



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente

LEONILDES DE JESUS AGUIAR VIEIRA

**PERFIL DO LEITE CRU DE PROPRIEDADES PRODUTORAS DO MUNICÍPIO DE
BACABAL/MA: análises microbiológicas, físico-químicas, resistência de bactérias
patogênicas a antimicrobianos e resíduos de antibióticos.**

São Luís /MA

2021

LEONILDES DE JESUS AGUIAR VIEIRA

**PERFIL DO LEITE CRU DE PROPRIEDADES PRODUTORAS DO MUNICÍPIO DE
BACABAL/MA: análises microbiológicas, físico-químicas, resistência bactérias
patogênicas a antimicrobianos e resíduos de antibióticos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
de Saúde e Ambiente da Universidade Federal do
Maranhão para obtenção do título de Mestre.

**Orientador(a): Profa. Dra. Adenilde Nascimento
Mouchrek**

São Luís /MA

2021

Vieira, Leonildes de Jesus Aguiar.

PERFIL DO LEITE CRU DE PROPRIEDADES PRODUTORAS DO MUNICÍPIO DE BACABAL/MA: análises microbiológicas, físico-químicas, resistência de bactérias patogênicas a antimicrobianos e resíduos de antibióticos / Leonildes de Jesus Aguiar Vieira. - 2021.

82 f.

Orientador(a): Adenilde Nascimento Mouchrek. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

1. Contaminação. 2. Leite cru. 3. Qualidade. 4. Resistência antimicrobiana. I. Nascimento Mouchrek, Adenilde. II. Título.

PERFIL DO LEITE CRU DE PROPRIEDADES PRODUTORAS DO MUNICÍPIO DE BACABAL/MA: análise microbiológica, físico-química, resistência de bactérias patogênicas a antimicrobianos e resíduos de antibióticos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Adenilde Nascimento Mouchrek (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^ª. Dr^ª. Josilene Lima Serra
Instituto Federal do Maranhão

Prof. Dr. Nestor Everton Mendes Filho
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho
Universidade Federal do Maranhão

DEDICATÓRIA

*Ao criador de tudo e de todos, Aquele que cuida
e nos ama incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelas maravilhas e conquistas que Ele me proporciona a cada dia.

Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado e me incentivarem a buscar o conhecimento e crescer através dele.

À minha orientadora pelo amor ao ensinar um pouco de seu rico conhecimento.

Ao IFMA campus Bacabal, em especial ao diretor geral Maron Gomes, a diretora de ensino Isa Prazeres e ao chefe de ensino Carlos Lira, gestores no período de realização desta pesquisa, pelo apoio e incentivo.

Ao motorista do campus Ronaldo Sousa que me acompanhou em todas as coletas

Aos meus amigos, aqui não citarei nomes pois são muitos, mas eles sabem o quanto sou grata pela força, ajuda, incentivo e compreensão.

*Abre as asas para voar,
Voa sem medo de sentir o vento te levar,
E a brisa leve, teu ser embriagar.
Voa longe, migra...
Não deixa o inverno te abater.
E quando retornar, verás:
Que lindo sol está a nascer!*

(a autora)

RESUMO

No Maranhão, há um expressivo aumento na produção de leite, com níveis de produtividade ainda longe do seu potencial produtivo. No município de Bacabal há uma expressiva quantidade de propriedades, mas poucos são os dados e estudos sobre o perfil de produção destas. Diante disso, este trabalho objetivou estudar o perfil do leite cru de propriedades produtoras no município de Bacabal/MA, utilizando como parâmetros as análises microbiológicas, físico-químicas, resistência de bactérias patogênicas a antimicrobianos e presença de resíduos de antibióticos. Foram analisadas 5 propriedades denominadas de F1, F2, F3, F4 e F5. As análises de qualidade físico-química foram acidez, densidade relativa, matéria gorda, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose e proteína. As análises microbiológicas realizadas foram a contagem do número mais provável de coliformes totais, coliformes termotolerantes e a contagem padrão em placa para *Staphylococcus coagulase positiva* e *coagulase negativa* e *Salmonella*, segundo metodologia descrita pela APHA (2017). O perfil de resistência e sensibilidade dos *Staphylococcus* seguiu o método difusão de discos. Os antimicrobianos utilizados foram: gentamicina (10µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), penicilina G (10µg), oxacilina (1µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg). Para medida dos halos de inibição utilizou-se uma régua milimetrada. As espécies foram classificadas de acordo com o tamanho halo em sensível (S), intermediário (I) e resistente (R). Detectou-se a presença de resíduo através do Kit Eclipse 50. Os resultados físico-químicos e microbiológicos apresentam-se nos padrões exigidos pela legislação vigente, com exceção de duas fazendas que apresentaram média de acidez acima dos exigidos pela IN 76: fazendas F4 (18,4°D) e F5 (20,3°D). Foram encontradas bactérias do grupo coliforme, *E. coli* (F3 e F4), *Enterobacter aerogenes* (F1) e *Klebsiella pneumoniae* (F1), *Staphylococcus* e ausência de *Salmonella*. As espécies de *Staphylococcus* isoladas foram majoritariamente *coagulase negativa*, sendo identificadas as seguintes espécies: *S. capitis*, *S. caseolyticus*, *S. cloosii*, *S. lentus*, *S. xylosus*. Detectou-se a presença de *S. aureus* somente na fazenda F5. A presença de resíduo foi observada em 80% das propriedades. Na avaliação da resistência, observou-se 100% de resistência das cepas para a ampicilina, penicilina e a oxacilina., em sequência, tem-se a cefalotina e a gentamicina, ambas com 50% e a eritromicina com 25%. Observou-se sensibilidade de 100% das cepas para cloranfenicol, 50% para a gentamicina e 40% para a eritromicina. Observou-se multirresistência nas espécies *S. aureus* e *S. xylosus*. Em geral, as fazendas estudadas apresentam um leite dentro dos padrões exigidos pela legislação, entretanto, as elevadas contagens de microrganismos, de presença de resíduos e de multirresistência configuram um perigo em potencial para a saúde pública devendo ser adotadas ações de conscientização e profilaxia para melhoria da qualidade do leite produzido no município de Bacabal/MA.

Palavras - chave: leite cru; qualidade; resistência antimicrobiana; contaminação

ABSTRACT

In Maranhão, there is a significant increase in milk production, with levels of productivity still far from its productive potential. In the municipality of Bacabal, there is a significant number of properties, but there are few data and studies on their production profile. Therefore, this study aimed to study the profile of raw milk from producing properties in the municipality of Bacabal / MA, using as parameters the microbiological, physical-chemical analyzes, resistance of pathogenic bacteria to antimicrobials and the presence of antibiotic residues. Five properties called F1, F2, F3, F4 and F5 were analyzed. The analyzes of physical-chemical quality were acidity, relative density, fat, total dry extract (TDE), defatted dry extract (DDE), lactose and protein. The microbiological analyzes performed were the count of the most likely number of total coliforms, thermotolerant coliforms and the standard plate count for positive coagulase and negative coagulase and Salmonella, according to the methodology described by APHA (2017). The resistance and sensitivity profile of Staphylococcus followed the disc diffusion method. The antimicrobials used were: gentamicin (10µg), ampicillin (10µg), cephalothin (30µg), penicillin G (10µg), oxacillin (1µg), chloramphenicol (30µg), erythromycin (15µg). To measure the inhibition halos, a millimeter ruler was used. The species were classified according to the halo size as sensitive (S), intermediate (I) and resistant (R). The presence of residue was detected using the Eclipse 50 Kit. The physical-chemical and microbiological results are in the standards required by current legislation, with the exception of two farms that had an average acidity above those required by IN 76: farms F4 (18.4 ° D) and F5 (20.3 ° D). Bacteria of the coliform group, *E. coli* (F3 and F4), *Enterobacter aerogenes* (F1) and *Klebsiella pneumoniae* (F1), *Staphylococcus* and absence of *Salmonella* were found. The isolated *Staphylococcus* species were mostly coagulase negative, with the following species being identified: *S. capitis*, *S. caseolyticus*, *S. cloosii*, *S. lentus*, *S. xylosum*. The presence of *S. aureus* was detected only on the F5 farm. The presence of residue was observed in 80% of the properties. In the resistance evaluation, 100% resistance of the strains was observed for ampicillin, penicillin and oxacillin. In sequence, there are cephalothin and gentamicin, both with 50% and erythromycin with 25%. Sensitivity of 100% of the strains to chloramphenicol, 50% to gentamicin and 40% to erythromycin was observed. Multidrug resistance was observed in the species *S. aureus* and *S. xylosum*. In general, the farms studied present a milk within the standards required by the legislation, however, the high counts of microorganisms, presence of residues and multidrug resistance constitute a potential danger to public health and awareness and prophylaxis actions should be adopted for improvement of the quality of the milk produced in the municipality of Bacabal / MA.

Keywords: raw milk; quality; antimicrobial resistance; contamination

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Localização da área de estudo.....	41
Figura 2	- Kit Eclipse 50 para detecção de resíduos de antibióticos e amostra de leite usadas no teste.....	45
Figura 3	- Representação de medição do halo de inibição com auxílio da régua milimetrada.....	46
Figura 4	- Resultado do Teste de detecção de resíduos de antibióticos do leite de propriedades do município de Bacabal/MA: amostras positivas (roxo) e negativa (amarelo).....	59
Figura 5	- Resultado da detecção de resíduos de antimicrobianos no leite cru acima do limite máximo de resíduos (LMR) em estabelecimentos sob Inspeção Federal realizado pelo MAPA entre 2015 e 2019.....	60
Figura 6	Porcentagem de resistência dos 7 antibióticos estudados frente as das cepas de SCN e S. aureus isolados do leite cru das propriedades do município de Bacabal/MA.....	63
Figura 7	- Halos de inibição para a Gentamicina apresentados pelas espécies de SCN e S. aureus isoladas do leite de propriedades do município de Bacabal/MA.....	65
Figura 8	- Porcentagem de resistência das cepas de SCN e S. aureus isolados do leite cru de propriedades do município de Bacabal/MA aos antimicrobianos estudados.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Características dos grupos de antimicrobianos.....	28
Tabela 2	-	Resultados das análises físico-químicas do leite cru das propriedades do município de Bacabal/MA.....	47
Tabela 3	-	Quantificação microbiológica das amostras de leite cru de fazendas produtoras no município de Bacabal/MA.....	52
Tabela 4	-	Espécies de SCN e <i>Staphylococcus aureus</i> identificadas no leite cru de fazendas de Bacabal/MA.....	55
Tabela 5	-	Resultado da avaliação da presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite bovino cru de propriedades do município de Bacabal/MA.....	58
Tabela 6	-	Valores de halos de inibição esperados para <i>Staphylococcus spp.</i>	61
Tabela 7	-	Classificação da resistência a 7 antibióticos das espécies de SCN e <i>S. aureus</i> isoladas do leite cru em propriedades de Bacabal/MA	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APHA	American Public Health Association
CIM	Concentração Inibitória Máxima
CSLI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DTA	Doença Transmitida Por Alimento
EMB	Eosina Azul de Metileno
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
ESD	Extrato Seco Desengordurado
EST	Extrato Seco Total
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMSF	Internacional Commission on Microbiological Specifications Foods
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IN	Instrução Normativa
IRMA	Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos
ISO	International Organization for Standardization
LRM	Limites Máximos de Resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mec-S	<i>Staphylococcus</i> metilicina-resisten
NMP	Número Mais Provável
PABA	Ácido Paraaminobenzóico
SCN	Staphylococcus Negative Coagulase
SCP	Staphylococcus positive Coagulase
SENAR/MA	Serviço Nacional de Aprendizagem Rural
TSA	Ágar Triptona de Soja

UFC Unidade Formadora de Colônia
UHT Ultra High Temperature

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Ambiente e produção de leite	17
2.2 Aspectos de qualidade do leite.....	19
2.3 <i>Staphylococcus spp</i>	23
2.4 Antimicrobianos	27
2.5 Resíduos de antibióticos no leite	31
2.7 Leite e saúde pública.....	36
3 OBJETIVOS	40
3.1 Geral	40
3.2 Específicos.....	40
4 METODOLOGIA	41
4.1 Caracterização da área de estudo	41
4.2 Coleta das amostras	42
4.3 Avaliação do perfil do leite cru em propriedades produtoras de leite no município de Bacabal/MA	42
4.4 Avaliação da resistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i> isolados do leite cru no município de Bacabal/MA.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Perfil das propriedades produtoras de leite cru no município de Bacabal/MA – Brasil	47
5.2 Qualidade físico-química.....	47
5.3 Qualidade microbiológica.....	51
5.4 Análise da presença de resíduo.....	58
5.5 Resistência antimicrobiana das cepas de <i>Staphylococcus</i> isoladas do leite de propriedades produtoras no município de Bacabal/Maranhão – Brasil.....	61
6 CONCLUSÃO	69
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
REFERENCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

O leite constitui o primeiro alimento dos filhotes de cada espécie de mamífero, sendo responsável pela manutenção e pelo desenvolvimento da vida e contribuindo para a perpetuação das espécies. O leite de vaca é considerado o mais completo alimento, possuindo elevado valor nutricional na alimentação humana, particularmente nos primeiros estágios de vida (CRUZ et al., 2016) por conter proteína, diversas vitaminas e minerais necessários para uma boa nutrição e por ser uma excelente fonte de cálcio (PICCOLO et al., 2014).

Por sua composição completa e balanceada, o leite pode abrigar praticamente todos os gêneros e espécies de microrganismos conhecidos. Cada gênero microbiano presente no leite, tem um comportamento metabólico que resulta em inúmeras alterações na composição do leite, cuja intensidade está diretamente relacionada à densidade da população microbiana presente (BELOTI, 2015). Bactérias, fungos, vírus e outros podem provocar significativas alterações no leite e mesmo sua contaminação (TRONCO, 2013), por isso, o leite deve ser obtido com a máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até ocasião do beneficiamento, visando garantir as características físicas, químicas e nutricionais.

A baixa qualidade do produto pode ser atribuída a deficiências no manejo, higiene de ordenha, sanidade da glândula mamária, manutenção e desinfecção inadequada dos equipamentos e refrigeração ineficiente ou até mesmo inexistente Fagan et al. (2005); Nero et al. (2005); Catão; Ceballos, (2001) e Santana et al. (2001) apud Matsubara et al. (2011). Assim, cuidados higiênicos para evitar a contaminação do leite devem ter início na ordenha e seguir até o seu beneficiamento, por meio das boas práticas de produção e fabricação.

As exigências de qualidade e higiene para o leite cru e derivados lácteos são definidas com base em postulados estabelecidos para a proteção da saúde humana e preservação das propriedades nutritivas desses alimentos (LINS NETO et al., 2016).

A qualidade do leite é definida por parâmetros de composição química, características físico-químicas e higiene. A presença e os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade da composição, esta, por sua vez, varia de acordo com fatores como herança genética, espécie, raça e indivíduo; **aspectos fisiológicos** como: gestação, a fase e o número de lactações e a idade do animal; **fatores ambientais**, como clima; e cuidados no manejo: alimentação, tipo de ordenha, cuidados de saúde do animal (ARAÚJO et al., 2015; LINS NETO et al., 2016).

O conhecimento das características físico-químicas do leite é essencial para a compreensão dos parâmetros de normalidade e provas de controle de qualidade que detectam

alterações e fraudes e avaliam se o leite pode ser considerado físico-quimicamente, normal e consumível, uma vez que as provas microbiológicas são demoradas, com prazos para resultados incompatíveis com a vida útil do leite (BELOTI, 2015).

No entanto, as provas microbiológicas devem ser encaradas como balizadores de longo prazo que permitem obter detalhes sobre os problemas higiênico-sanitários da produção porque envolvem a forma de produzir, procedimentos do proprietário, dos ordenadores e as condições técnico-estruturais da produção (BELOTI, 2015).

Ao discutirmos a importância da saúde do animal para a qualidade do leite, os cuidados com a sanidade da glândula mamária são extremamente importantes para a produção de um leite de qualidade. A presença de mastite, por exemplo, pode determinar a presença de bactérias patogênicas que causam danos nos tecidos da glândula que, por sua vez, levam à redução da produção do leite e a alterações da sua composição. Dentre os microrganismos patogênicos mais importantes decorrentes destas inflamações, estão os *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). Para reduzir ou eliminar estes microrganismos é comum a utilização de antibióticos indicados para infecções causadas por mastites (TRONCO, 2013; BELOTI, 2015).

A presença de microrganismos resistentes a antimicrobianos determina perdas econômicas relevantes devido aos gastos com medicações ineficazes e, ademais, causa grandes prejuízos à Saúde Pública. Essa situação pode ser considerada ainda mais preocupante quando se considera o tempo necessário para se desenvolver um novo antimicrobiano versus o desenvolvimento da resistência, que acontece de forma bem mais rápida (BOTELHO, 2017).

No caso do leite, pode ocorrer o acúmulo de resíduos de substâncias antimicrobianas que serão eliminados no período de carência da vaca, e que dependem principalmente da dose e da via de administração, sendo a intramamária a maior forma de exposição do leite a contaminação, no entanto outras vias também podem contaminá-lo (BELOTI, 2015).

Todas estas drogas são metabolizadas e excretadas, entretanto quando não obedecido o período de carência, seus resíduos podem chegar até o consumidor, provocando problemas para a saúde pública (BELOTI, 2015), cujos efeitos, podem ser de tóxicos, ao desenvolvimento de processos alérgicos, entre outros.

Vale destacar que a ocorrência de *Staphylococcus* enterotoxigênicos no leite, tanto coagulase positiva quanto negativa, em alimentos, representa um risco potencial para a saúde pública, uma vez que essas espécies, quando presentes, podem produzir uma ou mais enterotoxinas, que, depois de ingeridas, causam intoxicação alimentar aos consumidores (BORGES et al, 2008).

Diante do exposto, o estado do Maranhão, apesar do expressivo aumento da produção de leite, ainda apresenta níveis de produtividade animal muito aquém do seu potencial produtivo. Esses resultados refletem o baixo nível tecnológico predominante nas propriedades e a prevalência de sistemas de produção ineficientes (DANTAS et al., 2018).

Em relação ao município de Bacabal, os dados sobre a produção de leite são pouco descritos na literatura. Fato este que torna crucial descrever o perfil das propriedades produtoras de leite deste município a fim de gerar dados importantes para caracterizar a produção leiteira no estado. Uma vez que a qualidade do leite é um dos temas mais discutidos atualmente dentro do cenário nacional de produção leiteira. Este desde a obtenção até o consumo, fica exposto a uma série de influências de natureza físico-química e de grande número de contaminações microbiológicas (TRONCO, 2013).

