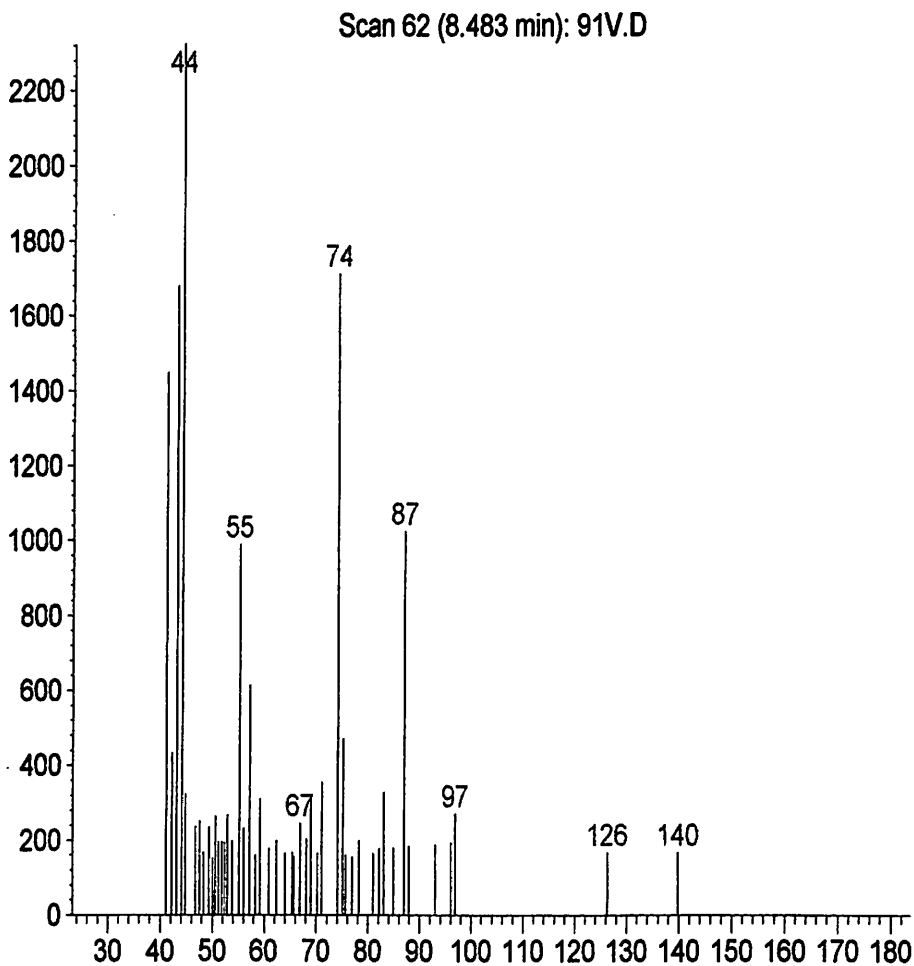


FIGURA 13 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 7,55min.

Abundance



m/z-->

v

FIGURA 14 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 7,78min.

