

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL
EM DEFESA AGROPECUÁRIA**

**DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA
DE LEITE CRU DESTINADO A UM LATICÍNIO DO
RECÔNCAVO DA BAHIA**

Lourival Souza Silva Junior

**CRUZ DAS ALMAS – BA
2018**

DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE LEITE CRU DESTINADO A UM LATICÍNIO DO RECÔNCAVO DA BAHIA

Lourival Souza Silva Junior

Bacharel em Medicina Veterinária

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Defesa Agropecuária na Área de Diagnóstico e Vigilância Epidemiológica.

Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

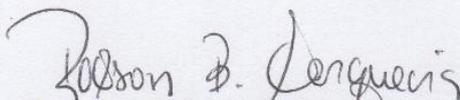
**CRUZ DAS ALMAS – BA
2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL
EM DEFESA AGROPECUÁRIA**

**DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE
LEITE CRU DESTINADO A UM LATICÍNIO DO RECÔNCAVO DA
BAHIA**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Lourival Souza Silva Junior

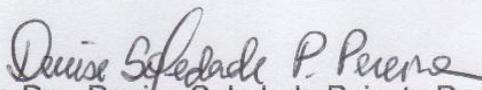
Aprovada em: 31 de Agosto de 2018



Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - Orientador



Profa. Dra. Lilian Porto de Oliveira
Instituto Federal Baiano – Examinador Externo



Profa. Dra. Denise Soledade Peixoto Pereira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lourival Souza e Sônia Dias, a minhas irmãs Larissa Souza e Lorena Souza e, a minha noiva Bianca Pimentel, pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida, por seu amor infinito, e por me abençoar e me dar forças para realizar meu trabalho e vencer os obstáculos.

A toda minha família, pelo apoio, demonstrações de carinho e orações, em especial aos meus pais Lourival e Sônia, minhas irmãs Larissa e Lorena, minha avó Maria José, meu cunhado Tarciso e minha noiva Bianca, amo muito todos vocês.

Ao meu orientador professor Robson Bahia Cerqueira por toda paciência, apoio e orientação.

Ao pessoal do Laboratório N6, por todo apoio e acolhimento, em especial a professora Ludmilla por ceder o laboratório para realizar as análises e a Marcel, por toda paciência e acolhimento.

Aos amigos que estiveram comigo nessa batalha, em especial a Luana, Vinícius, Kayck e Dedel, que estiveram sempre dispostos a ajudar

Aos demais amigos que, de alguma forma me ajudaram nesse período.

Muito obrigado!

EPÍGRAFE

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

Mahatma Gandhi

DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE LEITE CRU DESTINADO A UM LATICÍNIO DO RECÔNCAVO DA BAHIA

RESUMO: Objetivou-se com o presente estudo realizar diagnóstico da qualidade higiênico-sanitária de leite cru resfriado ou não, destinado a um laticínio para fabricação de derivados do leite. As amostras foram obtidas através da coleta de leite de todas as propriedades fornecedoras de um laticínio no Recôncavo da Bahia (nove propriedades). As amostras foram obtidas utilizando frascos com rosca esterilizados. Para cada propriedade foram feitas três repetições, com intervalo de quatro dias entre elas. Após realização das coletas as amostras foram mantidas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, e encaminhadas para o LIAA do CCAAB da UFRB. Para realização das análises microbiológicas, foram utilizados os meios de cultura: ágar de Levine (EMB), ágar Bile-Esculina e ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo. Todas as propriedades analisadas neste experimento, apresentaram contagem de SCN, com contagem média máxima de 5,173 log UFC/ml. As amostras de leite colhidas nas propriedades apresentaram contagens de SCP inferiores aos estabelecidos pela IN51 (7 log UFC/ml). O presente estudo demonstrou que mais da metade das propriedades analisadas (55,55%) apresentaram amostras de leite contaminadas por *E. coli*, com contagem média máxima 5,751 log UFC/ml. Para a bactéria do gênero *Enterococcus spp.*, houve crescimento desses microrganismos em 88,88% das amostras analisadas. Foi observado que apesar de ter encontrado a presença de bactérias patogênicas nas amostra analisadas, o leite estava próprio para a produção de derivados, pois a contagem bacteriana estava dentro dos padrões estabelecidos pela legislação em vigor. Faz-se importante a revisão dos padrões de aceitação destes microrganismos, visando evitar surtos de toxinfecção em pessoas que venham a consumir leite e derivados.

Palavras-chave: análise microbiológica; boas práticas; lácteos.

DIAGNOSIS OF THE HYGIENIC-SANITARY QUALITY OF RAW MILK INTENDED FOR A DAIRY OF THE RECHARGE OF BAHIA

ABSTRACT: The objective of this study was to carry out a diagnosis of the hygienic-sanitary quality of raw milk, cooled or not, destined to a dairy for the manufacture of dairy products. Samples were obtained by collecting milk from all dairy supply properties in the Recôncavo da Bahia (nine properties). Samples were obtained using sterilized screw vials. For each property, three replications were done, with a four-day interval between them. After collection, the samples were kept in an isothermal box containing recyclable ice, and sent to the LCAA of the CCAAB of UFRB. In order to perform the microbiological analysis, culture media were used: Levine agar (EMB), Bile-Esculin agar and Baird-Parker agar enriched with egg yolk. All the properties analyzed in this experiment had a SCN count, with a mean maximum count of 5,173 log CFU / ml. The milk samples collected at the farms presented SCP counts lower than those established by IN51 (7 log CFU / ml). The present study showed that more than half of the analyzed properties (55.55%) had samples of milk contaminated by *E. coli*, with a maximum mean count of 5,751 log CFU / ml. For bacteria of the genus *Enterococcus spp.*, There were growth of these microorganisms in 88.88% of the samples analyzed. It was observed that in spite of having found the presence of pathogenic bacteria in the sample analyzed, the milk was suitable for the production of derivatives, since the bacterial count was within the standards established by the legislation in force. It is important to review the acceptance patterns of these microorganisms, in order to avoid outbreaks of toxinfection in people who will consume milk and derivatives.

Keywords: microbiological analyzes, good practices, dairy

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCAAB	Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
IN 51	Instrução Normativa 51
LIAA	Laboratório de Investigação Analítica de Alimentos e de Água
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRB	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 RELEVÂNCIA DA CRIAÇÃO DE BOVINO DE LEITE NO RECÔNCAVO.....	14
3.2 QUALIDADE DO LEITE <i>IN NATURA</i>	15
3.3 PRINCIPAIS CAUSAS DE CONTAMINAÇÃO DO LEITE	16
3.4 PRINCIPAIS AGENTES INFECCIOSOS E IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA .	17
3.5 ASPECTO ECONÔMICO E PREJUÍZOS CAUSADOS PELO LEITE CONTAMINADO.....	18
3.6 FORMAS DE TRANSMISSÃO DE AGENTES BACTERIANOS.....	19
3.7 TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA AVALIAÇÃO DO LEITE	20
3.7.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS	20
3.7.1.1 EXAME DE ESFREGAÇOS	21
3.7.1.2 TÉCNICAS MOLECULARES	21
3.7.1.3 SOROAGLUTINAÇÃO RÁPIDA (SAR)	22
3.8 MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO.....	22
REFERÊNCIAS	24
ARTIGO 1.....	28
ANEXO	46

1 INTRODUÇÃO

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2011).

O leite possui uma composição química importante em termos nutricionais, sendo amplamente consumido em todo o mundo (MENEZES et al., 2014). A presença e os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade da composição, que, por sua vez, é influenciada pela alimentação, manejo, genética e raça do animal (BRITO; BRITO, 2001). Devido a sua riqueza em nutrientes, o leite é um substrato ideal para a proliferação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, os quais representam um risco à saúde da população, principalmente quando este alimento é ingerido sem tratamento térmico, ou quando o tratamento é ineficiente (SANTOS, 2016).

A pecuária leiteira é uma atividade de suma importância para o Brasil (WERNCKE et al., 2016). Entretanto, o leite produzido no país geralmente contém altas contagens de microrganismos, o que indica falhas na higiene da produção (MÖRSCHBÄCHER; REMPEL; MACIEL, 2017).

Para melhorar a qualidade do leite e derivados produzidos no Brasil, foi implantada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a Instrução Normativa nº 62, a qual estabelece as condições em que deve ser obtido o leite cru refrigerado, conservados, coletados e transportados, a fim de preservar sua qualidade desde a ordenha até a sua entrada na fábrica de laticínios sob inspeção sanitária oficial (MÖRSCHBÄCHER; REMPEL; MACIEL, 2017).

A maioria dos pequenos produtores ainda realiza práticas de higiene de ordenha e de gestão agrícolas ineficazes, resultando em leite de baixa qualidade, com grandes perdas econômicas para a indústria (SOUZA, 2007). Contudo, as transformações na cadeia produtiva do leite têm elevado a pressão para a especialização dos produtores de leite (YUEN et al., 2012).