Considerando a importância do leite bovino na alimentação humana, além dos riscos à saúde da população que a presença de microrganismos e resíduos de antimicrobianos representa, o objetivo deste trabalho foi estudar o perfil do leite cru de propriedades produtoras no município de Bacabal/MA, com foco nas análises microbiológicas, físico-químicas, resistência antimicrobiana de bactérias patogênicas isoladas do leite e presença de resíduos de antibióticos

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ambiente e produção de leite

O leite é composto por diferentes substâncias, como gordura, proteínas, lactose, sais minerais, vitaminas e água. Vários fatores podem alterar sua composição como; fatores genéticos (espécie, raça), fisiológicos (idade, período de lactação) e ambientais e de manejo (como clima, estação do ano, temperatura, chuvas, alimentação, quantidade e intervalo de ordenhas (KOBELITZ, 2014). Tais fatores agem de maneira direta sobre a síntese e secreção do leite, ou agindo sobre o componente já secretado, no interior da glândula.

Dentre os fatores mais importantes, destacamos o ambiente. De acordo com Feitosa e Trovão (2006) o ambiente é constituído por todos os elementos do espaço, seus atributos, suas relações e os fluxos que promovem sua configuração e sua dinâmica. Os elementos e os fluxos são de origem natural e humana, enquanto os atributos são as propriedades inerentes cada elemento. Dependendo da natureza, frequência e magnitude que os atributos manifestam, evidencia-se o domínio dos aspectos físicos ou humanos no sistema ambiental.

Considerando a produção de leite, o ambiente é capaz de alterar a sua composição. Isto decorre principalmente em situações de estresse ambiental, no qual o animal tem seu metabolismo e consumo de alimentos, disponibilidade e qualidade de forragens adulterados (CRUZ et al., 2016).

Dentro do estudo da qualidade do leite estas alterações ocorrem em decorrência do clima. Este é caracterizado por um conjunto de dados (temperatura, pressão, umidade) a respeito das condições atmosféricas de um determinado local, durante um período cronológico específico. O tipo de clima depende de uma série de fatores, como latitude, altitude, relevo e radiação solar, e até mesmo a presença do ser humano (CRUZ et al., 2005).

O Brasil, por apresentar a maior parte do seu território situada nas regiões tropicais, possui grande vulnerabilidade às mudanças climáticas, podendo afetar significativamente o agronegócio. A pecuária leiteira é um dos setores mais sensíveis às variações do clima, desempenhando grande importância no contexto. Por exemplo, o período de chuva não é o mesmo em todo país, no Sul e Sudeste costuma chover mais no verão, entre dezembro e março, no Nordeste do país chove mais no inverno (SILVA et al., 2010; BELOTI, 2015).

Neste aspecto, em altas temperaturas, ocorre diminuição do consumo de forragens, levando a diminuição da relação acetato/propionato do rúmen. Esta relação está diretamente ligada ao teor de gordura do leite. Além disso, altas temperaturas levam a decréscimo no teor de proteína, lactose e sólidos não gordurosos do leite. Nos meses quentes, os teores destes

componentes são normalmente mais baixos. Temperaturas mais baixas, no entanto, reduzem a produção de leite e aumentam os teores de gordura, proteínas e lactose (CRUZ et al., 2016).

Diante de tais aspectos de influência do ambiente na produção de leite, o Maranhão localizado no litoral norte do Brasil, tem como clima predominante o clima tropical o que, de acordo com Bezerra et al. (2017), lhe confere grande potencial para o desenvolvimento de uma pecuária leiteira mais moderna, por estar localizado na região caracterizada como Meio-Norte, região menos exposta às instabilidades climáticas periódicas existentes no Nordeste.

No Maranhão a pecuária leiteira é de extrema importância, tanto no ponto de vista social quanto econômico. A produção de leite esta presente em todas as regiões do estado. Gerando empregos e garantindo renda para boa parte da população (DOREA et al., 2003, apud SANTOS, 2016).

Entretanto, apesar do grande potencial de produção do estado do Maranhão devido sua condição geográfica e do crescimento da produção, a pecuária leiteira no Estado ainda apresenta baixa produtividade, pois o nível de adoção de tecnologias é incipiente o que gera instabilidade na oferta e na renda dos produtores. Por outro lado, os produtores estão inseridos em um mercado cada vez mais competitivo e exigente em termos de qualidade da matéria-prima, principalmente com a ampliação do número de laticínios, o que exige maior conhecimento sobre o comportamento e condições do mercado (BEZERRA et al., 2017).

Bezerra e colaboradores (2017) descrevem que a produção de leite bovino no estado do Maranhão cresceu a uma taxa de 5,62% ao ano entre 1974 e 2015 e exibiu comportamentos diferenciados ao longo das décadas sob influência da conjuntura econômica e do mercado consumidor. A maior influência sobre o crescimento da produção foi devida à expansão do rebanho, com o aumento do plantel de vacas ordenhadas, e em menor proporção aos ganhos em termos de produtividade animal o que configura crescimento extensivo.

De acordo com o IBGE (2019), em 2018 o Maranhão ocupou a 17ª posição em produção de leite no Brasil com aproximadamente 346 milhões de litros de leite produzidos, na região Nordeste ocupou o 5º lugar com produção de mais de 345 milhões de litros produzidos. Dados preliminares da Pesquisa Agropecuária 2019, revelam que no 4º trimestre, os laticínios adquiriram e processaram cerca de 17 milhões de litros de leite no estado e sendo a produção anual de aproximadamente 67 milhões de litros (IBGE, 2020).

Contudo, segundo o Serviço Nacional de Aprendizagem Rural – SENAR/MA a pecuária leiteira maranhense vem enfrentando várias dificuldades, principalmente às atribuídas a falta de pesquisa e assistência técnica que tem contribuído significativamente para o baixo nível tecnológico apresentado, em particular, pelos pequenos produtores que são a grande

maioria e para os altos custos de produção. Há ainda que se registrar a baixa produtividade do rebanho, principalmente, no cenário das pequenas e médias propriedades rurais (SENAR/MA, 2018).

2.2 Aspectos de qualidade do leite

O termo qualidade quando aplicado ao leite, compreende os aspectos relacionados às suas características intrínsecas e integrais, isto é, alto valor nutricional, baixa contaminação microbiana, ausência de bactérias nocivas para a saúde humana, de adulterantes, de sedimentos, de substâncias tóxicas ou de outros contaminantes químicos, sabor e odor agradáveis e adequação para o processamento, transformação, armazenagem e distribuição (PICCOLLO et al., 2014).

A qualidade do leite cru refrigerado no Brasil era regulamentada pela Instrução Normativa n° 62 de dezembro de 2011, que determina padrões de qualidade por região do país, mais exigentes com o decorrer dos anos. Em novembro de 2018, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, fixou novas regras para a produção de leite no país, especificando os padrões de identidade e qualidade do leite cru refrigerado, do leite pasteurizado e do leite pasteurizado tipo A através da Instrução Normativa (IN) n° 76 que trata das características e da qualidade do produto na indústria E da Instrução Normativa n° 77, na qual estão definidos critérios para obtenção de leite de qualidade e seguro ao consumidor e que englobam desde a organização da propriedade, suas instalações e equipamentos, até a formação e capacitação dos responsáveis pelas tarefas cotidianas, o controle sistemático de mastites, da brucelose e da tuberculose (BRASIL, 2018).

Dentre os critérios de qualidade, descritos na legislação, a ordenha é um ponto de extrema importância para a qualidade do leite, pois grande parte da contaminação do leite pode originar-se nesta etapa, uma vez que as condições de higiene do ambiente de produção e do manipulador (ordenhador) não estejam dentro dos padrões exigidos. Esta etapa acaba por definir a qualidade do leite produzido com implicações direta para toda a cadeia produtiva.

Quando se fala em qualidade físico-química do leite a maior preocupação é o seu estado intrínseco e extrínseco, pois está diretamente relacionado ao seu estado de conservação, à eficácia do tratamento utilizado e principalmente aquele relacionado com a adulteração onde ocorre a remoção de seus constituintes afetando a qualidade nutricional, ocorre também a adição de agentes estranhos que pode oferecer riscos de toxicidade (MARTINS; OLIVEIRA; SANTOS, 2012).

Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de diferentes substâncias como água, proteína, lactose, gordura, sais minerais e vitaminas. É um líquido de cor branco opaco, com pequenas variações que vão do creme ao levemente azulado. É de fundamental importância avaliar as características físico-químicas do leite, pois através destes parâmetros é possível verificar as fraudes e o estado de conservação do leite (AGNESE et al., 2002; KOBLITZ, 2014).

Neste aspecto, são avaliados os teores de acidez, densidade relativa, matéria gorda, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose e proteína.

Dentre os parâmetros de qualidade físico-química, a determinação da acidez do leite é uma das medidas mais usadas no controle da matéria-prima pela indústria leiteira, é expressa em graus Dornic ($^{\circ}\text{D}$) ou em porcentagem (%) de ácido láctico (KOBLITZ, 2014; BELOTI, 2015).

O método Dornic quantifica a acidez do leite provocada principalmente pelo ácido láctico, acidez de origem microbiana, e por isso conhecida como acidez adquirida. É determinada por meio de titulação direta de 10 mL de leite com solução-padrão Dornic (NaOH N/9), na presença de indicador fenolftaleína, sendo o mais usado para determinação rápida e precisa do teor de ácido láctico presente no leite (KOBLITZ, 2014; BELOTI, 2015). A densidade absoluta é a relação entre a massa e o volume de uma substância. No caso do leite, determina-se a densidade relativa, ou seja, a razão entre a massa de um determinado volume de leite e o mesmo volume de água, em uma dada temperatura. Esta razão está diretamente relacionada à composição química que, no leite, é de cerca de 12% a 13% de matéria sólida (sólidos totais) e 87% a 88% de água (DIAS, 2014; KOBLITZ, 2014).

Embora os sólidos totais sejam formados por uma grande quantidade de moléculas diferentes, majoritariamente, esta fração do leite é formada por gordura, proteína, lactose e sais minerais. Desta forma, a densidade do leite é influenciada pela concentração destas substâncias (DIAS, 2014; KOBLITZ, 2014).

De acordo com o Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2017), a determinação da densidade é feita com o uso de um densímetro digital de acordo com a norma ISO 15212-1.

A gordura do leite, consiste em uma mistura de compostos com propriedades em comum, de caráter apolar. É constituído por ácidos graxos e glicerol que provem em parte da corrente sanguínea. Nos ruminantes, o acetato e o beta-hidroxibutirato são os precursores mais importantes desta síntese (TRONCO, 2013; CRUZ et al., 2016).

Segundo Koblitz (2014), estes componentes encontram-se dispersos no leite na forma de glóbulos esféricos e são visíveis ao microscópio. Seu diâmetro varia de 0,1 a 15 μm , dependendo da espécie, da raça e do estágio de lactação do animal. A detecção do teor de gordura do leite fluído tem como métodos oficiais o gravimétrico (ISO 1211/IDF 1) ou o butirométrico, também chamado de Gerber (descrito na norma NMKL 40).

O método de Gerber baseia-se no ataque seletivo da matéria orgânica por meio de ácido sulfúrico, com exceção da gordura que será separada por centrifugação, auxiliada pelo álcool amílico, que modifica a tensão superficial. A porcentagem de gordura é lida diretamente na escala do aparelho e na base do menisco formado pela camada de gordura, imediatamente após retirar o aparelho do banho-maria. Se a coluna não estiver bem delineada, misturar novamente o conteúdo do aparelho e repetir os procedimentos de centrifugação e aquecimento (BRASIL, 2006).

A gordura é um componente químico que confere não só aroma como textura e rendimento, principalmente aos queijos (BARBOSA et al., 2014). É um dos componentes majoritários do leite e o teor médio no leite cru é em torno de 3,9%, entretanto a IN 77 estabelece teor mínimo de 3% (EMBRAPA, 2014; BRASIL, 2018). Assim, a determinação desse componente avalia a integridade do leite, bem como detecta possíveis fraudes.

O extrato seco total (EST) ou sólidos totais é o somatório da concentração de todos os componentes do leite exceto a água. O extrato seco desengordurado (ESD) é a diferença entre o EST e o teor de gordura. Estes parâmetros são muito importantes para a indústria, pois a partir deles é possível prever o rendimento na fabricação de derivados lácteos como queijos e outros. Em média, o EST no leite encontra-se entre 12% e 13% (DIAS, 2014), contudo a IN 76 determina um valor de 8,4% (BRASIL, 2018).

A determinação do EST e ESD é descrito na IN n° 68 de 12 de dezembro de 2006 e descrito na ISSO 6731 /IDF 21, consiste na perda da umidade e voláteis por dessecação e pesagem do resíduo assim obtido (BRASIL, 2006).

As proteínas do leite bovino são de alta qualidade, contendo um bom equilíbrio de todos os aminoácidos essenciais, incluindo a lisina. São os compostos nitrogenados mais importantes do leite, tanto do ponto de vista qualitativo e quantitativo. Sua composição é formada por 19 aminoácidos diferentes, representam cerca de 3,5% dos sólidos do leite e apresentam alto valor nutricional (KOBBLITZ, 2014; PICCOLLO et al., 2014; BELOTI, 2015).

A caseína é a principal proteína do leite, representa cerca de 80% das proteínas totais. É sintetizada na glândula mamária com o propósito de prover cálcio, aminoácidos e energia aos neonatos. Em altas temperaturas, as proteínas, podem ter sua integridade comprometida e

precipitar, principalmente quando este contém elevada quantidade de microrganismos psicrotóxicos, pois tais microrganismos produzem enzimas proteolíticas que quebram as proteínas e podem precipitar e danificar equipamentos e prejudicar a elaboração de derivados (BELOTI, 2015; CRUZ et al., 2016).

A detecção do teor de proteínas do leite baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico P.A. e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada, método conhecido como Kjeldahl (BRASIL, 2006).

A lactose é o açúcar característico e o sólido mais predominante no leite e fonte de material energético para diversos processos biotecnológicos e matéria-prima da indústria farmacêutica e alimentícia. É um dissacarídeo formado pela ligação glicosídica β (1,4) entre as moléculas de galactose e glicose, sendo sintetizada a partir da glicose absorvida do sangue e pela UDP galactose, por meio da enzima lactose sintetase, com modificador enzimático α -lactoalbumina. A lactose pode apresentar duas formas isoméricas, α - e β - lactoses, que podem ser identificadas por difração de raio-X e tem diferentes propriedades físicas. É um açúcar muito estável e sua hidrólise química pode ocorrer mediante a ação de ácidos diluídos e altas temperaturas, quando a lactose é hidrolisada a glicose e galactose (KOBELITZ, 2014; ANJOS et al. 2015; CRUZ et al., 2016).

A lactose está relacionada à regulação da pressão osmótica na glândula mamária, de forma que maior produção de lactose determina maior produção de leite (Peres, 2001, apud Brasil et al., 2012).

Para a avaliação da qualidade microbiológica do leite, utilizam-se os microrganismos indicadores de qualidade, sendo os mais importantes os aeróbios mesófilos, estafilococos coagulase positivos, coliformes totais e termotolerantes e *Escherichia coli* e, para o leite refrigerado, os psicrotóxicos (PS). A detecção e enumeração destes microrganismos são de importância para a avaliação tanto da qualidade final do leite, como da eficiência de práticas de sanitização de equipamentos e utensílios, qualidade na manipulação do produto e fontes de contaminação durante a obtenção, transporte e beneficiamento do leite (MATSUBARA et al., 2011).

A contagem total de bactérias mesófilas elevada pode indicar matérias-primas muito contaminadas, falta de higiene na produção, limpeza e desinfecção insuficientes e ainda condições de tempo e temperatura inadequadas durante a produção e conservação do alimento. A prova para determinar coliformes, no caso de leite cru, permite avaliar o grau de

contaminação do próprio leite. Com frequência, os coliformes do leite têm origem em utensílios mal desinfetados, tais como baldes, tarros, tanques e máquinas de ordenha (TRONCO, 2013).

As bactérias coliformes pertencem à família Enterobacteriaceae, incluindo os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*. Akeju (2015) descreve, ao citar Ashbolt et al. 2001 e Stevens et al. 2000, que enquanto os gêneros coliformes como *Escherichia* e *Klebsiella* são habitantes principalmente do trato intestinal, outros como *Enterobacter* e *Citrobacter* podem se originar de fezes, plantas e materiais do solo.

Em um esforço para aumentar a diferenciação funcional dentro do grupo coliforme diverso, Leclerc et al. (2001) propuseram três categorias de coliformes baseadas em características taxonômicas e fisiológicas: "termofílicas", que incluem *Escherichia coli* (*E. coli*) de origem fecal; "Termofílico e onipresente" e; "Psicrotróficos", que são puramente ambientais. Dos coliformes "termofílicos", que são caracterizados por sua capacidade de crescer e fermentar lactose entre 44 e 45 ° C, o único indicador confiável de contaminação fecal é a *E. coli*. Esse organismo não sobrevive bem em ambientes fora do trato intestinal de animais de sangue quente; portanto, não é um contaminante ambiental (MARTIN et al., 2016).

As *E. coli* são bactérias anaeróbias facultativas gram-negativas, oxidase-negativas, catalase-positivas, não esporas e facultativas encontradas naturalmente no trato gastrointestinal de animais e no meio ambiente por contaminação cruzada (AARESTRUP et al., 2008; ADZITEY et al., 2014, apud ADZITEY et al., 2016). Desta maneira, se as condições de manipulação e equipamentos de ordenha utilizados durante a extração do leite não forem adequadas, há uma maior probabilidade de ocorrência desta bactéria.

2.3 Staphylococcus spp

Os estafilococos são bactérias da família *Staphylococcaceae*, sendo classificados como Gram positivos e podendo se apresentar isolados ou aos pares, em cadeias curtas ou aglomerados irregulares semelhante a um cacho de uva, imóveis, anaeróbicos facultativos, catalase positiva e fermentam glicose com produção de ácido. Apresentam colônias com coloração variando de branca a amarelo alaranjado pela presença de pigmentos carotenoides (SANTOS et al, 2007; GOMES, 2013, apud SOVINSKI, 2019).

São micro-organismos mesófilos com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8° C e podem produzir enterotoxinas termorresistentes a temperaturas entre 10 e 46° C, com temperatura ótima entre 40 e 45° C. São tolerantes a concentração de cloreto de sódio de até 20% e o que faz dos alimentos curados potenciais veículos de intoxicação. São os únicos capazes de se multiplicarem em alimentos com valores de atividade de água inferiores ao

normalmente considerados mínimos para outras bactérias halófilas (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Marques et al. (2013) cita Coelho et al. (2011) e Silva et al. (2007) para reportar que os *Staphylococcus spp.* podem produzir uma série de fatores de virulência que contribuem para que a bactéria invada as defesas fagocíticas do hospedeiro, facilite a sua aderência às células epiteliais e a colonização no tecido, favorecendo a sua persistência extracelular e garantindo assim êxito em sua instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro. Entre estes fatores está a produção de um mucopolissacarídeo extracelular (“slime”), que parece ajudar na aderência e colonização do microrganismo ao epitélio glandular mamário.