Abundance

Scan 70 (9.133 min): 91V.D

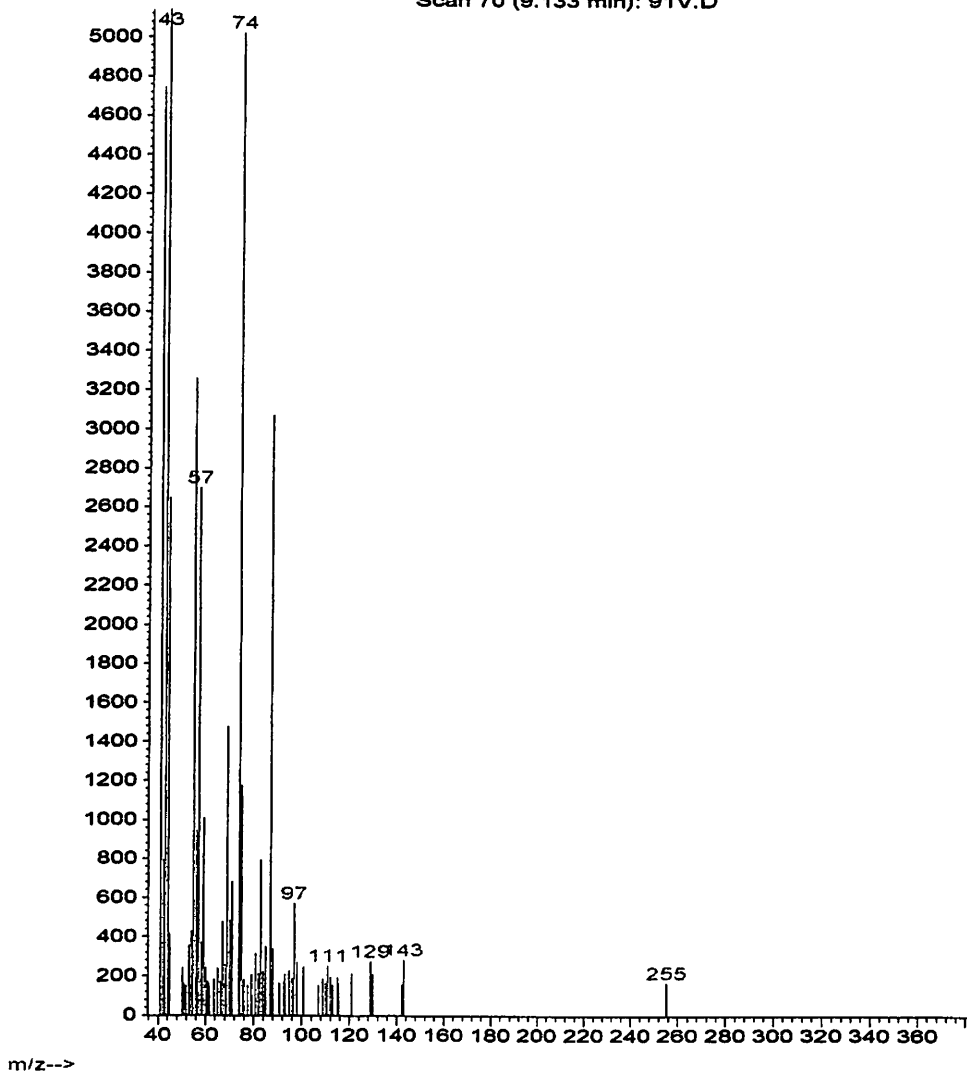


FIGURA 15 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 8,45min.

Abundance

Scan 85 (10.352 min): 91V.D

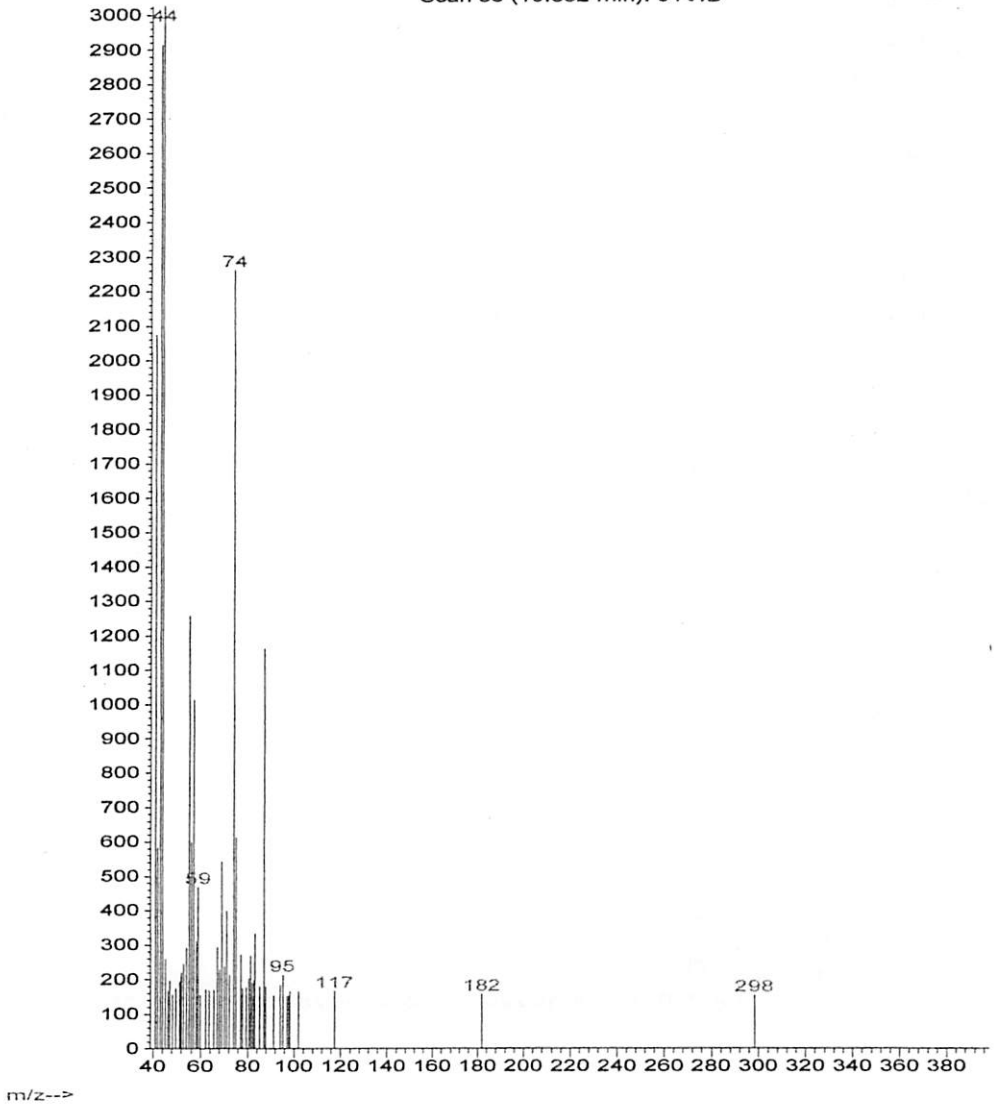


FIGURA 16 - Espectro de massas referente ao tempo de retenção 9,75min.