A produção de matérias primas de alta qualidade é um dos principais desafios para o aumento da competitividade do sistema agroindustrial do leite. Dentro deste contexto, a característica boa do leite cru é um dos principais pré-requisito para

otimizar o processamento, rendimento e aceitabilidade dos derivados lácteos (CORTINHAS, 2013). A indústria se preocupa cada vez mais com a qualidade do leite, por questões de produtividade industrial e cumprimento da IN 62. Neste sentido, cresce a valorização do leite que atenda às exigências dos laticínios, além de obter um preço diferenciado por ele (TEIXEIRA et al., 2018).

Quando o leite é utilizado com finalidades comerciais e alimentícias, é de fundamental importância a aplicação de medidas de controle de qualidade, que visam evitar riscos à saúde do consumidor, e também dos animais produtores (ALMEIDA JUNIOR; OZELIN, 2017).

Quando o leite sai do úbere de um animal sadio, é relativamente livre de microrganismos. Porém, é inevitável a contaminação oriunda de diversas fontes (ROCHA et al., 2015). Os microrganismos contaminam o leite geralmente por falta de cuidados com a limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha e do sistema de refrigeração, por falta de higiene pessoal do ordenhador, falta de higiene com os tetos, pela água contaminada e também pela presença de mastite nas vacas (TEIXEIRA et al., 2018). Além disso, deve-se considerar que podem ocorrer contaminações adicionais e crescimento microbiano durante o transporte e estocagem na indústria (CITADIN et al., 2009).

A exigência cada vez maior de alimentos de qualidade por parte dos agentes comerciais internacionais exige do país um rigoroso controle do leite e derivados produzidos (MARTIN, 2011). Dessa forma, é importante que a microbiota do leite seja conhecida e controlada, uma vez que diversos microrganismos patogênicos aos seres humanos podem ser veiculados por produtos lácteos de baixa qualidade. Logo, os métodos de conservação são fundamentais para reduzir a carga microbiana, proporcionando melhor qualidade nutricional ao produto, maior vida de prateleira e maior segurança alimentar aos consumidores (MENEZES et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar diagnóstico da qualidade higiênico-sanitária de leite cru resfriado ou não destinado a um laticínio no Recôncavo da Bahia para fabricação de derivados do leite.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar através das avaliações microbiológicas se os parâmetros de higiene no momentos de obtenção do leite são seguidos;
- Quantificar a carga microbiana de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus* coagulase negativa, *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* presentes no leite.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RELEVÂNCIA DA CRIAÇÃO DE BOVINO DE LEITE NO RECÔNCAVO

Conforme os resultados preliminares do Censo Agropecuário (2017), a Bahia produziu um total 844.417.038 litros de leite de vaca no período de outubro de 2016 a setembro de 2017, dos quais, os 20 municípios que formam o Território de Identidade Recôncavo foram ordenhadas 3.809 vacas, responsáveis pela produção de 3.858.987 litros (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de leite de vaca nos municípios do Recôncavo Baiano no ano-safra outubro de 2016 a setembro de 2017.

Município	Nº de estabelecimentos que produziram leite	Quantidade de leite produzida (Litros)
Cachoeira	32	138.944
Cabaceiras do Paraguaçu	72	278.019
Castro Alves	29	316.950
Conceição do Almeida	33	136.975
Cruz das Almas	31	119.464
Dom Macêdo Costa	22	209.432
Governador Mangabeira	26	39.925
Maragogipe	34	33.799
Muniz Ferreira	37	380.039
Muritiba	13	39.492
Nazaré	6	47.100
Santo Amaro	47	119.937
Santo Antônio de Jesus	42	246.680
São Felipe	20	39.407
São Félix	9	17.580
São Francisco do Conde	6	42.450
São Sebastião do Passé	78	1.334.550
Sapeaçu	40	292.770
Saubara	4	3.000
Varzedo	31	22.474
TOTAL	612	3.858.987

Fonte: IBGE – Censo Agropecuário, Resultados Preliminares (2017).

3.2 QUALIDADE DO LEITE *IN NATURA*

As características qualitativas do leite são aspectos importantes para garantir um alimento seguro e com qualidade nutricional para o consumidor (DIAS; ANTES, 2014). Do ponto de vista de controle de qualidade, o leite e os derivados lácteos estão entre os alimentos mais testados e avaliados, principalmente devido à importância que representam na alimentação humana e à sua natureza perecível (BRITO; BRITO, 2001).

A qualidade do leite é avaliada por parâmetros de composição química, características físico-químicas e por padrões higiênico-sanitários (BRITO; BRITO, 2001; REZER, 2010; DIAS; ANTES, 2014). Estes últimos refletem a saúde dos animais, com ênfase na mastite, ausência de resíduos químicos e as condições de obtenção e armazenamento do leite (DIAS; ANTES, 2014), constituindo-se no principal parâmetro utilizado para se verificar a qualidade desse produto, a partir da determinação do seu perfil microbiológico (NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009).

Da ordenha à entrada na plataforma de recepção, o leite passa por várias etapas antes de chegar à mesa do consumidor (MÖRSCHBÄCHER; REMPEL; MACIEL, 2017), devendo ser assegurada a qualidade do produto em todas essas etapas. A qualidade da matéria prima é um fator primordial para proporcionar a transformação de seus derivados, por isso a legislação exige limites da contaminação inicial do leite, onde este é influenciado diretamente pelo processo de obtenção na propriedade, condições de estocagem e transporte (GROSSO, 2013).

As exigências de qualidade e higiene para o leite cru e derivados lácteos visam evitar riscos à saúde humana e preservar as propriedades nutritivas desses alimentos (BRITO; BRITO, 2001). Portanto, grande atenção aos aspectos de higiene é necessária em todos os processos passados pelo leite, para que não se torne suscetível à contaminação por microrganismos que comprometam a qualidade do produto (MÖRSCHBÄCHER; REMPEL; MACIEL, 2017).

Conforme Brito e Brito (2001) a contaminação microbiana prejudica a qualidade do leite, interfere na industrialização, reduz o tempo de prateleira do leite fluido e derivados lácteos e pode colocar em risco a saúde do consumidor.

A produção de leite de alta qualidade está alicerçada na adoção de medidas, como o controle de mastite para reduzir a contaminação do leite na glândula mamária, higiene de equipamentos e manejo de ordenha para minimizar a contaminação de

origem ambiental e resfriamento imediato do leite após a ordenha para minimizar a multiplicação microbiana nesse período (SANTOS, 2013).

3.3 PRINCIPAIS CAUSAS DE CONTAMINAÇÃO DO LEITE

A contaminação bacteriana do leite cru pode ocorrer a partir do próprio animal, do homem e do ambiente (ARCURI et al., 2006). O leite in natura produzido por um animal sadio, geralmente contém a própria microbiota, em condição equilibrada. Entretanto, esse equilíbrio pode ser facilmente perdido através de contaminações provenientes do meio ambiente, do manuseio e utensílios empregados na ordenha, do ordenhador e durante o armazenamento do produto (ROCHA et al., 2015; ALMEIDA JUNIOR; OZELIN, 2017). Esta contaminação pode atingir números da ordem de milhões de bactérias por mL, podendo incluir tanto microrganismos patogênicos como deterioradores (BRITO; BRITO, 2001).

A disponibilidade de nutrientes no leite, sua alta atividade de água e seu pH próximo da neutralidade torna-o um meio extremamente favorável ao crescimento microbiano.(ARCURI et al., 2006). Além disso, o estado de saúde e higiene da vaca, o ambiente do estábulo e da sala de ordenha e os procedimentos usados para limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração e utensílios que entram em contato com o leite, são aspectos importantes a serem considerados com relação à contaminação microbiana do leite cru (BRITO; BRITO, 2001).

Na busca por um leite de melhor qualidade higiênico-sanitária, o setor lácteo implantou mudanças como a refrigeração do leite cru nas propriedades rurais (TEIXEIRA et al. 2018). A temperatura e o período de armazenamento do leite antes da pasteurização determinam, de maneira seletiva e pronunciada, a intensidade de desenvolvimento das diversas espécies microbianas contaminantes (ARCURI et al., 2006). Segundo Brito e Brito (2001), se o leite não for refrigerado (4°C) rapidamente após a ordenha, a população bacteriana poderá aumentar, atingindo números elevados que podem levar à deterioração.

No entanto, mesmo no leite resfriado, ocorre a multiplicação de microrganismos. A higienização dos tanques de refrigeração realizada inadequadamente pode ocasionar, dentre outros problemas sanitários, a formação de

películas, denominadas de biofilmes, as quais ficam aderidas na superfície interna do tanque (TEIXEIRA et al., 2018).

Estas películas guardam microrganismos que contaminam o leite, provocando elevação da contagem total de bactérias e produção de enzimas que agem sobre o leite causando alterações (TEIXEIRA et al., 2018).