De forma geral, pode-se esperar a presença destes microrganismos em quase todos os alimentos de origem animal ou naqueles diretamente manipulados, a não ser que tenham sido aplicados tratamentos térmicos para a destruição desses microrganismos (JAY, 2005).

Por se tratar de um organismo oportunista, está intimamente relacionado a inúmeras afecções e múltiplas resistências a antibióticos. Mas quando o objeto de estudo é leite e seus derivados, os *Staphylococcus spp.* estão entre os patógenos mais hegemônicos e visados. Isso se deve ao risco para a saúde da população, especialmente crianças e idosos, que são os principais consumidores dos produtos lácteos, quando expostos ao leite provenientes do animal com mastite (AMARAL et al., 2003; DE VISSCHER et al., 2017, apud POOL, 2020).

A legislação brasileira determina que, pós-ordenha, o leite deve ser refrigerado antes da pasteurização visando a inibição das bactérias mesófilas dentre as quais podemos destacar o gênero *Staphylococcus* como um potencial produtor de enterotoxinas. A preocupação com gênero ressalta-se por este ser um dos agentes mais comuns responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, uma vez que são normalmente transmitidos aos alimentos por meio de manipuladores, portadores assintomáticos, e por meio dos animais como o gado leiteiro (PRADO et al., 2015).

Destacando o gado leiteiro, umas das grandes causas desta contaminação por estafilococos são as mastites, processos inflamatórios da glândula mamária da vaca que são consideradas como o principal problema para os rebanhos leiteiros. Segundo Jay (2005), a mastite estafilocócica é bem conhecida pelos rebanhos leiteiros, e as chances de contrair intoxicação alimentar são grandes se o leite infectado dessas vacas for consumido ou utilizado na fabricação de queijos, por exemplo.

Os *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) são os agentes causadores de mastites subclínicas mais comuns em vacas leiteiras no mundo contemporâneo devido a numerosos fatores de virulência, como pigmentos, hemolisinas e elementos genéticos móveis que

codificam a resistência antimicrobiana. São incluídos no leite através da manipulação (mãos do ordenhador), equipamentos de ordenha e por decorrência da mastite bovina (RAJIC-SAVIC, et al., 2015). Deste grupo, com exceção de *S.aureus* e *S.hyicus / S.agnetis*, os estafilococos coagulase positivos raramente são isolados nos casos de mastite por ruminantes (VANDERHAEGHEN et al., 2015).

Dentre as espécies de SCP, os *S. aureus* são importantes agentes contagiosos de mastite, e são componentes da microbiota autóctone da pele do úbere, e capazes de colonizar e multiplicar rapidamente no canal do teto (BELOTI, 2015). São mesófilos, capazes de crescer em temperaturas de 6,7°C, mas geralmente o seu crescimento ocorre na faixa entre 7°C a 47,8°C, temperatura ótima de crescimento entre 20°C e 37°C. Já as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C, contudo a temperatura ótima de crescimento está entre 40°C e 45°C. Tais valores mínimos e máximos de temperatura de crescimento e produção de toxinas tem suas condições ótimas diferentes que está condicionada a fatores como concentração dos sais, pH e atividade de água (JAY, 2005).

Este microrganismo é dividido em diversos biotipos, tendo como base testes bioquímicos e padrões de resistência. Os biotipos são subdivididos de acordo com a fagotipificação, sorotipificação, análise de plasmídeo e ribotipificação. O *S. aureus* produz uma grande variedade de fatores de virulência: estafiloquinas, hialuronidas, fosfatas, coagulases e hemolisinas. (FORSYTHE, 2013).

Os *S. aureus* são a causa mais comum de intoxicação alimentar em todo o mundo. Segundo Silva et al. (2010), considerando os riscos para a saúde humana, o *S. aureus* é uma bactéria patogênica, cuja doença transmitida por alimento (DTA) é classificada pela Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) no grupo de risco III, que inclui as doenças “de perigo moderado”, usualmente de curta duração e sem ameaça de morte ou sequelas, com sintomas auto limitados mas que causam severo desconforto”, sendo necessária a ingestão de valores acima de 10⁶ UFC por grama do alimento para causar a intoxicação.

De acordo com Forsythe (2013), as intoxicações alimentares são causadas pelas enterotoxinas. Estas são proteínas de baixo peso molecular, as quais podem ser diferenciadas por meio de sorologia de vários tipos antigênicos: SEA a SEE, e SEG a SEQ, com três variantes de SEC. A SEA é a mais comumente associada as intoxicações causadas por *Staphylococcus*. São toxinas gastrointestinais, assim como superantigênicas que estimulam os monócitos e os macrófagos a produzir citosinas.

Cabe destacar que a toxina estafilocócica é termoestável, e muitas vezes não é inativada por coação usual (ANDRADE, 2008), daí a importância do controle deste microrganismo no leite cru, principalmente pelo fato de muitas cidades ainda comercializarem o leite nestas condições, sem refrigeração ou tratamento térmico adequado.

O *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) constitui a maioria do gênero *Staphylococcus*. Considerados responsáveis por infecções oportunistas em seres humanos e animais, caracterizam-se como um patógeno emergente que são normalmente encontrados na pele do teto sendo importante na etiologia da mastite, pois podem ter acesso ao interior da glândula mamária resultando na infecção intramamária (VANDERHAEGHEN et al., 2015; SILVA e RIZZO, 2019).

O SCN é a principal causa de mastite em vacas em sua primeira lactação, portanto é provável que seja responsável por possíveis perdas de produção de leite nos rebanhos levando o produtor a inúmeros prejuízos, como gastos com medicamentos, descarte de leite com antibióticos, descarte precoce de vacas e alteração na composição do leite. Entretanto, para o animal a mastite causada por SCN resulta em sinais leves locais, como leve rugor e pouca alteração da aparência do leite (KRISHNAMOORTHY et al., 2016; SILVA e RIZZO, 2019). Por isso, tradicionalmente, são considerados agentes patogênicos de menor relevância.

Ressalta-se que este grupo de microrganismos tem aumentado a sua importância, pois se tornaram um dos grupos de espécies mais frequentemente isolados no leite em muitas áreas em todo o mundo (RASPANTI et al., 2016). Dentre as espécies de SCN, destacam-se o *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. conhii*, *S. chromogenes*, *S. xylosum*, *S. equorum*, *S. capitis*, e *S. lentus* como as principais isoladas de alimentos com nenhuma capacidade de produzir enterotoxinas estafilocócicas (ESs). (KRISHNAMOORTHY et al., 2016).

Krishnamoorthy et al. (2016) descrevem que o grupo SCN normalmente não são identificados em nível de espécie, mas são tratados como um grupo uniforme e algumas espécies podem ser mais virulentas ou ter características clínicas diferentes, entretanto ainda faltam estudos comprobatórios.

KIM et al. (2018) destaca que o SCN é encontrado na pele humana e animal normal assim, uma vez em contato com a superfície do alimento pode servir como um veículo para a transmissão de bactérias patogênicas capazes de causar doenças em seres humanos. As infecções do SCN são de difícil controle devido a produção de biofilmes que aumenta sua resistência a antibióticos em cerca de 1000 vezes a resistência das bactérias planctônicas. As espécies do SCN, ainda produzem outros fatores e enzimas de virulência diversos, como hemolisina, lipase, lecitinase, DNase e protease.

Diante do exposto e considerando a produção de leite, em fazendas de pequeno e médio porte, a grande preocupação com estes microrganismos deve-se aos aspectos higiênicos dos equipamentos de ordenha e pela manipulação (mãos do ordenhador). Uma vez que estes não passem pelos procedimentos de boas práticas de produção podem gerar grandes desconfortos tanto para o rebanho como para a saúde humana, se este leite não passar por processos de tratamento térmico adequados.

2.4 Antimicrobianos

Antimicrobianos são substâncias usadas para inibir ou inativar o crescimento de microrganismos. No leite são largamente utilizados no tratamento de infecções que acometem as vacas principalmente no período de lactação. Como exemplo destas infecções, podemos citar a mastite. O uso destas substâncias na terapia animal, teve início na década de 50 e até hoje são fundamentais no auxílio preventivo e curativo à sanidade do rebanho (BELOTI, 2015).

Ungemach Müller-Bahrtdt; Abraham, 2006, apud Arias e Carrilho (2012), justificam o uso de antimicrobianos em veterinária como importantes agentes à proteção do bem-estar animal, prevenção da propagação epidêmica de doenças infecciosas, melhora da eficácia da produção animal, prevenção da transferência de zoonoses de animais aos seres humanos, segurança dos produtos de origem animal e prevenção de doenças de origem alimentar; assim, os antimicrobianos são fármacos vitais em medicina veterinária e dificilmente podem ser substituídos se não existirem alternativas viáveis.

Os antibióticos podem ser naturais ou sintéticos. São capazes de impedir a multiplicação ou gerar a morte de fungos ou bactérias, assim classificados como microbicidas, os quais causam a morte dos microrganismos, ou “estáticos”, os quais favorecem o bloqueio do desenvolvimento microbiano (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPPO, 2010, apud TEIXEIRA et al., 2019).

A maioria dos antibióticos naturais é originada de fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Cephalosporium* e *Micromonospora*, e de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Syrectomyces*. Sua produção natural exige a instalação de um parque industrial com grandes fermentadores para o cultivo do agente produtor da droga (TAVARES, 2007).

Os antibióticos sintéticos, são os antimicrobianos mais comumente utilizados no tratamento de bovinos com mastite e podem ser divididos em oito principais classes: beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, lincosamidas, macrolídeos, polimixinas, quinolonas, sulfas e tetraciclina (PEREIRA e SCUSSEL (2017) e podem ser melhor entendidos na Tabela 1.

Tabela 1- Características dos grupos de antimicrobianos

Grupo Antimicrobiano	Estrutura	Espectro de Ação	Modo de Ação
Beta-Lactâmicos (Penicilinas e Cefalosporinas)	Penicilinas: derivam do ácido 6-aminopenicilinâmico. Cefalosporinas: provêm do ácido 7-aminocefalosporinâmico	GRAM (+)	Impedimento da formação da parede celular das bactérias
Aminoglicosídeos	Núcleo de hexose ligado à aminoaçúcares por ligações glicosídicas	GRAM (-) e Staphylococcus spp.	Ligação à porção 30S do ribossomo, interferindo na síntese protéica bacteriana, formando proteínas defeituosas
Lincosamidas	Monoglicosídeos ligados a um aminoácido	GRAM (+)	Ligação à subunidade 50S dos ribossomos, inibindo a síntese protéica
Macrolídeos	Anel Lactônico	GRAM (+)	Translocação do RNAt na subunidade 50S do ribossomo impedindo a síntese protéica bacteriana
Polimixinas	Polipeptídico	GRAM (-)	Alteram a permeabilidade da membrana da célula bacteriana, levando à sua morte
Quinolonas	Anel 4-quinolona	GRAM (+) e (-)	Inibe a DNA girase bacteriana, impedindo o enrolamento da hélice de DNA
Sulfas	Análogas e antagonistas competitivas do ácido paraaminobenzóico (PABA)	GRAM (+) e algumas GRAM (-)	Impede a utilização do PABA na síntese do ácido fólico pelas bactérias
Tetraciclinas	Quatro anéis	GRAM (+) e (-)	Ligação à subunidade 30S dos ribossomos, não permitindo que o RNA transportador se ligue a ele, inibindo assim a síntese protéica

Fonte: PEREIRA E SCUSSEL (2017) adaptado de ARAÚJO (2010), SPINOSA et al. (2014)

Os β -lactâmicos são assim conhecidos por ser uma classe de medicamentos com a estrutura básica do anel β -lactâmico. Este anel, é o responsável pela atividade antimicrobiana dessa família de antibióticos, e seu rompimento em qualquer ponto resulta na perda completa da ação antimicrobiana da droga. A droga tem muitas vantagens, como forte atividade bactericida, baixa toxicidade e uma gama de indicações e valor de aplicação no campo da medicina clínica e veterinária (TAVARES, 2007; BELOTI, 2015; WU, et al., 2019).

As questões de segurança alimentar, causadas pela presença de seus resíduos em alimentos, levou a uma forte atenção do gerenciamento de segurança em vários países, pois

estes antibióticos podem causar alergias em humanos e danificar o equilíbrio da flora gastrointestinal. Os principais representantes deste grupo são as penicilinas (amoxicilina, ampicilina, penicilina G) e cefalosporina (ceftiofur, cefapirina e cefaxina) (TAVARES, 2007; BELOTI, 2015; WU, et al., 2019).

A penicilina é o beta-lactâmico mais conhecido, seu primeiro representante a penicilina G foi descoberta por Fleming, em 1928, ao observar a atividade antimicrobiana exercida por um fungo (*Penicillium Chrysogenum*) contaminante de uma cultura de *S. aureus*. As penicilinas são classificadas em naturais (obtidas por fermentação do *Penicillium Chrysogenum*) e semissintéticas que são obtidas por processo laboratorial em que modificações químicas são introduzidas no ácido 6-aminopenicilânico (TAVARES, 2007).

Os aminoglicosídeos, são um grupo de antibióticos que atuam na síntese protéica de bactérias Gram-negativas e de algumas Gram positivas. São hidrossolúveis com ação potencializada em pH alcalino devido à baixa absorção intestinal, menos de 1% da dose é absorvida após a administração oral ou retal, portanto a principal via de administração é a via parenteral. Dentre os aminoglicosídeos, os que mais se destacam no tratamento de doenças de animais, são a neomicina, a estreptomicina e a gentamicina (ANVISA, 2007; SILVA, 2015;). A gentamicina é um dos compostos mais usados no tratamento da mastite, ocupando aproximadamente 30% do mercado de medicamentos disponíveis para infusões mamárias (BELOTI, 2015).

As lincosamidas ou lincomiinas são antibióticos heterocíclicos originais, mas com espectro e mecanismo de ação que as aproximam dos macrolídeos, com quem, inclusive, podem ter resistência cruzada. A lincomicina, seu representante natural, é apresentada na forma de cloridrato monohidratado para uso oral e parenteral. (TAVARES, 2007). Seu mecanismo de ação é bloquear a síntese proteica através da ligação à subunidade 50S ribossomal bacteriana, impedindo a translocação durante a fase de tradução. Podem apresentar atividade bacteriostática ou bactericida, dependendo da concentração da substância, do tipo de bactéria e da inoculação da bactéria (GUIGÈRE, 2013, apud SOUSA, 2017). Agem sobre bactérias aeróbias gram-positivas incluindo os *S. aureus* (TAVARES, 2007).

Os macrolídeos são caracterizados pela alta lipossolubilidade, com ação na síntese de proteínas de bactérias Gram-positivas, por atravessar a barreira sanguínea da glândula mamária com facilidade, estão representados pela azitromicina, a claritromicina, a eritromicina e a espiramicina. O mais utilizado é a eritromicina, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da síntese protéica pela ligação à porção 50S dos ribossomos bacterianos (PACHECO-SILVA et al., 2014; BELOTI, 2015).

As polimixinas são antibióticos que interagem com a molécula de polissacarídeo da membrana externa das bactérias gram-negativas, retirando cálcio e magnésio, necessários para a estabilidade da molécula de polissacarídeo. Esse processo é independente da entrada do antimicrobiano na célula bacteriana e resulta em aumento de permeabilidade da membrana com rápida perda de conteúdo celular e morte da bactéria. Além de potente atividade bactericida, as polimixinas também apresentam atividade antiendotoxina. O lipídeo A da molécula de lipossacarídeo, que representa a endotoxina da bactéria gram-negativa, é neutralizado pelas polimixinas (ANVISA, 2007).

As quinolonas atuam na inibição da atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana. A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias. Também inibem, *in vitro*, a topoisomerase IV, porém não é conhecido se este fato contribui para a ação antibacteriana. Seu fator de resistência está relacionado, principalmente, à alteração na enzima DNA girase, que passa a não sofrer ação do antimicrobiano (ANVISA, 2007).

Sulfonamidas são drogas essencialmente bacteriostáticas e seu mecanismo de ação está na inibição do metabolismo do ácido fólico. Assim sendo, estes antimicrobianos atuam como antimetabolitos, ao competirem com o ácido p-aminobenzóico, um fator indispensável para a síntese de ácido fólico pela ligação com a enzima dihidropteroato sintetase, a enzima responsável pela catalisação da reação que origina o ácido dihidropteróico, essencial para a formação de ácido fólico (PRESCOTT, 2013, apud SOUSA, 2017). Sua aplicação pode ser sistêmica, agindo de maneira generalizada no organismo; oral, quando administradas por essa via e agem na luz do intestino, ou tópicas, de administração local (TAVARES, 2007; ANVISA, 2007, BELOTI, 2015).

Tetraciclinas compõem um grupo de antibióticos que apresentam em comum uma estrutura hidronaftalênica, sendo utilizadas no tratamento antibacteriano, agindo em muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas. Com base nestas características, tornou-se uma prática rotineira sua administração em vacas leiteiras saudáveis para prevenir infecções. Estes antibióticos podem ocasionar reações alérgicas em humanos e comprometer o desenvolvimento ósseo de crianças, interferindo na reabsorção de cálcio pelos ossos além de provocar alterações na dentição. A este grupo pertencem a oxitetraciclina, a tetraciclina e a clortetraciclina (ANVISA, 2007).

2.5 Resíduos de antibióticos no leite

A ausência de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes, em níveis prejudiciais à saúde, nos alimentos, como garantia de segurança alimentar, é um assunto relativamente novo no Brasil, porém muito tem sido discutido e exigido pelo comércio internacional. Os principais países importadores de alimentos possuem e exigem um programa de controle, com limites regulatórios bem definidos, quanto a presença destas substâncias, (PORTZ et al., 2014).

Estes limites são denominados de Limites Máximos de Resíduos (LRM), e consistem na concentração máxima permitida de um resíduo químico no alimento, que resulta da sua utilização profilática na agricultura ou nos animais quando as Boas Práticas Agrícolas são seguidas. Este é estabelecido de acordo com o Ingestão Diária Aceitável (IDA) de determinada substância dividida por um fator de segurança que reduz até 100 vezes essa quantidade (BELOTI, 2015).

No Brasil, a competência para estabelecer a IDA e o LMR de medicamentos veterinários em alimentos é da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), enquanto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) compete o registro dos produtos veterinários e a sua fiscalização (ANVISA, 2018).

Os antimicrobianos deixam resíduos no leite através da circulação sanguínea no animal. O leite é sintetizado no úbere da vaca, que é composto por quatro glândulas mamárias. Essas glândulas possuem alvéolos secretores, sendo cada alvéolo circundado por vasos sanguíneos, estes medicamentos são absorvidos pela corrente sanguínea, sendo excretados principalmente pelos rins. No entanto, muitos desses medicamentos também são excretados no leite (BRITO E BRITO, 2001, apud LAGE 2010).

O tratamento com antimicrobianos é necessário para sanidade animal, mas também para saúde pública, pela prevenção de zoonoses ou de doenças veiculadas por alimentos, pois resíduo desses antibióticos em leite pode causar reações alérgicas em indivíduos suscetíveis, aumento de bactérias resistentes a medicamentos e gerar outra toxicidade em humanos, desta forma, deve-se levar em conta as recomendações para seu uso, assim como todas as substâncias químicas animal (PEREIRA e SCUSSEL, 2017; CHEN et al., 2016).

A terapia começa com a escolha correta do medicamento, que possua o princípio ativo ao qual o agente infeccioso seja sensível, sendo sempre prescrito por um médico veterinário e com correta administração ao animal (PEREIRA e SCUSSEL, 2017; CHEN et al., 2016). Caso,

não atenda às exigências, o uso indiscriminado destes antibióticos na terapia bovina pode acarretar ainda em resistência dos microrganismos à estas substâncias.

Araújo e colaboradores (2015) relatam que a principal fonte de resíduos de antibióticos no leite, bem como, resultado do tratamento no início do período seco para controlar a mastite, é o manejo inadequado de drogas, no controle das mastites, metrite ou outra doença infecciosa. O uso difundido de antibióticos pelos produtores, de maneira indiscriminada, tem contribuído para presença desses resíduos.

Segundo Silva et al. (2013), a persistência dos resíduos de antibióticos no leite depende de uma série de variáveis, entre elas se destacam as mais importantes, como quantidade da produção de leite no momento do tratamento, tipo e quantidade do antibiótico usado, via de administração e estado de saúde do animal.

É importante destacar que os antibióticos possuem característica de resistência térmica variável e mesmo quando submetidos a tratamentos térmicos na faixa de 72 – 75 °C por 15 a 20 segundos, como pasteurização, fervura ou até mesmo a esterilização, que é um tratamento a ultra alta temperatura (UHT- *Ultra High Temperature*) a 130 – 140 °C por 4 segundos não inativam os resíduos de antimicrobianos supostamente presentes no leite (TRONCO, 2013). Daí a preocupação quanto a presença destes no leite.

Especificamente em relação ao leite Silva et al. (2013), ao citar Fagundes (1997), descrevem que os antimicrobianos podem gerar perdas na industrialização de produtos lácteos além de interferir em análises laboratoriais utilizadas como rotina em laticínios, como nos testes de fosfatase, peroxidase e redutase. É importante ressaltar que esses resíduos são altamente resistentes a tratamentos térmicos, tanto a altas como a baixas temperaturas.

Quanto a detecção de antibióticos no leite, Pacheco-Silva et al. (2014), descrevem ser utilizados diferentes tipos de métodos, sendo a maioria deles reconhecidos pela a Association of Official Analytical Chemists (AOAC) e American Public Health Association. Esses métodos abrangem desde os testes mais simples, como os de inibição microbiológica, imunológicos, enzimáticos até os mais complexos como os de cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS/MS). Por sua vez, todo método de detecção apresenta custo, tempo de execução, limites de detecção, resposta, exatidão e especificidade diferente, tornando-os como adequados ou não para cada fim proposto.

Os principais testes para detecção de resíduos de antibióticos no leite podem ser agrupados segundo o seu princípio em: inibidores bacterianos, imunológicos e/ou enzimáticos ou cromatográficos (BELOTI, 2015).

Os testes de inibição microbiana foram os primeiros testes desenvolvidos para o controle e presença de substâncias inibidoras no leite. São qualitativos de fácil execução e indicam a presença de resíduos de antibióticos de vários grupos simultaneamente (TRONCO, 2013). Apresentam-se na forma de kit com uma cultura padrão de um micro-organismo teste (por exemplo, *Bacillus Stearothermophilus*), um meio de cultura (ágar) e um indicador de pH. Após a inoculação da amostra de leite a ser testada, o kit é incubado por um período, geralmente de três horas. Se o leite não contiver resíduos ou apresentá-los em concentrações abaixo do limite de detecção do método, o microrganismo teste se multiplicará, o pH do meio diminuirá, e o meio mudará de cor. A presença da substância inibitória é indicada por zonas de inibição (teste de disco) ou por manutenção da cor original do kit (CULLOR, 1993, apud LAGE, 2010).

Os testes imunológicos e/ou enzimáticos foram a segunda geração de testes desenvolvidos para controle da presença específica de drogas veterinárias. São testes que indicam resultado positivo ou negativo para a presença de grupos específicos de antibióticos, apresentam alta sensibilidade, melhor especificidade que os testes de inibição e os resultados colorimétricos podem ser interpretados com facilidade. São os testes mais encontrados no mercado (TRONCO, 2013; BELOTI, 2015).

Os testes cromatográficos, segundo Tronco (2013), são aqueles que atuam na identificação e quantificação dos resíduos presentes no leite. o método mais utilizado é o HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Este método separa individualmente os diversos constituintes de uma mistura de substâncias, para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para diversos fins.

Trazendo alguns estudos sobre a detecção de antibióticos no leite, Nunes et al. (2013), ao avaliarem a presença de resíduos antibióticos no leite in natura em propriedades rurais da microrregião de Garanhuns, Pernambuco, detectou a presença destes em mais de 50% dos municípios e observou que estavam associados ao tipo de ordenha implantado na propriedade.

Costa e colaboradores (2017), avaliaram 71 amostras de leite cru produzidos na região de Marília, São Paulo e nove (12,7%) foram positivas para a detecção de resíduos de antibióticos da classe dos β -lactâmicos, sendo a maioria do município de Marília. Estes concluem que os resultados obtidos revelam uma preocupação e grande importância para a adoção eficiente de políticas de segurança alimentar em relação ao controle desses resíduos no leite e seus derivados, uma vez que, apesar de pequenos números, são responsáveis por qualquer piora da saúde humana, necessitando, portanto, de monitoramento contínuo e eficiente por parte dos produtores, veterinários, laticínios e indústria, desde o cuidado com os animais até o recebimento do leite.

O monitoramento frequente de medicamentos, seus derivados metabólicos e o controle de resíduos de agentes antimicrobianos no leite é muito importante para indústria de produtos lácteos, e, conseqüentemente, para o consumidor, estando este incapacitado de perceber se o leite consumido contém antimicrobianos (BRITO, 2006 apud SILVA et al., 2013).

2.6 *Staphylococcus spp* e resistência antimicrobiana

Sabe-se que a resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado a existência de genes contidos no microrganismo, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. Quando adquirida, essa resistência, resulta de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula bacteriana, as quais são decorrentes de fatores genéticos adquiridos por mecanismos que afetam o cromossomo bacteriano ou afetam elementos extracromossômicos (TAVARES, 2007).

Especificamente, a resistência aos antimicrobianos acontece quando a bactéria expressa genes que permitem a mediação no mecanismo de ação do antibiótico por transmutação espontânea de DNA ou por modificação e transmissão de plasmídeos. (SANTOS, 2004, apud Teixeira et al, 2019, p. 854).

Ou seja, uma bactéria é resistente a um determinado antibiótico quando o germe é capaz de crescer *in vitro* em presença da concentração inibitória que esta droga atinge no sangue (TAVARES, 2007).

A resistência natural, ou intrínseca, caracteriza uma determinada espécie bacteriana e compõem a herança genética cromossômica do microrganismo, tem caráter hereditário sendo transmitido verticalmente às células filhas por genes cromossômicos que determinam na célula bacteriana a ausência de receptores para a ação dos antibióticos os a existência de estruturas os mecanismos que impedem a ação da droga (TAVARES, 2007).

A resistência adquirida na reação a um ou a vários antimicrobianos numa população bacteriana originalmente sensível a estes mesmos antimicrobianos, o que resulta de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula bacteriana que decorrem de fatores genéticos adquiridos por mecanismos que alteram o cromossomo bacteriano ou afetam elementos extracromossômicos formados por seguimentos de DNA denominados plasmídeos. Vale ressaltar que enquanto a resistência natural não possui grande significado prático, por ser previsível e constante, a resistência adquirida é causa de importantes problemas clínicos por ser variável (TAVARES, 2007).

Dentre os mecanismos de aquisição de resistência, o principal para um microrganismo sensível se tornar resistente é a mutação cromossômica. Outra maneira de resistência pode ser transferida de um microrganismo resistente para um sensível por contato. Esta forma é mencionada como transferível, transmissível ou infectável. Pode ser transferível por organismos da mesma espécie ou de espécies diferentes. Este tipo de transferência é adquirida através de informações genéticas extras cromossomais chamados plasmídios. Um deles, denominado plasmídio R (R = resistência) contém um conjunto de genes que geram a resistência contra antibióticos (fator R) e genes FTR (fator de transferência de resistência) que controlam a replicação autônoma do plasmídeo e são responsáveis pela transferência de resistência a outros microrganismos (MOTA et al., 2005, apud OLIVEIRA E MEDEIROS, 2015).

Estudos realizados por Chambers (1997), descreve que as amostras de estafilococos na sua maioria são resistentes a várias drogas, sendo estas as beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, clorafenicol, quinolonas, macrolídeos, mupirocina dentre outros. Já Sahm (1994) descreve que a resistência dos *Staphylococcus spp.* a oxalina está ligada ao do gene *mecA*, responsável pela resistência aos patógenos também para outros medicamentos (SANTOS et al., 2006).

A aquisição de material genético por sua vez resulta de uma transferência vertical de material genético quando ocorre da célula-mãe para a célula-filha (divisão binária), ou de transferência horizontal de material genético quando essa aquisição se realiza entre células da mesma espécie ou de espécies diferentes, mas não para a filha (FUZETA, 2017).

Velásquez (2019) descreve, que as espécies de *Staphylococcus* possuem diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana: alteração/substituição do sítio ativo, impedimento para acessar o alvo, inativação enzimática do antibiótico, ativação de bombas de efluxo transmembrana para bloquear a ação do antimicrobiano. Nos *Staphylococcus spp.* a resistência a penicilina é atribuída a presença do gen *blaZ*, que codifica a síntese de β -lactamases responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico.

Outro mecanismo associado a resistência ao grupo β -lactâmico é atribuído a presença do gen *mecA*, que codifica uma proteína PBP2a de baixa afinidade à penicilina. As cepas de *Staphylococcus spp.* que possuem o gen *mecA* se denominam *Staphylococcus* meticilina-resistentes (SMR). O gen *mecA* é parte de um elemento genético móvel denominado cassette cromossômico estafilocócico (SCCmec - Staphylococcal cassette chromosome mec), a qual pode ser transmitido horizontalmente entre populações de *Staphylococcus sp* (VELÁSQUEZ, 2019).

Este fenótipo de resistência em *Staphylococcus sp* ocorre devido a codificação de uma nova proteína alvo, denominada PBP2a ou PBP2 que é reconhecida por apresentar baixa afinidade para a maioria das penicilinas e cefalosporinas (HARTMAN E TOMASZ, 1984; UBUKATA et al., 1985; GELATTI et al., 2009, apud NOBRE, 2017).

A PBP2a é uma transpeptidase que, com o auxílio do domínio transglicosilase da PBP2 de *S. aureus*, pode catalisar a biossíntese da parede celular bacteriana na presença do antimicrobiano β -lactâmico possibilitando o crescimento a sobrevivência da bactéria (HARTMAN & TOMASZ, 1984; PINHO et al., 2001, apud MELO, 2017).

Tal mecanismo de resistência compromete a utilização de diversos betalactâmicos na terapêutica das infecções, executando-se as novas cefalosporinas de quinta geração ceftobiprole e ceftarolina (CHAMBERS e DELEO, 2009; GELATTI et al., 2009; PLATA et al., 2009; HODILLE et al., 2017 apud NOBRE, 2017).

Nobre (2017) relata que, além dos *S. aureus* outras espécies do gênero *Staphylococcus*, em especial as não produtoras da enzima coagulase, os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), tem despertado o interesse da saúde pública, por sua participação em diferentes infecções humanas e animais, sobretudo pela elevada capacidade para aquisição e transmissão de vários determinantes de resistência antibiótica, incluindo o mec. Assim, os SCN que eram considerados apenas “contaminantes” isolados de processos infecciosos, passaram a ocupar um papel de extrema importância na epidemiologia das infecções em que estão envolvidos, ainda mais quando também possuem o determinante mec, possibilitando o surgimento dos *Staphylococcus* resistentes a metilicilina não aureus.

2.7 Leite e saúde pública

Alimentos produzidos de maneira inócua cada vez mais têm se tornado o centro das atenções, visto a crescente busca por uma alimentação saudável e qualidade de vida. Além disso, é notória a conscientização das pessoas em relação ao seu direito de consumir produtos seguros à saúde (PEREIRA e SCUSSEL, 2017).

Em fase da Segurança Alimentar e Nutricional que consiste na realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, e abrange, entre outros aspectos, a garantia da qualidade biológica, sanitária, nutricional e tecnológica dos alimentos, como descreva a Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006 (MARTIN, 2011), a qualidade do leite tem importância direta com a saúde das populações.

Assim, o leite é considerado um alimento mais completo para a espécie humana, sendo amplamente comercializado e consumido pela população, no qual crianças, idosos e

convalescentes compõem o grupo de indivíduos que devem utilizá-lo como parte integrante da dieta (GERMANO E GERMANO, 2015).

Diante do exposto, sob diversas perspectivas, o leite e derivados contribuem para a promoção da saúde humana. Suas características particulares, aliadas à versatilidade de aplicações tecnológicas, imprimem aos lácteos grande valor para que sejam alcançados os requisitos nutricionais dos indivíduos e das populações (CRUZ, 2016). Suas propriedades nutricionais estão cientificamente comprovadas, sendo descrito como um alimento completo para o ser humano em decorrência da sua quantidade de proteínas de elevado valor biológico (PICCOLO et al., 2014). Por essas propriedades é uma importante fonte nutricional., em países subdesenvolvidos, onde as deficiências alimentares são maiores.

Avaliando sua variada composição, podemos destacar alguns aspectos que fazem do leite é fonte nutricional tão importante.

A lactose, por exemplo, é o único dissacarídeo que ocorre exclusivamente no leite de mamíferos, formada por glicose e galactose, serve como precursora de derivados bioativos que tem aplicação em alimentos e fármacos Cruz et al. (2016). Seu baixo poder adoçante e sua baixa solubilidade, apresenta menor tendência de irritação das mucosas do estômago. É hidrolisada no intestino delgado por ação da enzima lactase existente nas células epiteliais da mucosa intestinal. Sua utilização pela microflora intestinal resulta na produção de ácido lático e na diminuição do pH, promovendo o desenvolvimento de uma microflora intestinal lactofílica desejável, inibindo o crescimento de bactérias putrefativas e patogênicas. A lactose é importante pois melhora a absorção de cálcio pelo organismo e ainda é considerada como uma fonte persistente de energia dada sua absorção mais lenta em relação a sacarose (TRONCO, 2013).

A gordura presente no leite de ruminantes como a vaca, é importante fonte de energia e nutrientes na dieta humana. Entretanto, alimentos ricos em gordura se tornaram sinônimos de obesidade em função do maior conteúdo calórico da gordura comparado aos carboidratos e proteínas, o que contribui para a redução no consumo de lácteos integrais, contudo estudos epidemiológicos e de intervenção dietética têm indicado que a ingestão regular de gordura do leite como parte de uma dieta equilibrada não aumenta o risco de doenças cardiovasculares, e está ainda associada a um menor risco de obesidade nas populações estudadas (CRUZ et al., 2016).

Quanto ao fornecimento de cálcio para o organismo, o leite e os lácteos são considerados as principais fontes alimentares deste mineral devido a seu alto teor e também por não conterem fibra, uma vez que as fibras aumentam o peristaltismo gastrointestinal diminuindo a absorção do mineral (CRUZ et al, 2016).

Como já discutido, esta rica composição nutricional imprime ao leite elevado potencial de degradação, com relação a presença de microrganismos para a saúde da população. Em estudos realizados por Lues et al 2003, em economias emergentes, mostraram que as altas contagens de vários contaminantes microbianos no leite podem ser atribuídas principalmente à ignorância em relação ao saneamento básico e à falta de infraestrutura básica como eletricidade e suprimento inadequado de água. Isso confirma a relação entre status socioeconômico e higiene do lar (WANJALA et al., 2018).

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. 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. (PINHEIRO, 2015; ARCURI et al, 2006 apud SILVA JUNIOR, 2018 p. 12).

Wanjala e colaboradores (2018) descrevem, que muitas destas economias emergentes estão nas regiões tropicais que têm um clima quente e úmido por grande parte do ano. Isso oferece temperatura ideal para crescimento e multiplicação de bactérias após a contaminação inicial. O problema é agravado pela falta de infraestrutura básica, como mau estado das estradas, especialmente durante a estação chuvosa e falta de instalações de refrigeração para conter o crescimento bacteriano.

Diante disso, a contaminação do leite por bactérias patogênicas, como os *Staphylococcus* pode desencadear problemas de intoxicação ou mesmo por sua capacidade de adquirir resistência aos antibióticos.

Staphylococcus aureus produzem um forte impacto negativo em saúde pública. Isso se deve a suas capacidades em provocar doenças, toxinfecções, evasão do sistema imune, resistência a antibióticos e outros elementos genéticos característicos da espécie, reflexo de sua habilidade evolutiva. A compreensão do agente e determinação do perfil epidemiológico e genético dos *Staphylococcus aureus* fornecem subsídios para prevenção e outras medidas que minimizem as infecções e toxinfecções à população (KO et al., 2016, apud POOL, 2020, p. 04).

Como relata Martin (2011), com relação à presença de resíduos de antimicrobianos para a saúde pública: “Diferentes tipos de riscos estão implicados na problemática da presença de destes em leite, tais como os microbiológicos, os imunopatológicos e os toxicofarmacológicos.”

Quando utilizados de forma inadequada no tratamento dos animais de produção, os antibióticos contribuem para gerar cepas resistentes de microrganismos que podem ser transmitidas ao ser humano pela ingestão do leite, ou ainda, causar reações de hipersensibilidade e possível choque anafilático em consumidores de produtos lácteos sensíveis aos antimicrobianos caracterizando outro relevante risco à saúde pública (KAISER et al., 2014).

Anika et al. (2019) ao avaliar alguns trabalhos descreve que o antibiótico termolábil pode ser destruído pelo cozimento, pasteurização ou processos de enlatamento; no entanto, metabólitos e/ou conjugados de antibióticos podem ter permanecido no leite após ferver. Daí uma preocupação da presença deste produto para a saúde dos consumidores quando podem causar intoxicação ou resistência.