Conforme Tronco (2010) os principais problemas de contaminação são em decorrência da deficiência na limpeza e sanitização dos equipamentos de ordenha, falta de higiene do ordenhador e resfriamento inadequado do leite, além da utilização de água de baixa qualidade e da alta ocorrência de vacas com mastite (SANTOS, 2013).

Conforme Brasil et al. (2012) a incidência de mastite no rebanho resulta no aumento da Contagem de Células Somáticas (CCS), que é um dos principais parâmetros utilizados para avaliação da qualidade do leite, pois está relacionada à diminuição das concentrações dos componentes do leite e alteração nas características sensoriais dos derivados lácteos.

3.4 PRINCIPAIS AGENTES INFECCIOSOS E IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA

Os microrganismos patogênicos, uma vez presentes no alimento, podem causar intoxicações e infecções alimentares. A contaminação microbiológica na indústria de alimentos representa um perigo para a saúde do consumidor, pois está associada a surtos de origem alimentar, além de ocasionar prejuízos econômicos (REZER, 2010).

O risco que um alimento, como o leite, contaminado com microrganismos patogênicos pode causar é grande, em se tratando de grupos populacionais vulneráveis como, pacientes imunossuprimidos, idosos, crianças e gestantes (PINHEIRO, 2015).

A presença de microrganismos patogênicos no leite cru é, portanto, uma preocupação de saúde pública, sendo um risco potencial para quem o consome diretamente ou na forma de seus derivados, e até para quem o manuseia. O leite cru contaminado pode ser, ainda, fonte de contaminação cruzada para os produtos lácteos processados, pela contaminação do ambiente na indústria (ARCURI et al., 2006).

Os principais grupos de microrganismos contaminantes do leite são os mesófilos, que se multiplicam rapidamente quando o leite não é armazenado sob refrigeração, os termodúricos que sobrevivem à pasteurização e os psicrotóxicos, que se multiplicam em temperaturas baixas (BRITO; BRITO, 2001). Do ponto de vista tecnológico, os microrganismos de maior importância são os que contaminam o leite durante e após a ordenha (MENEZES et al., 2014).

Os coliformes têm sido amplamente utilizados como referência da qualidade microbiológica, sendo a *Escherichia coli* o melhor indicador de origem fecal (ROCHA et al., 2015).

Os principais microrganismos causadores de mastite com capacidade de aumentar a contaminação do leite são os do gênero *Streptococcus* spp., principalmente as espécies *S. agalactiae* e *S. uberis* (SANTOS, 2013). Além dessas bactérias, a presença de *Staphylococcus aureus* no leite é indicativo de infecção da glândula mamária e indica deficiências no controle da mastite (ARCURI et al., 2006).

Conforme Coser, Lopes e Costa (2012) é importante ressaltar a importância da mastite, no que se refere à saúde pública, devido ao envolvimento de bactérias patogênicas que podem colocar em risco a saúde humana.

O leite cru, mantido sob temperaturas de refrigeração por muitos dias, pode apresentar bactérias dos seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Propionobacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, assim como alguns representantes do grupo dos coliformes (JAY, 2005).

3.5 ASPECTO ECONÔMICO E PREJUÍZOS CAUSADOS PELO LEITE CONTAMINADO

A contaminação microbiológica do leite, além de representar um sério perigo para a saúde do consumidor, acarreta grandes prejuízos econômicos (REZER, 2010).

A mastite representa um dos principais entraves para a bovinocultura leiteira, devido aos severos prejuízos econômicos que acarreta, pela redução na produção e na qualidade do leite, à elevação dos custos com mão-de-obra, medicamentos e serviços veterinários, além de descarte precoce de animais (COSER; LOPES; COSTA, 2012).

Conforme a Instrução Normativa nº 62 qualquer alteração no estado de saúde dos animais, capaz de modificar a qualidade sanitária do leite, constatada durante ou após a ordenha, deve implicar condenação imediata desse leite e do conjunto a ele misturado (BRASIL, 2011), representando, portanto, um prejuízo elevado ao produtor.

Além da contaminação com microrganismos, Santos (2015) enfatiza que o leite contaminado por resíduos de antibióticos e outros medicamentos veterinários, traz sérias implicações para todos os elos da cadeia produtiva do leite. A presença de resíduos de antibióticos em leite é indesejável por ocasionar uma série de problemas. Dentre eles, destacam-se os relacionados à perda de eficiência no processo de produção de derivados, como queijos e iogurtes, e aos riscos que oferece à saúde pública (MARTIN, 2011), além de penalidades no pagamento do produto, visto que os laticínios realizam, previamente, testes de triagem para a detecção de resíduos, descartando o produto quando detectada a presença desses resíduos (SANTOS, 2015).

Algumas indústrias leiteiras têm adotado o pagamento do leite baseando-se em critérios de qualidade da matéria-prima fornecida (ROCHA et al., 2015). Conforme Menezes et al. (2014), essa forma de pagamento representa uma medida de incentivo para estimular o produtor a adotar práticas em prol da melhoria da qualidade do leite produzido.

3.6 FORMAS DE TRANSMISSÃO DE AGENTES BACTERIANOS

Condições de higiene e conservação inadequadas podem criar um meio propício à intensa invasão e/ou proliferação de microrganismos que podem causar deterioração dos alimentos e trazer riscos à saúde do consumidor (ALMEIDA JUNIOR; OZELIN, 2017).

Os alimentos de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos microrganismos patogênicos, causadores de diversas doenças nas pessoas que os consomem (FIB, 2011). Essas enfermidades são denominadas de doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo esse termo aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, atribuída à ingestão de alimentos ou água contaminados (BRASIL, 2010).

Entre os alimentos mais frequentemente implicados nos surtos de DTA relatados, destacam-se o frango, a carne e produtos derivados, sobremesas, leite e produtos lácteos (OLIVEIRA et al., 2010). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2000 a 2015, 3,4% dos surtos de DTA estiveram relacionados ao leite e derivados (BRASIL, 2015).

Existe um grande número de agentes de doenças infecciosas que podem ser transmitidas ao homem pelo leite. Os patógenos mais importantes atualmente são *Salmonella* sp., *Escherichia coli* patogênica, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus* (BRITO et al., 2018).

A redução dos riscos associados às doenças veiculadas por alimentos no homem está ligada ao controle completo dos processos e procedimentos para a produção do alimento, desde a matéria- -prima até o produto acabado, na mesa do consumidor (COSER; LOPES; COSTA, 2012).

3.7 TÉCNICAS LABORATORIAIS PARA AVALIAÇÃO DO LEITE

3.7.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

As características culturais das bactérias podem ser observadas através dos meios de cultura, tanto os líquidos quanto os sólidos. Geralmente a temperatura de incubação utilizada para a maioria dos microrganismos gira em torno de 36 a 37 ° C (MARTINEZ E TADEI, 2005).

Os processos bioquímicos são caracterizados pelo fornecimento de diferentes tipos de açúcares, sendo que cada um deles atrairá a preferência de determinada espécie da bactéria. Entretanto, são desvantagens dessas análises: a precisão na leitura dos resultados e o tempo dispensado para sua realização (FERREIRA, 2010). Para a realização das provas bioquímicas é necessário utilizar meios de cultivo especiais contendo o substrato a ser analisado e fornecer ao microrganismo as condições nutritivas e ambientais necessárias ao seu desenvolvimento (CATTELAN, 1999).

O diagnóstico de bactérias pode ser realizado por diversas técnicas, sendo as principais: exame de esfregaços corados, características de culturas, testes

bioquímicos, fisiológicos e imunológicos e pela detecção realizada com métodos imunológicos e moleculares (MURRAY et al., 1999).

3.7.1.1 EXAME DE ESFREGAÇOS

As bactérias podem ser observadas por meio de microscópio por dois métodos, com e sem coloração. A observação de materiais frescos (suspensão de bactérias vivas) é realizada sem a coloração, sendo utilizada para visualização da mobilidade e morfologia de bactérias espiraladas. Já para a utilização de corantes, os microrganismos são mortos e posteriormente fixados e corados, com a finalidade de diferenciar células de afinidades distintas aos corantes e de morfologia variada (PELCZAR JR et al., 2004).

Os principais corantes utilizados para bactérias são os derivados de anilina (azul de metileno, fucsina, cristal, violeta, etc.) que são corantes básicos. A coloração de Gram é o método de coloração diferencial mais utilizado em exames diretos ao microscópio de amostras clínicas e de colônias bacterianas devido ao seu largo espectro de coloração (PEREIRA E PETRECHEN, 2011).

3.7.1.2 TÉCNICAS MOLECULARES

A identificação de bactérias ganhou uma nova conotação devido a descoberta da técnica da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (RODRÍGUEZ-DÍAZ et al., 2008). A partir desta evolução biotecnológica é possível investigar a diversidade microbiana, bem como determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas (GALDIANO JÚNIOR, 2009).