Sendo tão importante alimento e fonte de nutrição, principalmente para as populações mais carentes, o leite, no que se refere a saúde pública pode constituir grande perigo uma vez que é comercializado cru, se não houver os mínimos cuidados com as práticas de higiene e conservação deste produto, principalmente na zona rural e nas cidades do interior do país.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o perfil do leite cru de propriedades produtoras no município de Bacabal/MA, utilizando como parâmetros as análises microbiológicas, físico-químicas, resistência de bactérias patogênicas a antimicrobianos e presença de resíduos de antibióticos.

3.2 Específicos

- Investigar a qualidade físico-química do leite cru produzido em propriedades produtoras de leite no município de Bacabal/ MA.
- Avaliar a qualidade microbiológica do leite cru.
- Identificar as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa.
- Avaliar a resistência das espécies de *Staphylococcus* presentes no leite frente a alguns antibióticos.
- Investigar a presença de resíduos de antibióticos no leite.

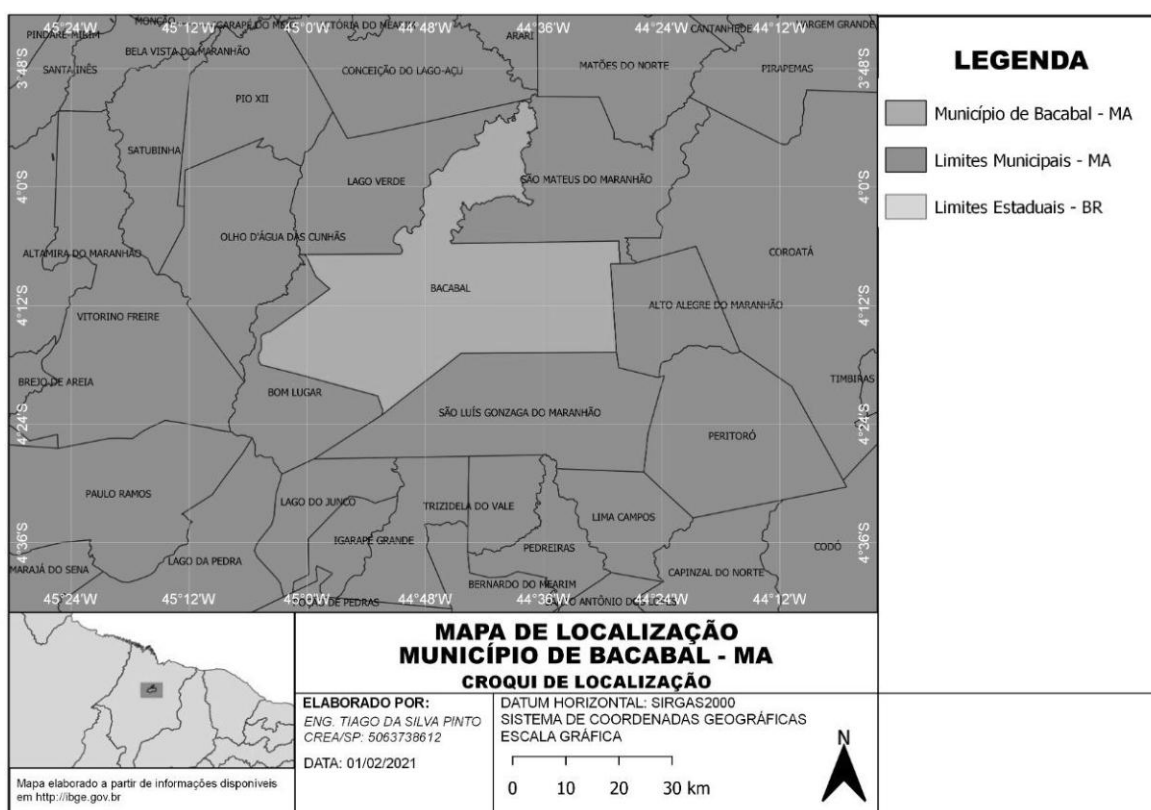
4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização da área de estudo

Bacabal é um município banhado pelo Rio Mearim, localizado na área central do estado do Maranhão tem, de acordo com o IBGE (2021) área total de 1.656,736 km² e população estimada em 104.790 pessoas de acordo com o Censo 2010.

Está situada na mesorregião Centro Maranhense, mais especificamente, na microrregião do Médio Mearim, tem como limites os municípios de São Luís Gonzaga do Maranhão, do qual foi desmembrado em 1920, Vitória do Mearim, Lago do Junco, Bom Lugar, Pio XII, Lago Verde, Olho D'água da Cunhãs, São Mateus do Maranhão, tendo sido esses três últimos desanexados da cidade em estudo no ano de 1961 (MILEN, 2018). (Figura 1)

Figura 1: Localização da área de estudo



Fonte: Mapa elaborado a partir de informações do IBGE: <http://ibge.gov.br>.

Bacabal – MA, possui clima Tropical Equatorial com 4 a 5 meses de seca (segundo semestre) e verão e outono chuvosos (primeiro semestre) principalmente nos meses de março e abril. A pluviosidade anual gira em torno de 1600 e 2000 mm e as temperaturas médias anuais ficam entre 24°C e 28°C. Constitui-se nessa faixa de transição entre o bioma da Caatinga e da

Floresta Tropical Amazônica, a chamada Mata dos Cocais, principal formação vegetal da região. (MILEN; CARACRISTI, 2016).

4.2 Coleta das amostras

Todas as coletas ocorreram na madrugada, horário da primeira ordenha em todas as propriedades.

A identificação das fazendas seguiu a ordem de coleta sendo as propriedades identificadas como Fazenda 1 (F1), Fazenda 2 (F2), Fazenda 3 (F3) e Fazenda 4 (F4) e Fazenda 5 (F5).

As coletas ocorreram nos meses de maio e outubro: as *Fazendas 1 e 2* tiveram suas amostras coletadas em maio e as *Fazendas 3, 4 e 5* em outubro.

As amostras foram coletadas obedecendo o tempo de transporte de no máximo seis horas até as análises no laboratório. A campanha de amostragem realizou-se entre os meses de maio e outubro de 2019 (duas fazendas em maio e três em outubro). Para as fazendas F1, F2, F3 E F5 o leite foi coletado diretamente dos baldes ou caixas de armazenamento, para a F4 a coleta ocorreu do tanque de refrigeração a coleta ocorreu retirando-se 500 mL de amostra, em triplicata, utilizando concha esterilizada e frascos estéreis que foram posteriormente identificadas e transportadas em caixa isotérmica, até os laboratórios de Bromatologia e Microbiologia do Programa Controle de Qualidade de Alimentos e Água da Universidade Federal do Maranhão – Campus Bacanga para realização das análises físico-químicas e microbiológicas.

4.3 Avaliação do perfil do leite cru em propriedades produtoras de leite no município de Bacabal/MA

Análises físico-químicas

Foram avaliados os seguintes parâmetros físico-químicos: acidez, densidade relativa (g/mL), matéria gorda (g/100 g), extrato seco total (EST) (g/100 g), extrato seco desengordurado (ESD) (g/100 g), lactose (g/100 g) e proteína (g/100 g). As análises físico-químicas seguiram as técnicas preconizadas e descritas pelos Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolf Lutz (LUTZ, 2008), sendo descritos a seguir.

A acidez seguiu o método Dornic (427/IV) de titulação com solução de hidróxido de sódio N/9 na presença de fenolftaleína até o ponto de equivalência. A densidade relativa (423/IV) consiste em colocar a amostra de leite em uma proveta e mergulhar o densímetro, esperar estabilizar e realizar a leitura no menisco superior. A determinação da matéria gorda

(433/IV) baseia-se na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, na centrifugação e posterior determinação da gordura. O EST segue o método (429/IV), que consiste em desidratar uma amostra de leite em estufa (103 ± 2) °C por 2 horas. O ESD é determinado pelo método 431/IV e dá pelo cálculo da diferença entre a percentagem de EST e a percentagem de gordura. A quantificação da lactose (432/IV) baseia-se na redução dos íons cúpricos (Solução de Fehling) a íons cuprosos pelo açúcar redutor (lactose) em meio alcalino, a quente. Para determinação da proteína (435/IV), o método baseia-se na destruição da matéria orgânica por digestão com ácido sulfúrico.

Análises microbiológicas

A metodologia para efetuar as análises microbiológicas obedeceu ao *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods* (APHA, 2017). As análises realizadas foram: contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa e *Salmonella*.

Contagem de coliformes totais, termotolerantes e E. coli

Para contagem do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes utilizou-se o exame presuntivo e após o exame confirmativo, em sequência a identificação de *E. coli*.

Transferiu-se 25ml da amostra para um frasco contendo 225 mL de solução salina a 0,85% de NaCl (diluição 10^{-1}). A partir desta diluição, procedeu-se com as diluições sucessivas. Destas diluições inoculou-se com 1 mL três séries de três tubos de ensaio contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato e tubos de Durhan invertidos. Cada série correspondendo a uma das diluições decimais. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24/48 horas.

Para a prova confirmativa de NMP/mL de coliformes totais, culturas dos tubos de ensaio positivos no Caldo Lactosado foram transferidas para tubos de Caldo verde brilhante, com posterior incubação em estufa bacteriológica a 35°C por 24/48 horas. Os resultados foram expressos em NMP para coliformes a 35°C por mililitro (NMP/mL).

Para a prova confirmativa de NMP/mL de coliformes a 45°C, culturas dos tubos de ensaio positivos no Caldo Lauril Sulfato foram transferidas para tubos de Caldo EC, com posterior incubação em banho-maria a 45°C por 24/48 horas. Os resultados foram expressos em NMP para coliformes a 45°C por mililitro (NMP/mL).

Para identificação de *E. coli*, a partir de cada tubo de ensaio positivo com Caldo EC foi realizado estrias nas placas de Petri com Agar EMB (Eosina Azul de Metileno) com auxílio de alça de níquel cromo e incubou-se a 35°C por 24 horas. Teve-se o cuidado de, durante a inoculação, não colocar muito material da amostra, a fim de não superlotar as placas,

proporcionando às colônias crescimento isolado, transcorrido este tempo, verificou-se o crescimento de colônias com características de *E. coli*, ou seja, 2 a 3 cm de diâmetro, com brilho metálico esverdeado ou com centro escuro.

De cada placa correspondente a cada tubo, repicou-se de 2 a 3 colônias características para tubo com Agar Triptona de Soja (TSA) inclinado e incubou-se por 24 horas a 35-37°C. Foram realizadas em cada cultura de TSA, as provas bioquímicas com o Sistema de Identificação convencional.

Contagem de Staphylococcus coagulase positiva e negativa

Para a contagem de *Staphylococcus*, as amostras diluídas foram inoculadas na superfície de placas contendo ágar Baird-Parker. Após o término das operações, as placas foram incubadas em posição invertida, à temperatura de 37° C, por 24 horas. Foram contadas as placas que continham entre 20 e 200 colônias suspeitas de *Staphylococcus* coagulase positiva ou coagulase negativa. Os resultados estão expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) de *Staphylococcus* por mL da amostra.

Para a identificação utilizou-se a coloração de Gram, prova da catalase e coagulase.

Contagem de Salmonella

Em 225 mL de Água Peptonada Tamponada foram homogeneizados 25g da amostra. Após incubação a 35°C por 24 horas (pré-enriquecimento), retirou-se 1 mL e 0,1mL do cultivo e transferiu-se para 10mL de Caldo Tetracionato e para o Caldo Rappaport-Vassiliads, respectivamente, os quais foram incubados a 35°C/24 horas. Após o período de incubação, realizou-se o plaqueamento seletivo em placas de Petri contendo o Ágar Hektoen. As colônias típicas foram submetidas a testes bioquímicos.

Análise da presença de resíduo

A avaliação da presença de resíduo de antibiótico no leite aconteceu pela utilização do kit Eclipse 50 (figura 2), kit em formato de placa com microtubos contendo um meio de cultivo específico com esporos de *Geobacillus stearothermophilus* e um indicador ácido base. O teste foi feito, colocando-se 50 µL do leite em cada recipiente que são posteriormente vedados e levados para incubação em placa aquecedora a 65 °C por 2h45min para alteração de cor do conteúdo do microtubo, conforme descrito nas instruções do produto. O resultado é POSITIVO quando a coloração do teste mantém sua coloração **roxa** e NEGATIVO quando ocorre mudança de coloração para **amarelo**.

Figura 2 – Kit Eclipse 50 para detecção de resíduos de antibióticos e amostra de leite usadas no teste.



Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2020.

O teste comprova se o leite contém antibióticos em uma concentração acima dos limites máximos de resíduos (LMR) para as seguintes classes de antibióticos: β -Lactâmicos (penicilina G, ampicilina, amoxicilina, oxacilina, cloxacilina, cefalexina e cefapirina), Sulfonamidas (sulfatiazol, sulfametacina e sulfanilamida), Tetraciclina (oxitetraciclina e tetraciclina), Macrolídeos (eritromicina e tilosina) e Aminoglicosídeos (neomicina e estreptomicina), segundo informações do fabricante.

4.4 Avaliação da resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* isolados do leite cru no município de Bacabal/MA.

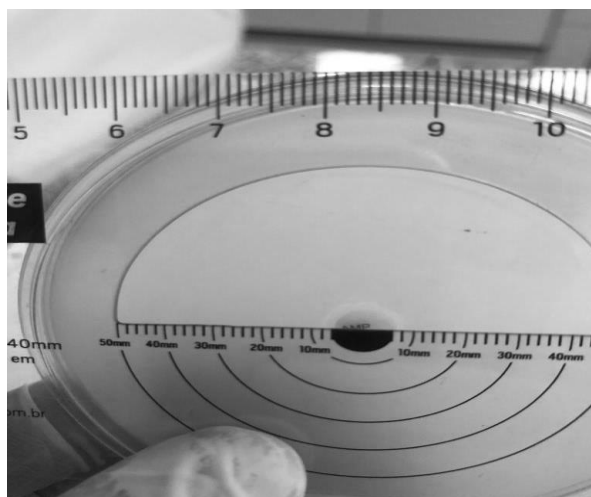
Para avaliar o comportamento das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa isoladas do leite frente à ação de antimicrobianos utilizou-se o método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). Uma cepa de cada fazenda foi utilizada para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos. Os padrões de sensibilidade obedeceram aos padrões descritos pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2020).

Avaliou-se a sensibilidade frente aos seguintes antimicrobianos: gentamicina (GEN10 μ g), ampicilina (AMP 10 μ g), cefalotina (CFL 30 μ g), penicilina G (PEN 10 μ g), oxacilina (OXA 1 μ g) cloranfenicol (CLO 30 μ g), eritromicina (ERI 15 μ g).

A leitura dos halos de inibição ocorreu com a utilização de uma régua milimetrada (Figura 3). Considerando a realização dos testes em triplicata, a média dos valores obtidos

foram comparados com valores de sensibilidade estabelecidos pelo CSLI (2020) e Soares (2010), sendo classificados como: **Sensível (S)**; **Resistente (R)** e **Intermediário (I)**.

Figura 3 - Representação de medição do halo de inibição com auxílio da régua milimetrada.



Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2020.

Para ter uma melhor caracterização da resistência, calculou-se o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA). Utilizou-se a metodologia descrita por Krumperman (1983). O índice IRMA é determinado pela proporção percentual de resistência aos agentes antimicrobianos testados, ou seja, é calculado pela razão entre o número de antibióticos aos quais o isolado se mostrou resistente e o número de antibióticos ao qual o isolado foi exposto (SILVA, 2017). IRMA superior a 0,2 caracterizou multirresistência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil das propriedades produtoras de leite cru no município de Bacabal/MA – Brasil

Descrevemos aqui o perfil de qualidade do leite frente as análises físico-químicas, microbiológicas e da presença de resíduos e destacamos os pontos a seguir:

As *Fazenda 1, 3 e 4* tem sistema de ordenha mecânica e nas *Fazenda 2 e 5*, a ordenha é manual.

Somente a *Fazenda 4* possui tanque de refrigeração.

As *Fazendas 1, 2 e 5* distribuem o leite para pequenos revendedores que recolhem o leite todas as manhãs, logo após a ordenha. A *Fazenda 3*, abastece um programa do governo e a *Fazenda 4*, usa sua produção para elaboração de derivados lácteos dentro da propriedade e que são revendidos no comércio de Bacabal/MA.

5.2 Qualidade físico-química

A Tabela 2 apresenta os valores estatísticos dos parâmetros avaliados no leite de cada fazenda, com base no teste de Tukey.

Tabela 2 - Resultados das análises físico-químicas do leite cru das propriedades do município de Bacabal/MA

Análise	F1	F2	F3	F4	F5	Padrão *
Acidez (°Dornic)	16,0 ^a ±0	17,0 ^a ±0	17,0 ^a ±0	18,9 ^b ±1,0	20,3 ^c ±0	14 a 18
Densidade a 15°C	1,028 ^a ±0	1,032 ^b ±0	1,029 ^c ±0	1,031 ^d ±0	1,030 ^d ±0	1,028 a 1,034
Matéria Gorda (g/100g)	4,5 ^a ±0,1	3,5 ^{bc} ±0,1	4,3 ^{ad} ±0	3,2 ^b ±0,3	3,9 ^{cd} ±0,2	Mín. 3,0
Extrato seco total (g/100g)	14,6 ^a ±0	12,3 ^b ±0	12,8 ^c ±0	11,9 ^d ±0,3	12,4 ^b ±0	Mín. 11,4
Extrato seco desengordurado (g/100g)	10,1 ^a ±0,1	8,8 ^b ±0,1	8,6 ^c ±0	8,7 ^b ±0,1	8,4 ^c ±0	Mín. 8,4
Lactose (g/100g)	4,6 ^a ±0,2	5,7 ^b ±0,1	5,3 ^c ±0	4,2 ^d ±0,1	2,3 ^e ±0	Mín. 4,3
Proteínas (g/100g)	3,0 ^{ac} ±0	2,8 ^a ±0	4,0 ^b ±0,1	3,3 ^c ±0,2	3,8 ^b ±0,1	Mín. 2,9

Fonte: Autoria própria, 2019; *IN n° 76 de 26 de novembro de 2018.

Média±DP. Letras diferentes em uma mesma linha indica diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%.

Segundo Mensen (2015) os parâmetros físico-químicos de qualidade do leite, refletem ações de toda a cadeia produtiva, desde a produção e coleta na propriedade de sua obtenção, até seu envase e distribuição, e são realizadas com o objetivo de fornecer um alimento seguro ao consumidor.

Comparando os valores de acidez há uma média 17,84°D, variando de 16 a 20,3°D entre as amostras. Estudos realizados por Mendes et al (2015) em amostras de leite cru refrigerado coletadas de produtores do município de Paracatu–MG, encontraram valor médio de acidez semelhante ao observado nesta pesquisa.

Observamos ainda uma diferença significativa da Fazenda 5 em relação as outras amostras cujo valor de acidez é de 20,3°D e da fazenda F4 (18,9°D), portanto fora do valor máximo exigido pela legislação.

Como descrevem Melo; Barbosa e Pereira (2018), a acidez tem importância significativa na qualidade do leite, pois é utilizada como indicativo da qualidade, quando relacionada a seu estado de conservação, em função da relação entre a disponibilidade de lactose e a produção de ácido láctico, devido à ação de microrganismos deteriorantes que convertem a lactose do leite em ácido láctico.

Segundo Oliveira & Santos (2012) os microrganismos mesófilos são os principais responsáveis pelo aumento da acidez do leite, sendo o parâmetro mais importante para a avaliação de sua qualidade quanto ao aspecto tecnológico. Ele indica o grau de metabolização da lactose em ácido láctico, em função da má qualidade microbiológica e da conservação inadequada (OLIVEIRA, 2017).

Outro indicador de qualidade do leite é a densidade, uma propriedade sensível a alterações no volume ou na quantidade de sólidos do leite, por essa sensibilidade pode ser facilmente influenciada pela temperatura, daí a leitura padronizada desta medida ser a 15 °C, pois temperaturas elevadas, levam a expansão do volume diminuindo a densidade. Baixas temperaturas, ao contrário, aumentam o valor da densidade. Ao avaliarmos este parâmetro, vimos que a legislação recomenda valores entre 1,028 e 1,034 (BRASIL, 2018; BELOTI, 2015).

Neste estudo as Fazendas F1, F2, F3 e F4 apontam diferença significativa no valor da densidade, sendo a média deste estudo de 1,030. Mesmo apresentando valores significativos diferentes, todas as amostras estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação. Valores fora do intervalo permitido pela legislação podem ser derivados de ações fraudulentas. Densidades maiores são indicativas de desnate prévio do leite, enquanto densidades menores pode ser indício de adição de água (TRONCO, 2013).

Partindo para análise dos constituintes do leite, a gordura, é o componente de maior variabilidade no leite. No leite de vaca, a gordura pode variar de 2,5 a 6,0% e é responsável pelo grande número de ácidos graxos essenciais e pelo valor calórico do leite, sendo seu valor nutricional proveniente das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e a presença do caroteno precursor da vitamina A. Uma vantagem deste componente para a nutrição humana é o ponto de fusão dos lipídeos do leite que ocorre abaixo da temperatura do corpo humano (29-32 °C) (TRONCO, 2013; KLOBTIZ, 2014).

Os valores encontrados neste estudo variam de 3,2 a 4,45 g/100 g (Tabela 3). A Fazenda 1, apresentando maior teor de gordura (4,5 g/100 g) e uma diferença significativa em relação as Fazendas 2, 4 e 5. O teor mínimo de gordura exigido pela IN 76/2018 é de 3,0 g/ 100 g estando todas as fazendas com valores acima do mínimo exigido.

Estes valores corroboram com os valores de Nascimento et al. (2016) que avaliaram as características físico-química do leite em propriedades do Município de Santa Rita do Passa Quatro – SP, e encontram valores superiores ao mínimo determinado pela legislação. A gordura é importante fonte de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis, assim, sendo o leite das fazendas em estudo é comercializado cru (sem processos de padronização), estes valores representam uma média nutricional de boa qualidade para consumo se comparado pelos valores determinados pela legislação para o leite cru refrigerado e leite pasteurizado integral.

Gonçalves et al. (2020) encontraram em sua pesquisa valores médios de 3,56 g/100 g entre as fazendas em estudo, valores acima desta média foram observados neste estudo 3,85 g/100 g. É importante lembrar que a gordura do leite é o componente com maiores chances de alteração pela manipulação da dieta, pode-se produzir leite com baixo teor de gordura quando são fornecidas dietas com alto teor de concentrados, baixa concentração de fibra efetiva, quando são adicionados ácidos graxos insaturados na dieta, forragens com tamanho de partículas muito pequeno e adição de ionóforos (FONSECA e SANTOS, 2007, apud SOARES E BEZERRA, 2010). Neste sentido, os resultados mostram existir um cuidado com o fornecimento de alimentos aos animais em todas as fazendas, o que favorece o bom teor de gordura apresentado.

Indispensável para se avaliar a integridade de um leite, a percentagem de matéria seca ou extrato seco é dividido em dois: o termo extrato seco total (EST) engloba todos os componentes do leite, exceto a água. Por extrato seco desengordurado (ESD) compreendem todos os elementos do leite, menos a gordura e a água (TRONCO, 2013). A determinação do extrato seco total é importante porque este resultado é necessário para a determinação do extrato seco desengordurado (ESD, parâmetro esse obtido a partir da diferença da % EST e do teor de gordura (LOVATO, 2013).

Importante destacar que as determinações do EST e do ESD são importantes para avaliar a composição do leite e sua integridade, permitindo estimativas quanto ao rendimento de produtos derivados, além de favorecer sua classificação e destino (PICININ, 2003, apud LOVATO, 2013).

Para os percentuais de EST, a fazenda F1 apresenta diferença significativa em relação as demais, apresentando o maior teor (14,6g/100g), relacionando as fazendas F2 e F5, que possuem mesmo tipo de ordenha (manual), observa-se que não há diferença nos teores de EST. Contudo, os valores de todas as fazendas encontram-se acima do mínimo exigido.

Quanto aos percentuais de ESD, Lovato (2013) descreve que estes podem variar em função da variedade nutricional de alimentos fornecidos aos animais. Outro fator que ocasiona o baixo nível de ESD é a ocorrência de enfermidades, como a mastite (inflamação da glândula mamária da vaca que pode ser causada por agentes infecciosos, principalmente as bactérias).

Nesta pesquisa, os valores de ESD encontram-se acima do mínimo exigido pela legislação, sendo que a Fazenda 1 (10,1 g/100 g) apresentou uma diferença significativa em relação as demais. As fazendas F2 e F5, apresentaram uma pequena diferença significativa sendo as médias encontradas para essas amostras são de 8,8 e 8,4 g/100 g. Tal resultado é importante para comprovar a qualidade do leite coletado nestas fazendas, pois, uma redução substancial dos sólidos totais poderia levantar suspeitas de adição fraudulenta de água, após a ordenha.

Cabe destacar que o período do ano influencia na quantidade de sólidos não gordurosos do leite, em períodos mais quentes do ano, os teores deste componente apresentam decréscimo. Nas fazendas em estudo, a coleta foi realizada em períodos diferentes do ano, a diferença entre as fazendas F2 e F5 pode ter influência do período do ano no qual as coletas ocorreram (maio e outubro, respectivamente), sendo o mês de outubro o período mais quente. Além disso o tipo de alimentação administrada ao animal e as condições de manejo adotadas pelas fazendas também podem influenciar.

Entretanto, os valores de lactose apresentados pelas fazendas F2 e F5, demonstram uma diferença significativa conforme os valores da tabela 2, o que determina a diferença nos valores do ESD. A lactose na fazenda F5 apresenta teor muito abaixo do exigido pela legislação, por isso o baixo valor de ESD. Recordando os valores da acidez do leite nesta fazenda (20,3°D) e a influência dos microrganismos na degradação de lactose e conseqüente formação de ácido láctico, ou seja, redução da lactose, temos a resposta para o baixo teor apresentado pela fazenda F5.

Piccolo et al. (2014) destaca que o conteúdo de gordura e proteínas são critérios de qualidade aplicado ao pagamento do leite aos produtores em muitos países onde o preço do leite é fixado de acordo com a composição. A proteína do leite bovino é de alta qualidade, contendo um bom equilíbrio de todos os aminoácidos essenciais. Nesta pesquisa, a média dos valores das proteínas nas fazendas é de 3,38g/100g, resultado próximo ao observado por Gonçalves et al (2020), que avaliou as “Características microbiológicas, celulares, físicas e químicas de leite cru refrigerado em Aparecida do Taboado-MS”, assim a média dos valores está dentro do exigido pela legislação atual.

Médias semelhantes no teor de proteínas, foram observados por Mendes et al (2015) para o leite refrigerado, em diferentes sistemas de ordenha: manual (3,23 g/100 g), balde ao pé (3,21 g/100 g) e canalizada (3,20g/100g), pesquisa realizada com produtores do município de Paracatu–MG.

Entretanto nos valores individuais, a fazenda F2 (2,8 g/100 g) apresenta diferença significativa no seu teor de proteínas em relação as fazendas F3, F4 e F5. Este valor pode estar relacionado à dieta dos animais, contudo o valor de proteína da amostra F2 é considerado normal, visto não ter havido diferença estatística entre o valor obtido e o estabelecido no regulamento.

Destaca-se que as proteínas representam cerca de 3,5% dos sólidos encontrados no leite. Essa porcentagem varia com a raça e é proporcional à quantidade de gordura presente no leite, assim, quanto maior a porcentagem de gordura no leite, maior será a porcentagem de proteína (WATTIAUX, 1995). Comparando os teores de gordura e proteínas encontrados nesta pesquisa e apresentados na tabela 3, observamos que o maior teor de proteína está na fazenda F3 (4,0), cujo teor de gordura é de 4,3. O teor de proteína do leite é economicamente importante porque o rendimento dos derivados, especialmente dos queijos é dependente destes componentes.

5.3 Qualidade microbiológica

A qualidade microbiológica pode ser um bom indicativo da saúde da glândula mamária do rebanho, das condições gerais de manejo animal e higiene da fazenda (TRONCO, 2013). Na tabela 3 encontram-se os resultados microbiológicos.

Tabela 3 - Quantificação microbiológica das amostras de leite cru de fazendas produtoras de leite no município de Bacabal/MA

AMOSTRA	Coliformes totais (NMP*/g)	Coliformes a 45°C (NMP*/g)	<i>Staphylococcus spp</i> UFC**/g	<i>Salmonella</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fazenda 1	2400	2400	$7,2 \times 10^2$	Ausência	Ausência
Fazenda 2	2400	240	$2,3 \times 10^4$	Ausência	Ausência
Fazenda 3	24.000	24.000	3×10^6	Ausência	Presença
Fazenda 4	24.000	24.000	$5,6 \times 10^4$	Ausência	Presença
Fazenda 5	24.000	24.000	$3,7 \times 10^7$	Ausência	Presença

Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2019.

*NMP – Número mais provável; **UFC – Unidade formadora de colônia

A contaminação do leite cru deve-se também a microbiota normal presentes na teta do animal, por isso não existe um padrão de contagem de coliformes totais e a 45 °C no leite cru na legislação vigente. Entretanto, sabe-se que valores elevados destes microrganismos podem ocasionar graves problemas para a saúde do consumidor, e ainda, a contagem destes microrganismos no leite cru serve para avaliar o grau de contaminação do próprio leite. Daí a preocupação com os dados apresentados na Tabela 3, pois as F3, F4 e F5 apresentam elevado valor desta contagem (24.000 NMP/g), tanto para coliformes totais, como a 45 °C, pois essa elevada contagem pode estar associada a fatores como microbiota natural do animal, higiene ou limpeza inadequadas dos utensílios utilizados durante a ordenha, falta de higiene pessoal dos ordenhadores e armazenamento do leite sem refrigeração.

Os valores de coliformes encontrados, justificam os resultados para a elevada acidez observada para as fazendas F4 e F5 (tabela 2), pois estes microrganismos são fermentadores da lactose convertendo-a em ácido lático, elevando a acidez do leite. Fator que também reflete no resultado da lactose, principalmente na fazenda F5, onde o teor de lactose está bem abaixo do exigido pela legislação vigente.

Quanto a quantificação dos microrganismos, Pereira et al. (2019) encontraram, para o leite *in natura*, valores de coliformes totais que variaram de 43 NMP/mL a 1100 NMP/mL em sua pesquisa “Avaliação microbiológica no leite de vaca *in natura* e pasteurizado comercializado na cidade de Tucuruí, Pará”, resultados inferiores a este trabalho, onde os valores foram de 24.000 NMP/mL. Tal contaminação, descreve os autores, ser resultado dos processos de manipulação do leite *in natura*, já que a população bacteriana do leite pode aumentar significativamente quando em contato com equipamentos nos quais a limpeza e sanitização são precárias, justificativa também condizente com os valores apresentados neste estudo.

Sandes et al (2016) avaliaram propriedades produtoras de leite no Recôncavo Baiano e reportaram que das 18 propriedades não mecanizadas pesquisadas, 90% apresentaram falhas nos procedimentos de higiene e limpeza antes da ordenha.

Durante a coleta, observou-se que as fazendas F1, F3 e F4 apresentam as melhores estrutura de produção do ambiente, contudo todas as fazendas apresentam pontos de contaminação principalmente nas condições de manipulação. As fazendas *F1 e F3*, possuem sistema de coleta semi-fechado sendo o leite ordenhado, canalizado por um tubo PVC até uma caixa de polietileno sem fechamento adequado podendo qualquer pessoa ter acesso as caixas (fazenda F1) – no momento da distribuição, esta caixa é aberta e ocorre a retirada do produto, com auxílio de um balde; e em latões (F3) que são transferidos para os recipientes dos revendedores. Na fazenda 4, sistema fechado de coleta, o leite é canalizado direto para o tanque de resfriamento, porém o ambiente de ordenha também não apresenta condições ideais de higiene. Assim, na maioria das fazendas, observa-se um leite exposto e sujeito a contaminação, devido as condições de manipulação, o que pode justificar a grande quantidade das bactérias do grupo coliformes.

Outra informação importante, é que do grupo coliforme fazem parte as espécies dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, além da *E. coli* (FORSYTHE, 2013). Das espécies encontradas neste estudo, observa-se que a *E. coli* está presente nas amostras de leite das fazendas F3, F4 e F5 e as espécies *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* na F1, estas identificadas através dos testes bioquímicos.

A *E. coli*, tem como habitat natural o trato intestinal de animais e homens, embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecal. Este microrganismo é um indicador de contaminação fecal em alimentos “*in natura*”. É uma bactéria Gram-negativa, não formadora de endósporos, anaeróbia facultativa que pode causar doenças em humanos em caso de infecção por linhagens patogênicas. As cepas patogênicas são divididas, de acordo com os sintomas clínicos e com os mecanismos de patogenicidade, em vários grupos que podem variar em seus períodos de incubação e duração da enfermidade (FORSYTHE, 2013; BELOTE, 2015; SILVA et al., 2010). Diante do exposto, a presença desta bactéria no leite das fazendas F3, F4 e F5 infere em práticas de higiene ineficientes ou contaminação fecal da água usada pelas fazendas e que podem causar problemas à saúde do consumidor caso o leite não passe por tratamentos adequados antes do consumo.

Sobre o gênero *Enterobacter*, Mezzatesta; Gona; Stefani, (2012, apud Duarte et al. 2019), relatam que as bactérias deste gênero possuem ampla disseminação, compondo a flora do trato gastrointestinal humano e animal e, por vezes, tornam-se agentes patogênicos

oportunistas. Estes autores, em seu estudo, detectaram a *E. aerogenes* como bactéria causadora de infecção mamária (mastite ambiental) e concluem que a ocorrência da doença é relacionada ao déficit de práticas de higiene eficientes, manejos inadequados e tratamentos errôneos, uma vez que o agente patogênico da enfermidade coexiste no mesmo ambiente dos animais, sendo necessária a adoção de boas práticas de produção e manejo, além de medidas profiláticas. Ressalta-se, que assim como a *E. coli*, suas cepas patogênicas podem causar enfermidades ao homem e indicar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

A *Klebsiella pneumoniae*, é um agente ambiental comum de mastite clínica e subclínica em rebanhos bovinos leiteiros e pode ser encontrado principalmente no produto final da ordenha, o leite. A mastite causada por esse agente patológico é considerada de intensa gravidade, devido à resistência do patógeno a antibióticos e uma rápida evolução para choque tóxico e morte do animal. A preocupação com a presença desta bactéria nas fazendas em estudo deve-se ao risco de enfermidades transmitidas ao homem. Cabe destacar que esta bactéria pode apresentar resistência a presença de antimicrobianos, e que pode justificar sua presença na fazenda F1, onde foi observada a presença de resíduo de antibióticos, assunto a ser discutido a diante (LANGONI et al., 2015, apud GASPAROTTO et al., 2016).

Quanto a presença de *Staphylococcus spp* no leite esta, normalmente, deve-se a fontes diversas como as mãos do ordenhador, equipamentos de ordenha e casos de mastite bovina. Segundo a FDA, a presença de *Staphylococcus* indica, ainda, risco de produção de enterotoxinas resistentes à pasteurização caso o leite não seja mantido à temperatura de refrigeração (ÂNGELO; BARBOSA e ARAÚJO, 2014).

Este estudo apresentou contagem média de *Staphylococcus spp.* de $8,02 \times 10^6$ UFC/mL, resultados superiores ao de Lamaita et al. (2005) que obteve contagem média igual a $3,99 \times 10^5$ UFC/mL no leite cru refrigerado. Isso pode ser explicado pela diversificação de sistemas de produção e de manejos utilizados pelos produtores, o que leva à maior ou menor contaminação do leite por *Staphylococcus spp.* devido à mastite e/ou por contaminação de retireiros portadores assintomáticos dessa bactéria e ineficiente refrigeração do leite imediatamente após a ordenha.

Tratando-se do leite cru não-refrigerado na maioria das amostras em estudo, exceto amostra F4, as altas contagens de *Staphylococcus* causam preocupação. Estes microrganismos são agentes etiológicos de intoxicações alimentares e também frequentes causadores da mastite bovina, e como são habitantes da pele humana, podem ser transferidos aos alimentos pela manipulação inadequada, ou também por aerossóis e perdigotos produzidos durante a fala, tosse e espirros dos manipuladores (BELOTI, 2015) e ainda podem ser resultado das práticas

deficientes de manejo, condições sanitárias e ambientais insatisfatórias. Diante do exposto, os valores apresentados neste estudo podem ser indícios da presença de infecção na glândula mamária por estas bactérias. Aliando a este fator podemos descrever nas fazendas o não uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) e equipamentos e utensílios antigos e que ficam expostos e ambientes que não atendem as exigências das boas práticas agropecuárias de forma completa.

A fazenda F4, mesmo com o leite sendo refrigerado após a ordenha também apresentou elevada contagem ($5,6 \times 10^4$ UFC/mL), principalmente sendo os *Staphylococcus* um grupo de bactérias mesófilas, este resultado reforça ainda mais a preocupação com as condições higiênicas-sanitárias em que este leite está sendo ordenhado nas fazendas do município de Bacabal/MA.

Quanto a caracterização das espécies de *Staphylococcus*, nesta pesquisa, foram identificadas espécies de SCN (Tabela 3) em todas as amostras, com destaque para presença da espécie a *Staphylococcus lentus* em todas as fazendas e para a fazenda F3 que apresentou maior número (4 espécies). Observou-se a presença de *Staphylococcus aureus* somente na Fazenda 5.