A técnica da PCR (Reação em Cadeia Polimerase) permite à amplificação in vitro, em questões de horas, de sequências específicas de DNA. É um método diagnóstico seguro e importante para a detecção da bactéria *Salmonella* sp., que se constitui o maior patógeno responsável pelo caos de infecção alimentar em humanos em todo o mundo (HUMPREY, 2000). Já a PCR em tempo real tem sido largamente para o diagnóstico da salmonelose e campilobacteriose em produtos e subprodutos de frangos (WOLFFS et al., 2007).

3.7.1.3 SOROAGLUTINAÇÃO RÁPIDA (SAR)

A soroaglutinação rápida é um teste de triagem utilizado no monitoramento de várias doenças, inclusive salmoneloses (PEREIRA et al., 2010). A prova de soroaglutinação rápida (SAR) é indicada para a detecção de anticorpos contra *Salmonella Pullorum* (SP) e *Salmonella Gallinarum* (SG) e algumas espécies de micoplasma, mas não detecta anticorpos contra as salmonelas paratífoides (PEREIRA E PETRECHEN, 2011).

3.8 MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO

Para que a qualidade do leite seja melhorada, é importante investir na conscientização e no treinamento de pessoal, visando melhoria da higiene de produção e adequada limpeza de utensílios e equipamentos (CITADIN et al., 2009). Por mais higiênica que seja a ordenha, é pouco provável termos um leite livre de microrganismos, entretanto, é possível controlar a multiplicação microbiana, já que esta prejudica a qualidade do leite, prejudica o processamento da matéria prima e reduz o tempo de prateleira do leite e seus derivados, além de colocar em risco a saúde do consumidor (MENEZES et al., 2014).

A oferta de leite de boa qualidade exige uma série de medidas de controle em todas as etapas da cadeia (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). A obtenção do leite deve ocorrer da maneira mais higiênica possível, pois se o mesmo chegar ao tanque de expansão com um alto número de bactérias, mesmo após a refrigeração, este número continuará elevado e a qualidade do produto será inferior (SCABIN; KOZUSNY-ANDREANI; FRIAS, 2012).

Alguns fatores afetam diretamente a qualidade microbiológica do leite cru, principalmente os aspectos relacionados à saúde da glândula mamária, a higiene de ordenha, o ambiente em que a vaca fica alojada, os procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha, a higiene do ordenhador e dos tanques de resfriamento (MENEZES et al., 2014). Segundo Scabin, Kozusny-Andreani e Frias (2012) programas eficientes de higiene de equipamentos devem ser implementados através

de correta limpeza e utilização de produtos adequados visando a eliminação dos biofilmes.

Segundo Brasil et al. (2012) o sistema de ordenha adotado na propriedade leiteira é também, de grande importância para a tomada de decisão para a melhoria da qualidade do leite, pois a ordenha é a última fase de uma sequência de eventos na produção de leite, que interfere de forma significativa na qualidade da matéria-prima destinada à fabricação dos derivados lácteos. Segundo informações relatadas por Citadin et al. (2009), as propriedades com maior produtividade e maior número de animais e que utilizavam ordenha mecânica, conferiu ao leite melhor qualidade, por reduzir o contato direto com o produto, o qual é canalizado para o tanque de refrigeração, onde é armazenado sob temperatura ideal até o momento da coleta, evitando, desta forma, a proliferação bacteriana.

Outro aspecto importante é o controle da temperatura de armazenamento. A IN 62 determina a obrigatoriedade do resfriamento do leite na unidade de produção e seu transporte a granel, a fim de conservar sua qualidade até a sua recepção em estabelecimentos com inspeção sanitária oficial. A temperatura ideal para a conservação do leite é 4 °C, desta forma recomenda-se que no período máximo de três horas após o término da ordenha, o leite sob refrigeração atinja esta temperatura (BRASIL, 2011). As temperaturas baixas inibem ou reduzem a multiplicação da maioria das bactérias e diminuem a atividade de enzimas degradativas (ARCURI et al., 2006).

A maioria dos produtores necessita, portanto, adotar medidas fundamentais e primárias para a melhoria das condições higiênicas durante a ordenha e o armazenamento do leite, e na sua refrigeração rápida, para reduzir os níveis de contaminação microbiana e atender ao padrão (ARCURI et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA JUNIOR, B. M. S; OZELIN, C. B. S. Fundamentos de controle de qualidade na produção, beneficiamento e industrialização do leite bovino. **Investigação**, v. 16, n. 8, p. 76-81, 2017.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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, DF, 30 dez. 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças transmitidas por alimentos**. 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/01/arquivo-1-dta.pdf>>. Acesso em: 18 Jul. 2018.
- _____. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 1. ed. Brasília: Editora MS, 2010. 158 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)
- BRASIL, R. B.; SILVA, M. A. P.; CARVALHO, T. S.; CABRAL, J. F.; NICOLAU, E. S.; NEVES, R. B. S. Avaliação da qualidade do leite cru em função do tipo de ordenha e das condições de transporte e armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 34-42, 2012.
- BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. **Tipos de microrganismos**. Agência de Informação Embrapa, Agronegócio do Leite. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_182_21720039246.html>. Acesso em: 20 Jul. 2018.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite. In: MADALENA, F. E.; MATOS, L. L.; HOLANDA JUNIOR, E. V. **Produção de leite e sociedade: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil**. Belo Horizonte: FEPMVZ – Editora, 2001. Cap. 3, p. 61-74
- CITADIN, A. S.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2009.
- CORTINHAS, C. S. **Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras**. 125f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, 2013.
- COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. **Mastite bovina: controle e prevenção**. Lavras-MG: Editora UFLA, 2012. p. 1-30 (Boletim Técnico, n. 93).

DIAS, J. A.; ANTES, F. G. **Qualidade físico-química, higiênico-sanitária e composicional do leite cru**: Indicadores e aplicações práticas da Instrução Normativa 62. 1. ed. Porto Velho-RO: EMBRAPA Rondônia, 2014. 19 p. (Documentos, 158).

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FERREIRA, P. Método permite identificação mais rápida de bactéria. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/m%C3%A9todo-permite-identifica%C3%A7%C3%A3o-mais-r%C3%A1pida-de-bact%C3%A9ria>>. Acesso em 12 de agosto de 2018.

FOOD INGREDIENTS BRASIL – FIB. Micro-organismos causadores de doenças de origem alimentar. **Revista FiB**, n. 19, 2011. Disponível em: <http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060468316001467201839.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2018.

GALDIANO JÚNIOR, R. F. Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas. **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP**, 2009.

GROSSO, F. S. **Diagnóstico das propriedades e qualidade do leite produzido por agricultores familiares**. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso superior de Tecnologia em Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina-PR, 2013.

HUMPREY, T. Public-healthy aspects of Salmonella infection. In: Way, C., Way, A. Salmonella in domestic animals. **CABI Publishing**, Oxon, UK, pp 245-263, 2000

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Censo Agropecuário – Resultados Preliminares**, 2017. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/>. Acesso em: 02 ago. 2018.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite – Uma Revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MARTINEZ, M. B.; TADEI, C. R. **Microbiologia**, TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F. 4ª Ed, São Paulo: Atheneu, 2005, 718 p.

MENEZES, M. F. C.; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. Microbiota e conservação do leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, Ed. Especial, p. 76-89, 2014.

MÖRSCHBÄCHER, V.; REMPEL, C.; MACIEL, M. Microbiological quality of refrigerated raw milk in the dairy farm and after transport to the processing dairy plant. **Arq. Inst. Biol.**, v.84, P. 1-5, 2017.

MURRAY, P.R, BARON, E.J, PFALIER, M.A, YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7° ed. ASM. Washington DC, 1999.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 29, n. 2, p. 386-390, 2009.

OLIVEIRA, A. B. A.; PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R; CARDOSO, M. R. I.; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: Uma revisão. **Revista HCPA**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

PELCZAR JR, M.J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2ª Ed, v. 1, São Paulo: Pearson, 2005. 524p.

PEREIRA, R.; MACAGNAN, M.; SCHWARZ, P.; CANAL, C.; & SCHMIDT, V. Estabelecimento de um protocolo de soroprecipitação rápida (SAR) para detecção de anticorpos para *Salmonella typhimurium* em suínos. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.3, p.677 – 682, 2010.

PEREIRA, R. E. P.; PETRECHEN, G. G. Principais métodos diagnósticos bacterianos – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano IX, N. 16, 2011.

PINHEIRO, L. A. F. **Detecção de fraude no leite com água pela capacidade térmica volumétrica**. 57f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG, 2015.

REZER, A. P. S. **Avaliação da Qualidade Microbiológica e Físico-Química do leite UHT integral comercializado no Rio Grande do Sul**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2010.

ROCHA, P. C. A.; CUNHA, L. M. M.; MACHADO, A. V.; COSTA, R. O. Análises microbiológicas do leite e tipos de adulterações. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, n. 1, p. 01-06, 2015.

RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; RODELAS-GONZALÉS, B.; POZO-CLEMENTE, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. A Review on the Taxonomy and Possible Screening Traits of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions - strategies and techniques to promote plant growth**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2008, p.55-80.

SANTOS, M. L. **Prevalência de patógenos e de microrganismos indicadores em leite informal e processado comercializados no Recôncavo da Bahia**. 63f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, 2016.

SANTOS, M. V. Controle e prevenção de resíduos no leite. **Inforleite**, 2015. Disponível em: <<http://qualileite.org/pdf/Artigos-tecnicos-publicados-em-revista-de>

divulgacao/Inforleite/2015/1-2015-Inforleite-Controle-de-residuos-de-antibioticos.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2018.

_____. Presença de mastite pode aumentar a contaminação do leite.

Mundo do Leite, 2013. Disponível em: <<http://qualileite.org/pdf/Artigos-tecnicos-publicados-em-revista-de-divulgacao/Mundo-do-leite/2013/4.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

SCABIN, K. E. M.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; FRIAS, D. F. R. Microbiological quality of milk in nature during the process of obtaining and after cooling. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 7, n.1, p. 11-21, 2012.

SOUZA, R. P. **As transformações na cadeia produtiva do leite e a viabilidade da agricultura familiar: o caso do sistema Coorlac (RS)**. 136f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

TEIXEIRA, S. R. MENDONÇA, L. C.; DUTRA, A. S.; MONTEIRO, R. P. **Manual de Manutenção da Qualidade do Leite Cru Refrigerado Armazenado em Tanques Coletivos para Produtores, Técnicos, Transportadores e Coletadores de Amostras de Leite**. 1. ed. Juiz de Fora-MG: EMBRAPA Gado de Leite, 2018. 25 p. (Documentos, 213)

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção de Qualidade do Leite**. Santa Maria: Editora UFSM, 2010. 203 p.

WERNCKE, D.; GABBI, A. M.; ABREU, A. S.; FELIPUS, N. C.; MACHADO, N. L.; CARDOSO, L. L.; SCHMID, F. A.; ALESSIO, D. R. M.; FISCHER, V.; THALER NETO, A. Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul de Santa Catarina: abordagem multivariada. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68, n. 2, p.506-516, 2016.

WOLFFS, P. F. G.; GLENCROSS, K.; GRIFFITHS, M. W. Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rise fluid by a flotation and realtime PCR procedure. **Journal of Food Protection**, v.117, p.50–54, 2007.

YUEN, S. K.; YEE, C. F.; YIN, F. H. Microbiological Quality and the impact of hygienic practices on the raw milk obtained from the small-scale dairy farmers in Sabah, Malaysia. **Int. J. Agr. Food Sci.**, v.2, p.55-59, 2012.

ARTIGO 1

A SER SUBMETIDO À REVISTA ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLÓGICO

DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE LEITE CRU DESTINADO A UM LATICÍNIO DO RECÔNCAVO DA BAHIA

Diagnosis of the hygienic-sanitary quality of raw milk intended for a dairy of the Recharge of Bahia

Lourival Souza Silva Junior^{1*} Bianca Pimentel Silva¹ Vinicius Pereira Vieira¹ Luana de Santana Correia¹ Kayck Amaral Barreto¹ Fabiana Lana de Araújo¹ Robson Bahia Cerqueira¹

¹Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas; Universidade Federal do Recôncavo da Bahia UFRB) – Cruz das Almas-BA, Brasil

^{1*}Autor correspondente: LJUNIOR.MEDVET@GMAIL.COM

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo realizar diagnóstico da qualidade higiênico-sanitária de leite cru resfriado ou não, destinado a um laticínio para fabricação de derivados do leite. As amostras foram obtidas através da coleta de leite de todas as propriedades fornecedoras de um laticínio no Recôncavo da Bahia, utilizando frascos com rosca, esterilizados. Para cada propriedade foram feitas três repetições, com intervalo de quatro dias entre elas. As amostras foram mantidas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, e encaminhadas para o LIAA do CCAAB da UFRB. Para realização das análises microbiológicas, foram utilizados os meios de cultura: ágar de Levine (EMB), ágar Bile-Esculina e ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo. Todas as propriedades analisadas apresentaram contagem de SCN, com contagem média máxima de 5,173 log UFC/ml. As amostras de leite colhidas nas propriedades apresentaram contagens de SCP inferiores aos estabelecidos pela IN51 (7 log UFC/ml). O presente estudo demonstrou que mais da metade das propriedades analisadas (55,55%) apresentaram amostras de leite contaminadas por *E. coli*, com contagem média máxima 5,751 log UFC/ml. Para a bactéria do gênero *Enterococcus spp.*, houve crescimento desses microrganismos em 88,88% das amostras analisadas. Foi observado que apesar de ter encontrado a presença de bactérias patogênicas nas amostra analisadas, o leite estava próprio para a produção de derivados, pois a contagem bacteriana estava dentro dos padrões estabelecidos pela legislação em vigor. Faz-se importante a revisão dos padrões de aceitação destes microrganismos, visando evitar surtos de toxinfecção em pessoas que venham a consumir leite e derivados.

PALAVRAS-CHAVE: análise microbiológica; boas práticas; lácteos.

DIAGNOSIS OF THE HYGIENIC-SANITARY QUALITY OF RAW MILK INTENDED FOR A DAIRY OF THE RECHARGE OF BAHIA

ABSTRACT

The objective of this study was to carry out a diagnosis of the hygienic-sanitary quality of raw milk, cooled or not, destined to a dairy for the manufacture of dairy products. The samples were obtained through the collection of milk from all the properties that supply a dairy in the Recôncavo of Bahia, using sterilized screw jars. For each property, three replications were done, with a four-day interval between them. The samples were kept in an isothermal box containing recyclable ice, and sent to the LIAA of the CCAAB of UFRB. In order to perform the microbiological analysis, culture media were used: Levine agar (EMB), Bile-Esculin agar and Baird-Parker agar enriched with egg yolk. All analyzed properties presented SCN count, with a mean maximum count of 5,173 log CFU / ml. The milk samples collected at the farms presented SCP counts lower than those established by IN51 (7 log CFU / ml). The present study showed that more than half of the analyzed properties (55.55%) had samples of milk contaminated by *E. coli*, with a maximum mean count of 5,751 log CFU / ml. For bacteria of the genus *Enterococcus spp.*, There were growth of these microorganisms in 88.88% of the samples analyzed. It was observed that in spite of having found the presence of pathogenic bacteria in the sample analyzed, the milk was suitable for the production of derivatives, since the bacterial count was within the standards established by the legislation in force. It is important to review the acceptance patterns of these microorganisms, in order to avoid outbreaks of toxoinfection in people who will consume milk and derivatives.

KEYWORDS: microbiological analyzes, good practices, dairy.

INTRODUÇÃO

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2011).

O leite possui uma composição química importante em termos nutricionais, sendo amplamente consumido em todo o mundo (MENEZES et al., 2014). A presença e os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade da composição, que, por sua vez, é influenciada pela alimentação, manejo, genética e raça do animal (BRITO; BRITO, 2001). Devido a sua riqueza em nutrientes, o leite é um substrato ideal para a proliferação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, os quais representam um risco à saúde da população, principalmente quando este alimento é ingerido sem tratamento térmico, ou quando o tratamento é ineficiente (SANTOS, 2016).

A pecuária leiteira é uma atividade de suma importância para o Brasil (WERNCKE et al., 2016). Entretanto, o leite produzido no país geralmente contém altas contagens de microrganismos, o que indica falhas na higiene da produção (MÖRSCHBÄCHER; REMPEL; MACIEL, 2017).

Para melhorar a qualidade do leite e derivados produzidos no Brasil, foi implantada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a Instrução Normativa nº 62, a qual estabelece as condições em que deve ser obtido o leite cru refrigerado, conservados, coletados e transportados, a fim de preservar sua qualidade desde a ordenha até a sua entrada na fábrica de laticínios sob inspeção sanitária oficial (MÖRSCHBÄCHER; REMPEL; MACIEL, 2017).

A maioria dos pequenos produtores ainda realiza práticas de higiene de ordenha e de gestão agrícolas ineficazes, resultando em leite de baixa qualidade, com grandes perdas econômicas para a indústria (YUEN et al., 2012). Contudo, as transformações na cadeia

produtiva do leite têm elevado a pressão para a especialização dos produtores de leite (SOUZA, 2007).

A produção de matérias primas de alta qualidade é um dos principais desafios para o aumento da competitividade do sistema agroindustrial do leite. Dentro deste contexto, a qualidade do leite cru é um dos principais pré-requisito para otimizar o processamento, rendimento e aceitabilidade dos derivados lácteos (CORTINHAS, 2013). A indústria se preocupa cada vez mais com a qualidade do leite, por questões de produtividade industrial e cumprimento da IN 62. Nesse sentido, cresce a valorização do leite que atenda às exigências de qualidade pelos laticínios que podem, inclusive, pagar um preço diferenciado por ele (TEIXEIRA et al., 2018).