Tabela 4. Espécies de SCN e *Staphylococcus aureus* identificadas no leite cru de fazendas do município de Bacabal/MA

AMOSTRA	ESPÉCIES
Fazenda 1	<i>S. lentus</i> e <i>S. capitis</i>
Fazenda 2	<i>S. lentus</i>
Fazenda 3	<i>S. lentus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. caseolyticus</i> <i>S. cloosii</i>
Fazenda 4	<i>S. cloosii</i> e <i>S. lentus</i> e <i>S. caseolyticus</i>
Fazenda 5	<i>S. aureus</i> e <i>S. lentus</i>

Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2019.

De acordo com o trabalho de Shareef et al. (2019), *Staphylococcus lentus* é um membro da família *Staphylococcus sciuri*, uma bactéria comum no ambiente, pode ser detectada a partir de uma diversidade de animais (domésticos, agrícolas e animais selvagens). É uma bactéria comensal que colonizam a pele de muitos animais. Tem sido amplamente detectada a partir de animais que produziram alimentos envolvendo aves domésticas e gado, e dos seus produtos. Os

autores descrevem que, nos animais leiteiros, o *S. lentus* mostrou estar ligado a mastite subclínica e pode levar a grandes perdas em caso de infecções generalizadas.

A presença de *S. lentus* em todas as fazendas chama atenção para o fato desta ser uma bactéria do ambiente e que se demonstra frequente na produção leiteira do município de Bacabal, ou seja, já faz parte da microbiota da região podendo ser uma das causas mais frequentes de casos de mastite, entretanto estudos mais detalhados tornam-se preponderantes para uma afirmação desta natureza.

Ressalta-se que segundo os estudos de Mazal e Sieger (2010), pouco se sabe sobre *S. lentus* e existe apenas um relato de infecção humana, entretanto este microrganismo é um patógeno que merece atenção. Esta bactéria é relatada na literatura como produtora de enterotoxina, sendo sua presença no leite causa de preocupação para a saúde pública.

Das outras espécies isoladas nesta pesquisa, as espécies *S. capitis* (F1), *S. xylosus* (F3), *S. cloosii* (F3) correspondem a 20% das espécies isoladas e *S. caseolyticus* (F3 e F4) correspondem a 40%.

Nos estudos de Santos et al. (2011), por exemplo, foram coletadas amostras de leite de 1.645 quartos mamários individuais acometidos pela mastite (238 de casos clínicos e 1.407 de casos subclínicos) para análises microbiológicas e 120 cepas de SCN foram isoladas, dentre as quais 15 eram de *S. lentus*, representando 12,5% do total de cepas isoladas, 01 de *S. capitis* (0,8%).

Em relação aos SCP, Santana et al. (2010) estudaram 51 propriedades em Londrina (PR) e 50 em Pelotas (RS), com o objetivo de determinar a população de estafilococos coagulase-positivos (UFC/mL) em leite e verificaram que de 101 amostras de leite cru, 19 (18,8%) apresentaram contagens acima de 105 UFC/mL, mas nenhuma das amostras apresentaram enterotoxina detectável no leite. Os autores concluem haver extensa contaminação do leite cru por SCP, embora a maioria das colônias isoladas não fossem enterotoxigênicas ou não expressassem esta característica. Já Sandes et al. (2016), não detectaram a presença de SCN em amostras de leite provenientes de ordenha mecanizada e não mecanizada.

Quanto a presença de *S. aureus*, Zafaloni et al. (2008) descrevem a grande importância deste microrganismo para a qualidade do leite, uma vez que é causa de inflamações da glândula mamária (mastite). Mesmo com os cuidados de controle animal e redução da mastite, esta bactéria possui outras fontes de contaminação oriundas do manipulador ou pele do animal, por equipamentos e utensílios higienizados de forma incorreta, ou pelas más condições higiênico-sanitárias do local de obtenção.

Neste estudo, detectou-se a presença de *S. aureus* somente na amostra F5. Já estudos de Singh e Prakash (2010), confirmaram a presença de *S. aureus* em leite cru de vacas em 42 de um total de 64 amostras, e destas 25 foram confirmados como patogênicos.

Pesquisa realizada por Ângelo; Barbosa e Araújo, (2014) no leite cru proveniente de tanques de expansão comunitária revelam que em todos os tanques avaliados (sete no total) foram isolados SCP. Os autores explicam que contagens superiores a 10^3 UFC /mL foram encontradas em cinco tanques de expansão refrigerados, e destes cinco, três ainda apresentaram contagens superiores a 10^5 UFC /mL, e relatam serem estes níveis alarmantes, visto que vários estudos têm demonstrado a capacidade de produção de enterotoxinas por *Staphylococcus spp.* por mecanismos de detecção de quórum nas quantidades populacionais encontradas no referido estudo. Esta alta pontuação indica problemas de contaminação de SCP no processo de ordenha, e também um indicativo de animais com mastite. Neste caso, os valores apresentados de *Staphylococcus spp* apresentados na tabela 3 para a fazenda F5 ($3,7 \times 10^7$), demonstram níveis mais alarmantes e preocupantes, visto que os valores são superiores aos apresentados pelos autores.

Com relação a grande contaminação microbiana do leite, Sá et al. (2018) concluem, em pesquisa sobre os principais microrganismos causadores da mastite bovina, que entre os principais microrganismos que atuam na mastite bovina estão os *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e o conhecimento destes, podem ser uma importante ferramenta para prevenção e controle da mastite bovina; conseqüentemente para a qualidade do leite.

Sabemos, entretanto, que o tratamento térmico reduz a maior parte das bactérias patogênicas, podendo este fato reduzir o risco de contaminação do consumidor ao usar a fervura antes de consumir o leite.

A prática de fervura doméstica compara-se à pasteurização, com o objetivo principal de eliminar os possíveis microrganismos patogênicos contaminantes do leite, sendo capaz de eliminar apenas as formas vegetativas de microrganismos, não sendo eficaz contra formas esporuladas altamente resistentes ao calor. É de extrema importância incorporar práticas de prevenção de contaminação do crescimento bacteriano na cadeia produtiva do leite, como a higienização das glândulas mamárias dos animais e das mãos dos ordenhadores, o cuidado com o armazenamento e com o transporte deste alimento, contribuindo assim para a melhoria da qualidade do leite comercializado na cidade. (ABREU e MOÉSIA, 2017, p. 03).

Entretanto, mesmo com a redução das bactérias patogênicas pela fervura do leite, não podemos esquecer a preocupação com a presença enterotoxinas que estes microrganismos podem produzir. Os *Staphylococcus*, por exemplo, produzem toxinas altamente termoestáveis

e resistentes a cocção, sendo que uma dose de toxina menor que 1,0 µg/Kg em alimentos contaminados poderá produzir sintomas de intoxicação por estafilococos (FORSYTHE, 2013).

Neste caso, seria necessário um controle do leite desde a produção até o consumo para minimizar os riscos que a má qualidade do leite pode gerar para a saúde da população. O melhor seria o consumo do leite pasteurizado com controle pós-tratamento térmico que avalie a presença destas enterotoxinas.

5.4 Análise da presença de resíduo

Os testes da presença de resíduo, ocorreu de forma quantitativa e indicaram que somente a fazenda F3 está livre de antibióticos, o que implica em um correto manejo de medicamentos administrados aos animais, obedecendo o período de carência exigido por cada antibiótico para os animais em lactação. A tabela 5, apresenta os resultados deste teste.

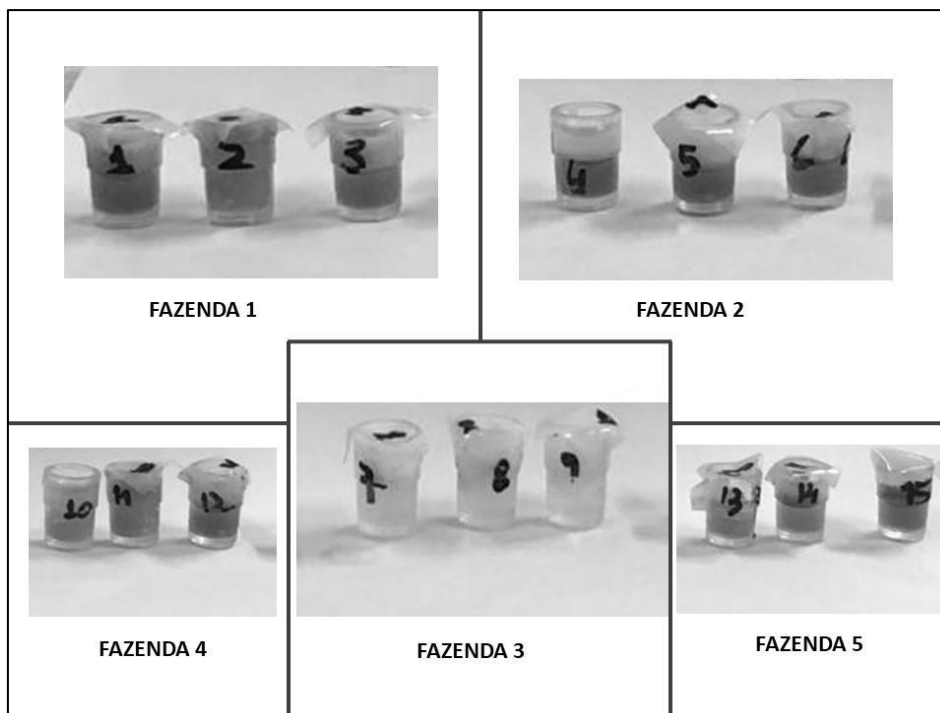
Tabela 5 - Resultado da avaliação da presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite bovino cru de propriedades do município de Bacabal/MA

AMOSTRA	COLORAÇÃO	RESULTADO
F1	Roxo	+
F2	Roxo	+
F3	Amarelo	-
F4	Roxo	+
F5	Roxo	+

Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2020.

Na análise para detecção de resíduos de antibióticos, das cinco amostras analisadas, quatro tiveram resultado positivo, indicando presença de resíduos de antimicrobianos acima dos limites permitidos pela legislação em 80% das fazendas investigadas (tabela 5). Destaca-se, na amostra F3, única amostra negativa para a presença de resíduos, uma rápida mudança de coloração, iniciada assim que adicionada ao reagente e intensificou com o banho maria antes mesmo das duas horas, as demais apresentaram uma cor de transição entre o roxo e o amarelo (figura 4).

Figura 4 – Resultado do Teste de detecção de resíduos de antibióticos do leite de propriedades do município de Bacabal/MA: amostras positivas (roxo) e negativa (amarelo).



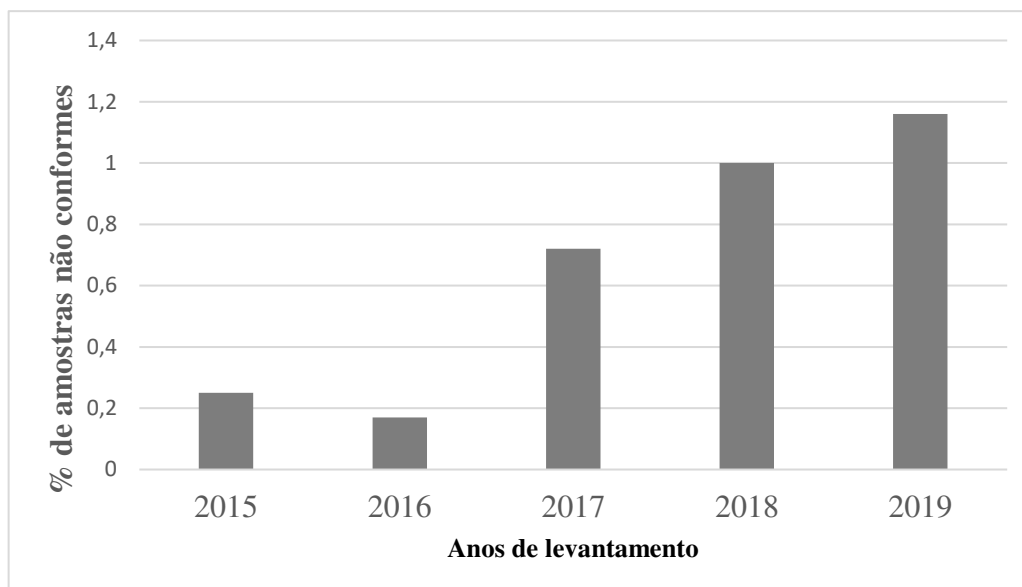
Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2020.

Este alto percentual de amostra com resíduos de antibióticos está acima do encontrado em outros resultados. Carvalho et al. (2012), analisaram 18 amostras de leite cru colhidas em propriedades de pequeno e médio porte da zona rural de Araiões – MA, e detectaram que 100% das amostras foram negativas para resíduos de antibióticos, utilizando o Devotest SP, um método de inibição de crescimento bacteriano que investiga as mesmas classes de antibióticos deste estudo.

Souza et al. (2017), também utilizando o teste kit ECLIPSE 50®, analisaram 112 amostras de leite bovino cru em seis municípios do Rio Grande do Norte e verificaram resultado positivo para resíduo de antimicrobianos em 6,72% das amostras.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), atendendo ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC /Animal, realiza de forma ativa teste em ovos, leite e mel encaminhados para processamento e animais encaminhados para abate em estabelecimentos sob Inspeção Federal. Estes testes incluem a detecção do atendimento de limites aplicáveis a drogas veterinárias autorizadas. Na figura 5 podemos verificar os resultados deste teste para o leite dos anos de 2015 a 2019. Observa-se um aumento significativo de amostras não-conforme, ou seja, com presença de resíduo, no ano de 2019.

Figura 5 - Resultado da detecção de resíduos de antimicrobianos no leite cru acima do limite máximo de resíduos (LMR) em estabelecimentos sob Inspeção Federal realizado pelo MAPA entre 2015 e 2019



Fonte: Compilação dos resultados dos relatórios do PNCRC/ANIMAL (MAPA, 2020).

Nota-se na figura 5 que a persistência de resíduos de antimicrobianos no leite cru é um problema que afeta todo o país, assim como o resultado encontrado neste trabalho, mesmo que existam normas reguladoras para a qualidade do leite cru.

Pesquisa de resíduos de antibióticos também tem sido feita no leite processado termicamente. Sousa et al. (2012) encontraram resultado positivo em 13,33% das 30 amostras de leite pasteurizado tipo C provenientes de municípios da região do Cariri, o que evidencia a persistência desses contaminantes mesmo após o processamento trazendo risco à saúde do consumidor.

Em relação aos efeitos na saúde, a presença de resíduos de antibióticos de uso veterinário no leite bovino pode levar a uma resistência bacteriana em humanos (RODRIGUES, 2013; SALES, ROCHA e BRESSAN, 2015), pois há a possibilidade de transferência dessa resistência entre bactérias, mesmo que sejam de espécies diferentes; efeitos toxicológicos diretos destas substâncias; reações alérgicas em consumidores sensíveis, que podem causar desde reações cutâneas e gastrointestinais até mesmo um choque anafilático; efeito teratogênico (metronidazol, rifampicina, trimetropina, estreptomicina e tetraciclina) (SALES, ROCHA e BRESSAN, 2015); desequilíbrio da microbiota intestinal, principalmente em crianças abaixo de um ano de idade (SILVA, SILVA e RIBEIRO, 2012).

Os prejuízos à indústria de alimentos decorrentes da persistência desses contaminantes incluem inibir culturas utilizadas na produção de produtos (SALES, 2015), com isso a qualidade

final do produto é alterada, com produção de odores e sabores desagradáveis (RODRIGUES, 2013) e impedindo a manutenção do padrão de identidade e qualidade dos produtos (SILVA, SILVA e RIBEIRO, 2012). Além disso, influenciam nos testes de qualidade do leite (SALES, 2015) e, portanto, mesma em quantidades pequenas, a presença de antibióticos no leite gera perdas na produção de laticínios e prejuízo à indústria de alimentos (SILVA, SILVA e RIBEIRO, 2012).

5.5 Resistência antimicrobiana das cepas de *Staphylococcus* isoladas do leite de propriedades produtoras no município de Bacabal/Maranhão – Brasil.

Segundo a FAO (2016), os antimicrobianos desempenham um papel fundamental para a saúde animal e para segurança alimentar. Entretanto, o uso indevido dessas drogas associado ao surgimento e disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, coloca todos em grande risco, pois o aumento da resistência ameaça a saúde humana e animal, e prejudica a segurança dos nossos alimentos e do meio ambiente.

Diante da preocupação com a resistência aos antimicrobianos, este estudo selecionou bactérias do gênero estafilococos para a avaliação da resistência antimicrobiana em amostras de leite, sendo isolada uma espécie identificada em cada propriedade: F1 – *S. capitis*; F2 – *S. lentus*; F3 – *S. xylosus*; F4 - *S. lentus*; F5 – *S. aureus*. Os padrões de sensibilidade e resistência utilizados são descritos na tabela 6.

Tabela 6 - Valores dos halos de inibição esperados para *Staphylococcus spp*

Agente	Abv	Discos	Halos de inibição (mm)		
			R	I	S
Ampicilina *	AMP	10µg	≤28	-	≥29
Cefalotina *	CFL	30µg	≤14	15-17	≥18
Cloranfenicol	CLO	30µg	≤12	13-17	≥18
Eritromicina	ERI	15µg	≤13	14-22	≥23
Gentamicina	GEN	10µg	≤12	13-14	≥15
Penicilina	PEN	10 UI	≤28	-	≥29
Oxacilina*	OXA	1µg	≤17	-	≥18

Fonte: CLSI (2020); *SOARES (2010).

A resistência dos estafilococos aos antimicrobianos é extremamente difundida em todas as partes do mundo, no meio comunitário, mostram elevada resistência (acima de 80%) às

penicilinas G e V, a ampicilina e a amoxicilina (TAVARES, 2007). A classificação dos perfis de sensibilidade e resistência, observada neste estudo encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Classificação da resistência a 7 antibióticos das espécies de SCN e *S. aureus* isoladas do leite cru em propriedades de Bacabal/MA.