Quando o leite é utilizado com finalidades comerciais e alimentícias, é de fundamental importância a aplicação de medidas de controle de qualidade, que visam evitar riscos à saúde do consumidor, e também dos animais produtores (ALMEIDA JUNIOR; OZELIN, 2017).

Quando o leite sai do úbere de um animal sadio, é relativamente livre de microrganismos. Porém, é inevitável a contaminação oriunda de diversas fontes (ROCHA et al., 2015). Os microrganismos contaminam o leite geralmente por falta de cuidados com a limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha e do sistema de refrigeração, por falta de higiene pessoal do ordenhador, falta de higiene com os tetos, pela água contaminada e também pela presença de mastite nas vacas (TEIXEIRA et al., 2018). Além disso, deve-se considerar que podem ocorrer contaminações adicionais e crescimento microbiano durante o transporte e estocagem na indústria (CITADIN et al., 2009).

A exigência cada vez maior de alimentos de qualidade por parte dos agentes comerciais internacionais exige do país um rigoroso controle do leite e derivados produzidos (MARTIN, 2011). Dessa forma, é importante que a microbiota do leite seja conhecida e controlada, uma vez que diversos microrganismos patogênicos aos seres humanos podem ser veiculados por

produtos lácteos de baixa qualidade. Logo, os métodos de conservação são fundamentais reduzir a carga microbiana, proporcionando melhor qualidade nutricional ao produto, maior vida de prateleira e maior segurança alimentar aos consumidores (MENEZES et al., 2014). Assim, objetivou-se realizar o diagnóstico da qualidade higiênico-sanitária de leite cru resfriado ou não, destinado a um laticínio no recôncavo da Bahia para fabricação de derivados do leite.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram obtidas através da coleta de leite de todas as propriedades fornecedoras de um laticínio no Recôncavo da Bahia, um total de nove propriedades. Para obtenção das amostras utilizou-se frascos com rosca, previamente esterilizado em autoclave a 120 °C por 30 minutos. Para cada propriedade foram feitas três repetições, com intervalo de quatro dias entre elas. As coletas foram realizadas acompanhando o recebimento do leite no próprio laticínio, no qual os produtores fornecem o leite.

Após realização das coletas, as amostras foram mantidas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, e encaminhadas para o Laboratório de Investigação Analítica de Alimentos e de Água do Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Para realização das análises microbiológicas, foram utilizados os seguintes meios de cultura: ágar de Levine (EMB), ágar Bile-Esculina e ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo, acrescido de telúrito de potássio.

Das amostras, foram colhidas de forma asséptica 25 ml de leite, que foram transferidas para um erlenmeyer com 225 mL de solução salina peptonada 0,1% estéril, obtendo assim uma diluição inicial da amostra em 10^{-1} . A partir da primeira diluição, foram preparadas as diluições

de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Posteriormente as quatro diluições foram utilizadas nas análises microbiológicas.

Para análise da bactéria *Escherichia coli* foram pipetadas, em placas de petri esterilizadas contendo o meio de cultura ágar Eosina Azul de Metileo (E.M.B), alíquotas de 100 μ L das diluições de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , espalhando por todo o meio de cultura com auxílio da alça de Drigalsk, em duplicata para cada diluição. Nas análises das bactérias *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. foram utilizadas, respectivamente, Placas de Petri esterilizadas contendo o meio de cultura ágar de Bile-Esculina e ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo, nas quais foram inoculadas 100 μ l das diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , espalhando por todo o meio de cultura com auxílio da alça de Drigalsk, fazendo placas em duplicata para cada diluição. Todas as amostras foram incubadas em estufa BOD a 35-37 °C por 48 horas, em seguida foi feita a contagem de colônias típicas para cada gênero.

Para confirmação de *Escherichia coli* foram utilizadas a prova bioquímica do Vermelho de Metila (VM), do Indol, de Voges Proskauer (VP), do Citrato e do TSI. Para *Enterococcus* spp. foi utilizada a prova de Tolerância a Telurito 0,04%, do Manitol e da Motilidade. Para confirmação de *Staphylococcus* spp. utilizou-se as provas da Gelatinase e a prova da Coagulase para distinguir coagulase positiva e negativa. As análises microbiológicas e as provas bioquímicas foram realizadas como descrito por Oliveira (2012).

As colônias de *Staphylococcus* spp. foram repicadas em Caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração) e incubadas a 35-37 °C por 24 horas, para realização da prova da coagulase.

Para análise estatística foi empregado o Sistema de Análise Estatística – SAS, utilizando o método de análise descritiva dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médio de contagem padrão em placas de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* do leite colhido das diferentes propriedades nas três repetições, estão demonstrados no tabela 01.

Tabela 1 Valores médios da contagem padrão em placas dos microrganismos *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*, em Log Unidade Formadora de Colônia/ml.

PROPRIEDADE	SCN	SCP	ETR	EC
A	5,173	3,233	4,471	0,000
B	4,235	4,619	0,000	2,274
C	4,032	2,771	1,434	0,000
D	4,975	0,000	3,840	0,000
E	3,500	1,054	4,782	3,870
F	4,162	2,665	4,819	5,751
G	5,147	1,497	4,538	1,740
H	4,475	1,510	5,629	0,000
I	4,549	0,000	4,593	4,527

SCN: *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, SCP: *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, ETR: *Enterococcus* spp. e EC: *Escherichia coli*.

Todas as propriedades analisadas neste experimento, apresentaram contagem de SCN, com contagem média máxima de 5,173 log UFC/ml (Tabela 1). Resultado parecido com o do presente estudo foi encontrado por Lamaita et al. (2005) que analisaram a contagem de *Staphylococcus* sp. em amostras de leite cru resfriado, e obtiveram crescimento desse microrganismo em 100% das amostras, com valor médio de 5,60 log UFC/ml. Os autores justificam esse número elevado na contagem da bactéria devido a grande diversificação de sistema de produção e sistema de manejo adotado pelos produtores, o que implicará em maior ou menor contaminação do leite por esse microrganismo, carreados através da mastite ou contaminação dos manipuladores assintomáticos. Stamford et al. (2006) encontraram SCN em 29% das amostras analisadas, demonstrando resultados diferentes dos que foram encontrados no presente estudo. Segundo Santos et al. (2009), SCN é a bactéria mais isolada de amostra de

lite de vacas em lactação e, principalmente, de novilhas. Bautista et al. (1988) afirmam que apesar de apenas altas contagens de SCP ser considerado como risco para presença de enterotoxinas em alimentos, SCN tem sido apontado potencialmente enterotoxigênicos. Essas bactérias tem sido consideradas de extrema importância na cadeia produtiva do leite, devido a sua capacidade de causar infecções persistente da glândula mamária, levando ao aumento na CCS (GILLESPIE et al., 2009), produção de enterotoxinas (DE FREITAS GUIMARÃES et al., 2013), e conseqüentemente, diminuição na produção de leiteira (TAPONEN et al., 2007; SILANIKOVE et al. 2014).

As amostras de leite colhidas nas propriedades apresentaram contagens de SCP inferiores aos estabelecidos pela IN51 (7 log UFC/ml). Resultados semelhantes foram encontrados por Maciel e colaboradores (2008) que analisaram a qualidade microbiológica do leite comercializados em Itapetinga-BA, na qual verificaram contagem igual e inferior ao limite estabelecido, e Leite et al. (2002) que analisaram a qualidade do leite comercializado em Salvador-BA, onde não foi encontrado em nenhuma das amostras. Diferente dos resultados encontrado no presente estudo, Santana et al. (2006) que analisaram amostras isoladas de leite cru resfriado, encontraram SCP em 100% das amostras analisadas, sendo que em 18,8% delas a contagem desse microrganismo foi superior a 6 log UFC/ml. Tebaldi et al. (2008) avaliando leite cru proveniente de tanques de resfriamento por expansão comunitários, encontrou valores acima do limite estabelecido pela legislação vigente e, segundo os autores, apesar de serem adotados procedimentos de higiene por muitos produtores visando a obtenção de leite com baixa contaminação fecal, ter encontrado grande concentração de SCP no estudo, pode demonstrar que há problemas de sanidade nos rebanhos como, principalmente, presença de mastite subclínica, no qual os procedimentos de higiene empregados não estão sendo suficientes para eliminação desse microrganismo.

Além de ser um problema de sanidade para os rebanhos, a presença de SCP acima de 6 log UFC/ml (número abaixo do estabelecido pela IN 51), aumenta o risco de produção de toxinas estafilocócicas, as quais são resistentes ao processo de pasteurização. Um fator que predispõe a ocorrência de produção dessas toxinas, é o tempo de permanência do leite nos tanques de resfriamento (24 horas) em temperaturas superiores a 4 °C (TEBALDI et al., 2008). A temperatura ideal para produção dessas toxinas é de 40-45 °C, porém há relatos da produção dessas enterotoxinas entre 10 e 45 °C (TATINI, 1973).

A legislação não estabelece limite máximo para a presença de *E. coli* em leite cru. A presença de *E. coli* no alimento indica a presença de contaminação de origem fecal, demonstrando que esse alimento não foi obtido de forma higiênica satisfatória. Além disso, várias linhagens dessa bactéria são patogênicas para os seres humanos (FRANCO & LANDGRAF, 1996). O presente estudo demonstrou que mais da metade das propriedades analisadas (55,55%) apresentaram amostras de leite contaminadas por *E. coli*, com contagem média máxima de 5,751 log UFC/ml (Tabela 1), demonstrando que houve falha no processo de higiene e conseqüentemente, contaminação do leite durante o processo de ordenha ou de resfriamento. Essa bactéria pode chegar ao tanque de resfriamento através de secreção intramamária, como pela contaminação do úbere e equipamentos de ordenha com fezes (TEBALDI et al., 2008). Okura & Ávila avaliaram amostras de leite cru de algumas microrregiões do Triângulo Mineiro, e encontraram uma taxa de 21,40% das amostras com a presença desse microrganismo. Scabin et al. (2012) encontraram esse microrganismo nas duas primeiras repetições, com média de contagem de 1,423 log UFC/ml.

Os bovinos produtores de leite e carne, é considerado um hospedeiro da cepa patogênica de *E. coli* (O157 H:7) (HEUVELINK et al., 1998). Com isso, leite e carne são os alimentos que mais causam surtos por causa desse patógeno, causando uma grande preocupação a indústrias leiteiras, pelo fato de poder transmitir essa bactéria para os humanos através do leite e de seus

subprodutos (VASAVADA, 1988). Por causa das características patogênicas da *E. coli* O157 H:7, Tutenel et al. (2002) afirmaram que é importante que a prevalência seja o mais baixa possível, podendo alcançar esse objetivo com o uso de medidas higiênicas durante o processo de obtenção do leite cru (ordenha), além de realizar pasteurização de forma correta e evitar contaminação do leite depois do processo (HEUVELINK et al., 1998).

Foi observada presença de bactérias do gênero *Enterococcus spp.* em amostras de 88,88% das propriedades (Tab. 1), evidenciando risco para saúde do consumidor, devido a presença deste microrganismo estar relacionada a presença de patógenos (Evangalista-Barreto et al. 2017), principalmente *Enterococcus faecalis* (YANG et al. 2015), sendo considerados como microrganismos que indicam condições de higiene durante o processo de obtenção do alimento (FRANCO et al., 2008). Dentre os gêneros classificados como termodúricos psicotróficos correlacionados ao leite pasteurizado encontra-se o *Enterococcus spp.* (HANSSAN et al., 2009; RANIERE et al., 2009; NOMBERG et al., 2010). Silva et al (2007) afirmam que *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* podem apresentar em sua forma vegetativa resistência a pasteurização. Holm et al (2004) relatam ter encontrado *Enterococcus spp.* em amostras de leite cru resfriado oriundos de resfriadores, na ordem de 4,699 log UFC/ml. Utilizando técnicas moleculares, Lafarge et al (2004) descreveram ter encontrado *Enterococcus spp.* em leite cru antes de ser resfriado e 48 horas após a refrigeração a 4,4 °C.

CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados alcançados neste estudo, foi observado que apesar de ter encontrado a presença de bactérias patogênicas nas amostra analisadas, o leite estava próprio para a produção de derivados, pois a contagem bacteriana estava dentro dos padrões estabelecidos pela legislação em vigor.

A presença desses microrganismos indicam falhas no manejo sanitário das propriedades e no processo de obtenção do leite. Logo, faz-se importante a revisão dos padrões de aceitação destes microrganismos, visando evitar surtos de toxinfecção em pessoas que venham a consumir leite e derivados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA JUNIOR, B. M. S; OZELIN, C. B. S. Fundamentos de controle de qualidade na produção, beneficiamento e industrialização do leite bovino. **Investigação**, v. 16, n. 8, p. 76-81, 2017.

BAUTISTA, L. et al. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk *Staphylococci*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.54, p.566-569, 1988.

BRASIL. Instrução Normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B e Tipo C e Cru Refrigerado. Diário oficial da União, Brasília, DF, 20 set. 2002, Seção 1, p. 13-22.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 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, DF, 30 dez. 2011.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite. In: MADALENA, F. E.; MATOS, L. L.; HOLANDA JUNIOR, E. V. **Produção de leite e sociedade**: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil. Belo Horizonte: FEPMVZ – Editora, 2001. Cap. 3, p. 61-74.

CORTINHAS, C. S. **Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras**. 125f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, 2013.

CITADIN, A. S.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2009.

DE FREITAS GUIMARÃES F., NÓBREGA D.B., RICHINI-PEREIRA V.B., MARSON P.M., DE FIGUEIREDO PANTOJA J.C. & LANGONI H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **J. Dairy Sci.** 96(5):2866-2872, 2013.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; DAMACENA, S. S.; CARDOSO, L. G.; MARQUES, V. F.; SILVA, I. P. Hygienic-sanitary conditions and degree of freshness of fish products sold in the fish market in Cachoeira, Bahia. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.11, n.1, p. 60-74, 2017.

FRANCO BDGM, LANDGRAF M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Ateneu; 2008.

GILLESPIE B.E., HEADRICK S.I., BOONYAYATRA S. & OLIVER S.P. Prevalence and persistence of coagulase-negative Staphylococcus species in three dairy research herds. **Vet. Microbiol.** 134(1):65-72, 2009.

HASSAN, N.B.A.; ABDALLA, M.O.M.; NOUR, A.A.A.M. Microbiological quality of heat-treated milk during storage. *Pak J Nutr* 2009;8(12):1845-8.

HOLM C, JEPSEN L, LARSEN M, JESPERSEN L. Predominant microflora of downgraded danish bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.1151-1157, 2004.

HEUVELINK, A.E. et al. Occurrence and Survival of Verocytotoxin-Producing Escherichia coli O157 in Raw Cow's Milk in the Netherlands. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 12, p. 1597-1601, 1998.

LAFARGE, V. et al. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. *Applied Environmental Microbiology*, v. 70, n. 9, p. 5644-5650, 2004.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de Staphylococcus sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite – Uma Revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MENEZES, M. F. C.; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. Microbiota e conservação do leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, Ed. Especial, p. 76-89, 2014.

MÖRSCHBÄCHER, V.; REMPEL, C.; MACIEL, M. Microbiological quality of refrigerated raw milk in the dairy farm and after transport to the processing dairy plant. **Arq. Inst. Biol.**, v.84, P. 1-5, 2017.

NORNBERG MFBL, FRIEDRICH RSC, WEISS RDN, TONDO EC, BRANDELLI A. Photolytic activity among psychrotropic bacterial isolated from refrigerated raw milk. *Int J Dairy Technol* 2010;63(1):41-6.

OKURA, M.H.; ÁVILA, F.A. Isolamento de enteropatógenos de leite cru produzido nas micro-regiões de Triângulo Mineiro, MG. FAZU em Revista, n.1, p.11-20, 2004.

RANIERI ML, HUCK JR, SONNEM M, BARBANO DM, BOOR KJ. High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci* 2009;92(10):4823-32.

ROCHA, P. C. A.; CUNHA, L. M. M.; MACHADO, A. V.; COSTA, R. O. Análises microbiológicas do leite e tipos de adulterações. *Revista Brasileira de Agrotecnologia*, v. 5, n. 1, p. 01-06, 2015.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; MORAES, L. B.; TAMANINI, R.; SILVA, W. P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina

a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 27, n. 4, p. 639-646, out./dez. 2006.

SANTOS, M. L. **Prevalência de patógenos e de microrganismos indicadores em leite informal e processado comercializados no Recôncavo da Bahia**. 63f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, 2016.

SANTOS, M. V.; REIS, C. B. M. Mastite por *Staphylococcus* coagulase negativa. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/colunas/marco-veiga-dos-santos/mastite-por-staphylococcus-coagulase-negativa-56691n.aspx>>. Acesso em 27 de Junho de 2018.

SCABIN, K. E. M.; ANDREANI, D. I. K.; FRIAS, D. F. R. Qualidade microbiológica do leite in natura durante o processo durante o processo de obtenção e após o resfriamento. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia** / Volumen 7 / Número 1 / Enero – Junio de 2012/ ISSN 1900-9607.

SILANIKOVE N., MERIN U., SHAPIRO F. & LEITNER G. Milk metabolites as indicators of mammary gland functions and milk quality. **J. Dairy Res.** 81:358-363, 2014.

SILVA NV, JUNQUEIRA VCA, SILVEIRA NFA, TANIWAKI MH, SANTOS RFS, GOMES RAR. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela; 2007.

SOUZA, R. P. **As transformações na cadeia produtiva do leite e a viabilidade da agricultura familiar: o caso do sistema Coorlac (RS)**. 136f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; NETO, A. C. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite in natura. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(1): 41-45, jan.-mar. 2006.

TAPONEN S., KOORT J., BJÖRKROTH J., SALONIEMI H. & PYÖRÄLÄ S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. **J. Dairy Sci.** 90(7): 3301-3307. 2007.

TATINI, S. R. Influence of food environments of growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. *Journal Milk Food Technology*, v. 36, n. 2, p. 474, 1973.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(3): 753-760, jul.-set. 2008.

TEIXEIRA, S. R. MENDONÇA, L. C.; DUTRA, A. S.; MONTEIRO, R. P. **Manual de Manutenção da Qualidade do Leite Cru Refrigerado Armazenado em Tanques Coletivos para Produtores, Técnicos, Transportadores e Coletadores de Amostras de Leite**. 1. ed. Juiz de Fora-MG: EMBRAPA Gado de Leite, 2018. 25 p. (Documentos, 213)

TUTENEL, A.V. et al. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, v. 2614, p. 1-7, 2002.

VASAVADA, P.C. Pathogenic bacteria in milk – A review. *Journal of Dairy Science*, v.71, p.2809-2816, 1988.

WERNCKE, D.; GABBI, A. M.; ABREU, A. S.; FELIPUS, N. C.; MACHADO, N. L.; CARDOSO, L. L.; SCHMID, F. A.; ALESSIO, D. R. M.; FISCHER, V.; THALER NETO, A. Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul de Santa Catarina: abordagem multivariada. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 68, n. 2, p.506-516, 2016.

YANG, J.-X.; LI, T.; NING, Y-Z.; SHAO, D-H.; LIU, J.; WANG, S-Q.; LIANG, G-W.; Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. *Infection, Genetics and Evolution*, v.33, p.253-260, 2015.

YUEN, S. K.; YEE, C. F.; YIN, F. H. Microbiological Quality and the impact of hygienic practices on the raw milk obtained from the small-scale dairy farmers in Sabah, Malaysia. *Int. J. Agr. Food Sci.*, v.2, p.55-59, 2012.

ANEXO

Forma e preparação de manuscritos

Para ser considerado para publicação, o trabalho deve ser um artigo científico ou comunicação científica, embora o Comitê Editorial também aceite artigos de revisão, a seu critério.

Artigo científico: consiste dos seguintes itens: título, nome (s) do (s) autor (es), endereço do autor correspondente e local de origem dos demais autores, resumo, palavras-chave, título traduzido, resumo traduzido, palavras-chave traduzidas, seguidas pela introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências.

Apresentação: os trabalhos devem ser apresentados em formato Microsoft WORD (.doc ou .docx), tamanho A4 de página, margens 2,5 cm, tamanho 12 fonte Times New Roman, espaço duplo, com numeração de página contínua usando a ferramenta Layout na Configuração da Página. ou item de menu Layout da página. O número máximo de páginas é 25 para artigos de revisão, 20 para artigos científicos e 10 para comunicações científicas, incluindo tabelas e figuras.

Idioma: o trabalho pode ser escrito em Português, Inglês ou Espanhol. Quando escrito em português, o título, resumo e palavras-chave traduzidos estarão em inglês. Quando escrito em inglês ou espanhol, o título, resumo e palavras-chave traduzidos serão em português.

Título: embora breve, o título deve dizer precisamente sobre o que é o artigo, enfocando seu objetivo principal.

Nome (s) e Endereço (s) do (s) autor (es): não devem ser incluídos no corpo do manuscrito, pois os **Arquivos Biológico** utilizam dupla revisão por pares. Esta informação deve ser inserida no campo específico do sistema de submissão online.

Resumo: deve concisamente apresentar o objetivo do trabalho, os materiais e métodos e conclusões, em um único parágrafo. O comprimento não deve exceder 250 palavras.

Palavras-chave: sob o resumo e separados por um espaço, forneça no máximo cinco palavras-chave separadas por vírgulas. Evite termos que aparecem no título.

Tradução de título, resumo e palavras-chave: trabalhos em português devem fornecer uma tradução do título, resumo e palavras-chave em inglês. Obras em inglês ou espanhol devem fornecer uma tradução do título, resumo e palavras-chave em português. O comprimento do resumo não deve exceder 250 palavras.

Introdução: descrever a natureza e a finalidade do trabalho, sua relação com outras pesquisas no contexto do conhecimento existente, juntamente com o motivo pelo qual o presente estudo foi realizado.

Material e métodos: apresentam uma descrição que é breve, mas suficiente para permitir a repetição do trabalho. Técnicas e processos previamente publicados, exceto quando modificados, devem ser meramente citados. Os nomes científicos das espécies e dos medicamentos devem ser citados de acordo com os padrões internacionais.

Resultados: acompanhados de tabelas e / ou figuras quando necessário. As tabelas e figuras devem ser inseridas após as referências.

Discussão: discutir os resultados obtidos, comparando-os com os de outros trabalhos publicados (resultados e discussão podem ser combinados em uma única seção).

Tabelas e figuras: inclua um título claro e conciso que permita que a tabela ou figura seja compreendida sem consultar o texto. As tabelas não devem conter linhas verticais. No texto, use a palavra abreviada (por exemplo: Fig. 3). As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e diagramas), de tamanho inferior a 500 Kb. Os valores originais ou de alta definição serão solicitados após a aprovação do submissão para publicação. Estes devem ser enviados em arquivos individuais e nomeados de acordo com o número da figura, por exemplo, Fig1.gif, Fig2.jpg.

Conclusões: apresentadas em sua ordem de importância. Eles podem ser dados em uma seção separada ou como parte da discussão.

Agradecimentos: podem se referir a pessoas e / ou instituições. No caso de agência de financiamento, o número do processo de financiamento deve ser incluído.

Referências e citações no texto: as citações no texto e as referências estão diretamente ligadas. Recomenda-se cerca de 25 referências a artigos e comunicações científicas. Todos os autores citados devem ser incluídos nas referências. A citação dos autores deve ser apresentada no formato do sobrenome do autor e no ano da publicação, e deve ser em maiúsculas, por exemplo: um autor Allan (1979) ou (Allan, 1979); dois autores - Lopes; Macedo (1982) ou (Lopes; Macedo, 1982); mais de dois autores - Besse et al. (1990) ou (Besse et al., 1990); coincidências de autores ou ano de publicação - (Curi, 1998a), (Curi, 1998b) ou (Curi, 1998a, 1998b). As referências devem ser formatadas de acordo com a NBR 6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e estar em ordem alfabética de primeiro autor, conforme os exemplos no seguinte link:

Os exemplos a seguir servirão como diretriz para a formatação e apresentação de referências:

a) Artigo de periódico ANDRÉA, MM; PETTINELLI JÚNIOR, A. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.67, n.2, p.223-228, 2000.

b) Artigo em periódico publicado na Internet FELÍCIO, JD; SANTOS, R. da S.; GONÇALES, E. Componentes químicos de *Vitis vinifera* (Vitaceae). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.68, n.1, p.47-50, 2001. Disponível em: <http://www.biologico.br/arquivos/v68_1/9>. Acesso em: 5 mar. 2002.

c) Dissertações e Teses PERES, TB *Efeito das aplicações de pesticidas na microbiologia do solo e na dissipação do 14C-Paration Metílico*. 2000. 75f. Dissertação, Mestrado em Ciências - Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2000. SIMONI, IC *Utilização de vários vetores para propagação do vírus da doença infecciosa da bursa*. 2001. 77f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular - Área de Microbiologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

d) Dissertação / Dissertação publicada na Internet BATISTA, AS *Saccharomices cerevisiae* em milho com o efeito e na redução de aflatoxicoses. 2001. 96p. Dissertação (Mestrado - Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>
Acesso em: 28 jun. 2005.

e) Livros inteiros, brochuras, etc. BECKMANN, N. (Ed.). *Espectroscopia de RMN em carbono-13 de sistemas biológicos*. San Diego: Academic Press, 1995. 334p.

f) Parte de um livro (capítulo, passagem, fragmento, etc.) Capítulo ou parte sem autoria específica - o autor da parte é o mesmo autor do trabalho global ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, JD Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular. Dentro: _____. *Biologia Molecular da Célula*. 3ª.ed. Nova Iorque: Garland Publications, 1994. 1294p. Rachar.19

Parte com autoria específica

BANIJAMALI, A. Função tireoidiana e drogas da tireóide. Em: FOYE, WO; LEMKE, TL; WILLIAMS, DA (Eds). *Princípios da química medicinal*. 4º Ed. Filadélfia: Lippincot Williams & Wilkins, 1995. cap.30, p.688-704.