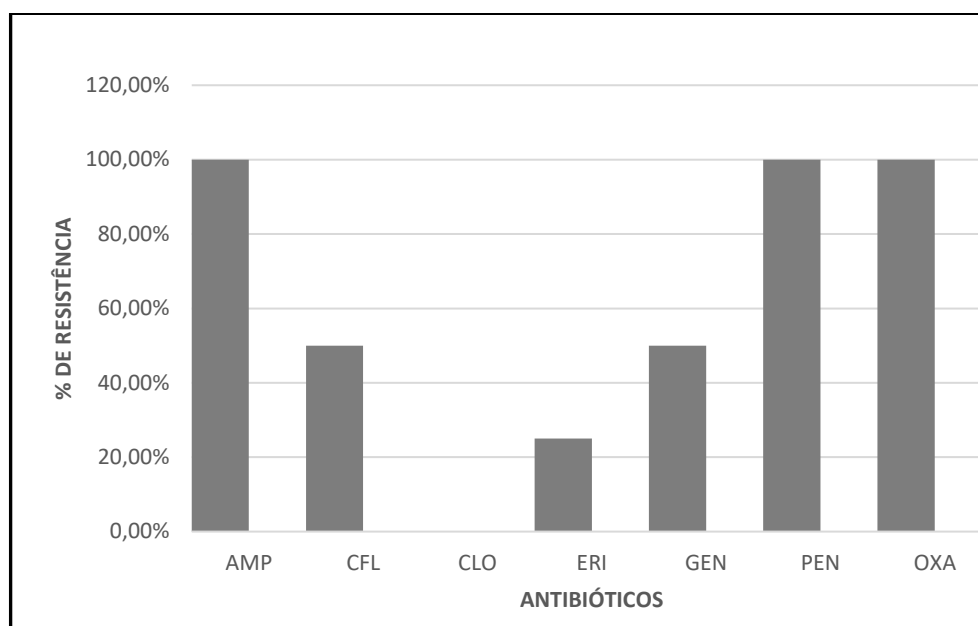
CLASSE	ANTIBIÓTICOS	CEPAS			
		<i>S. capitis</i> (F1)	<i>S. lentus</i> (F2 e F4)	<i>S. xylosus</i> (F3)	<i>S. aureus</i> (F5)
β -lactâmicos	Ampicilina (10 μ g)	R	R	R	R
Cefalosporinas	Cefalotina (30 μ g)	S	I	R	R
Fenicol	Cloranfenicol (30 μ g)	S	S	S	S
Macrolídeos	Eritromicina (15 μ g)	R	S	I	I
Aminoglicosídeo	Gentamicina (10 μ g)	S	S	R	R
β -lactâmicos	Penicilina G (10U).	R	R	R	R
β -lactâmicos	Oxacilina 1 μ g	R	R	R	R

Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2020; **Sensível (S); Intermediário (I); Resistente (R)**

Neste estudo, observou-se 100% de resistência das cepas para a ampicilina, penicilina e a oxacilina., em sequência temos a cefalotina e a gentamicina, ambas com 50% e a eritromicina com 25% (Figura 6) Observou-se sensibilidade de 100% das cepas para cloranfenicol, 50% para a gentamicina e 40% para a eritromicina.

Resultados encontrados por Zuniga (2017), ao avaliar a sensibilidade e resistência de *Staphylococcus spp* isolados de leite de bovinos com mastite clínica, descrevem a gentamicina e a oxacilina com elevada sensibilidade (91,2 e 93% respectivamente). Tais valores observados para a gentamicina corroboram com este estudo quanto a presença de sensibilidade, mas os resultados para a oxacilina divergem completamente, visto que encontramos resistência de todas as cepas. O autor, ainda relata maiores índices de resistência (42,1%) para a amoxicilina, ampicilina e penicilina. Já nos estudos de Kurosawa et al (2020), a penicilina teve uma maior porcentagem de amostras que apresentaram resistência bacteriana (34,5%), seguida da oxacilina (20,69), já a gentamicina foi a que apresentou maior sensibilidade (96,5%).

Figura 6 – Porcentagem de resistência dos 7 antibióticos estudados frente as das cepas de SCN e *S. aureus* isolados do leite cru das propriedades do município de Bacabal/MA.



Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2020.

Zanette et al. (2010) descrevem que os estafilococos isolados de leite de vacas com mastite quase sempre apresentam altos índices de resistência à penicilina. Quanto a aquisição dessa resistência, Tavares (2007) descreve ter sido adquirida principalmente pela transdução de plasmídeos e ocorre devido a produção de β -lactamases que inativam o antibiótico. Essa resistência à penicilina foi detectada logo após o início de seu uso na década de 40.

Diversos estudos descritos na literatura apontam a elevada suscetibilidade antimicrobiana ao grupo betalactâmicos. Os estudos de Zimmermann e Araújo (2017) reportam resistência a penicilina de 47,82%, os estudos Noel et al. (2016) retratam 99,5% de resistência e Costa et al (2013) descrevem valores de 80,45%.

Para Zimmermann e Araújo (2017) a resistência destes microrganismos aos antimicrobianos do grupo dos betalactâmicos penicilina deve-se ao fato de produzirem betalactamases, permitindo que tenha a capacidade de cindir o anel betalactâmico da estrutura do antimicrobiano, caracterizando-se no principal mecanismo de resistência.

Um dos marcadores de resistência dos estafilococos é a sua resistência à oxacilina (ou meticilina), cuja identificação pode ser feita pelo uso de oxacilina ou cefoxitina, apesar do método de referência para verificar esta resistência ser a detecção molecular do gene *mecA* (MACHADO E GALES, 2008).

Segundo Soares (2010), a resistência estafilocócica à oxacilina está associada à alteração do sítio de ação do antibiótico pela produção de uma proteína adicional ligadora à

penicilina (PBP2a), codificada pelo gene estrutural *mecA*, o qual está contido no determinante *mec*, portado por um elemento genético móvel designado cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*), altamente conservado entre as espécies de estafilococos. Além disso, os estafilococos podem tornar-se resistentes através da produção da beta-lactamase, uma enzima extracelular codificada por plasmídeos, decorrente da hidrólise do anel beta-lactâmico após a exposição do microrganismo ao antibiótico.

O Manual de Antibiograma (LABORCLIN, 2019), descreve que os estafilococos oxacilina-resistentes são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos. Desta forma, a sensibilidade ou resistência a antibióticos beta-lactâmicos de largo espectro é deduzida partindo-se do teste com penicilina e oxacilina, não sendo necessário testar outros beta-lactâmicos.

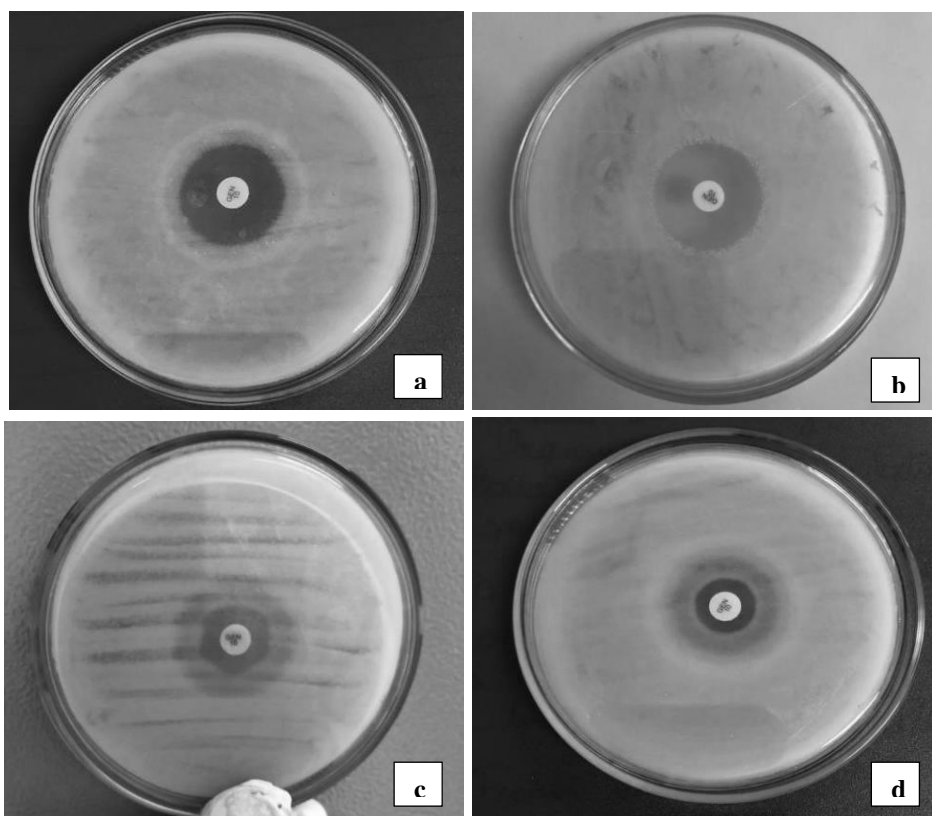
De acordo com o CLSI (2020) o perfil de sensibilidade ou resistência a oxacilina deve ser reportada com base no teste de cefoxitina, devendo reportar a sensibilidade ou resistência da oxacilina baseada no teste de cefoxitina, como, neste estudo, os testes ocorreram direto com a oxacilina para caracterizar o perfil de resistência das cepas estudadas utilizou-se o padrão descrito por Soares (2010). Este explica que a cefoxitina apresenta maior especificidade e sensibilidade equivalente a oxacilina, assim a melhor maneira de determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados à cefoxitina é através da técnica da difusão em disco e/ou microdiluição em caldo enquanto para a oxacilina é o teste da Concentração Inibitória Máxima (CIM). O teste com disco de cefoxitina, quando comparado com os testes de CIM com oxacilina, possui idêntica sensibilidade, mas maior especificidade, sendo, portanto, mais preciso na identificação da resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus*.

Este estudo apresentou resistência à oxacilina em todas as cepas de SCN avaliadas, assim como para a cepa de *S.aureus*. Soares (2010) observou resultado contrário a este estudo para os SCN, ou seja, os isolados testados apresentaram maior sensibilidade à oxacilina (71%). Essa resistência observada pode indicar uso incorreto na administração deste antibiótico no tratamento dos animais. Para o *S. aureus* os estudos de Costa et al. (2013) sobre “Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais”, não observou resistência deste microrganismo ao antibiótico em questão, resultado também contrário a este estudo.

Para a gentamicina observamos igual porcentagem de resistência e sensibilidade (50%). As espécies de *S. lentus* e *S. capitis* apresentaram sensibilidade (figura 7) e as espécies de *S. aureus* e *S. xylosus* resistência. Usada no tratamento da mastite bovina, este antibiótico apresenta um papel destacado no tratamento desta infecção. Estes agentes se ligam aos

ribossomos, interferindo na síntese protéica. A resistência aos aminoglicosídeos está associada a modificações nos grupamentos amino ou nos grupos hidroxila e com isso perdem a habilidade de se ligar ao ribossomo, não inibindo a síntese protéica. Além das enzimas modificadoras de aminoglicosídeo, sistema de efluxo e mutações no rRNA têm sido descritos (SOARES, 2010).

Figura 7 – Halos de inibição para a Gentamicina apresentados pelas espécies de SCN e *S. aureus* isoladas do leite de propriedades do município de Bacabal/MA.



Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2020.

a - *S. lentus* (17mm), **b** - *S. capitis* (20mm), **c** - *S. aureus* (11 mm), **d** - *S. xylosus* (12 mm).

No tocante a eritromicina, destaca-se ser um antibiótico pertencente ao grupo dos macrolídeos cujo mecanismo de ação está ligado à inibição da síntese proteica bacteriana pela ligação da droga à porção 50S dos ribossomos bacterianos. Possui baixo espectro de ação na maioria dos bacilos Gram-negativos e algumas cepas de *Staphylococcus* já apresentam elevado grau de resistência. Além da resistência bacteriana provocada pela exposição contínua, a eritromicina está associada a problemas gastrintestinais graves (PAMVET, 2009).

Os resultados para a eritromicina demonstram 25% de resistência (*S. capitis*) e sensibilidade (*S. lentus*). No trabalho de Soares (2010), foi observado 72% de sensibilidade à eritromicina em espécies de SCN, resultados maiores ao deste trabalho, onde observou-se

33,33% de resistência entre as cepas de SCN. Pesquisa realizada por Kurosama et al (2020) observaram resistência à eritromicina nos *Staphylococcus spp* em 17,24% dos isolados.

O cloranfenicol pertence aos fenicóis, classe de antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese dos polipeptídeos bacterianos. É um antibiótico de amplo espectro e altamente efetivo. Sua utilização em todo mundo tem sido reavaliada devido a sua associação com anemia aplástica em indivíduos expostos, ainda que em baixos níveis de concentração. O uso de cloranfenicol em animais produtores de alimentos está proibido no Brasil, nos Estados Unidos, na União Européia e em outros países (PAMVET, 2009). No Brasil, esta proibição decorre desde 2003, pois este antimicrobiano pode levar a alterações no equilíbrio da microbiota intestinal, seleção de bactérias resistentes no sistema digestório dos consumidores, multirresistência entre microrganismos através de transferência de plasmídeos e efeitos colaterais secundários (PEREIRA E SCUSSEL, 2017).

De acordo com o exposto, e sendo o cloranfenicol o único antibiótico que apresentou sensibilidade em 100% das cepas em estudo, sugere-se que tal grau de sensibilidade seja devido ao cumprimento das recomendações de não uso deste antibiótico no tratamento animal pelas propriedades deste estudo.

Os resultados para a cefalotina demonstram resistência em 50% das espécies isoladas. Este antibiótico pertence a classe das cefalosporinas de primeira geração, assim denominadas por seu espectro de ação antimicrobiana mais estreito, atuando predominantemente sobre bactérias Gram-positivas. São ativas, também, contra *Staphylococcus spp.* produtores de penicilinase (BITTENCOURT, 2017).

No perfil de resistência e sensibilidade de cepas de *S. aureus* em amostras de leite estudadas por Kaiser et al (2014) a cefalotina demonstrou-se eficaz, ou seja, houve maior sensibilidade a este antimicrobiano, classificação que diverge deste estudo, pois o *S. aureus* apresentou resistência. Já das espécies isoladas (n=207) por Noel et al. (2016), verificou-se índices de resistência em *Staphylococcus spp.* inferiores a 20% para cefalotina, e descrevem que esse baixo percentual de resistência detectado indica possibilidade de tratamento das infecções intramamárias.

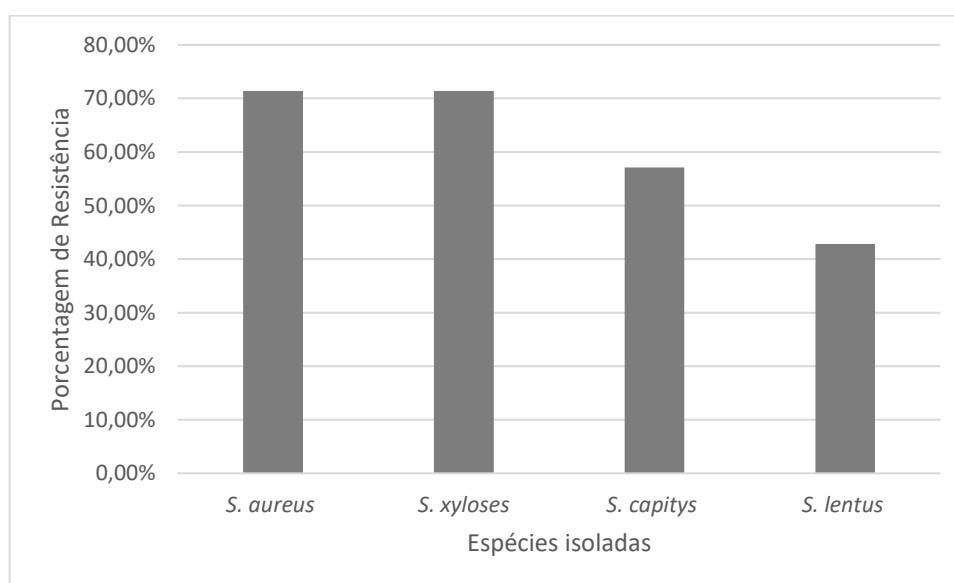
A ampicilina, neste estudo, apresentou resistência em todas as espécies estudadas. Este antimicrobiano é uma penicilina semi-sintética e compartilha o mesmo mecanismo de ação como a outras penicilinas, ou seja, é bactericida e interfere na parede celular das bactérias (MELO et al., 2012). Sobre o perfil de suscetibilidade deste antimicrobiano, nos estudos de Rios et al (2020) sete (n=16) das cepas submetidas ao TSA, foram resistente a ampicilina (43,7%), resultados semelhantes ao observado nesta pesquisa. Contudo, nos estudos de Soares

et al. (2012), ao tratar da resistência dos SCN frente a esse antimicrobiano, descreve um perfil de resistência de 79%. Já, no trabalho de Martini (2015), de 266 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, 177 (66,5%) amostras foram resistentes à ampicilina, resultados que, também, corroboram com esta pesquisa.

Com relação aos *S. aureus*, microrganismo relatado na literatura como resistente a uma elevada gama de antibióticos, e também neste estudo. Costa et al. (2013) relata que o monitoramento desta resistência é de suma importância, pois o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no incremento das taxas de resistência. Tal conduta minimiza falhas terapêuticas e os riscos de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, problemas bastante atuais nos campos da saúde humana e animal.

Discutindo o perfil de multirresistência das espécies aqui estudadas a figura 8, demonstra a porcentagem de resistência das espécies aos antibióticos.

Figura 8 – Porcentagem de resistência das cepas de SCN e *S. aureus* isolados do leite cru de propriedades do município de Bacabal/MA aos antimicrobianos estudados



Fonte: Autoria própria, dados da pesquisa, 2020.

Silva (2017) descreve que um microrganismo é comumente caracterizado como multirresistente quando apresenta resistência a duas ou mais classes de antibióticos. Os microrganismos elaboram mecanismos de resistência a partir de suas estruturas e mecanismos regulatórios, além dos múltiplos genes de resistência que estão na base de seu acervo de defesa. Por isso, há necessidade de se conhecerem quais são esses mecanismos e que tipos de resistência

possuem para se pensar em produzir qualquer ação contra esses microrganismos e estabelecer um controle efetivo.

Os valores de IRMA observados foram de 0,71 para *S. aureus* e *S. xylosum*, 0,42 para *S. capitis* e 0,14 para os *S. lentus*. Demonstrando um percentual de multirresistência elevado entre as espécies do estudo. As espécies *S. aureus* e *S. xylosum* foram as espécies que apresentaram resistência a 5 dos sete antibióticos estudados (AMP, CFL, GEN, PEN e OXA), representando um percentual de resistência a 71,43% dos antibióticos cada um, a espécie *S. capitis* apresentou resistência a 4 antibióticos (57,14%), sendo eles AMP, ERI, PEN e OXA já o *S. lentus* apresentou resistência a 3 antibióticos (AMP, PEN e OXA), representando apenas 42,86%.

Destaca-se que os *S. aureus*, tem sua resistência aos antimicrobianos observada em decorrência de mutações genéticas ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou até mesmo de espécies diferentes. As bactérias possuem plasticidade genética, ou seja, tem a capacidade de evoluir em resposta ao ambiente e às pressões seletivas (BOTELHO, 2017). Essa versatilidade aliada a multirresistência agrava ainda mais a dificuldade de tratamento de infecções por estes microrganismos (SILVA, 2017).

No tocante a resistência das espécies de SCN a antimicrobianos, Santos et al. (2011) destacam que o percentual de multirresistência revelado pelos diferentes isolados estudados foi bastante reduzido, verificando-se que 55,1% deles foram sensíveis a todas as bases testadas e que somente 13,0% das mesmas apresentaram índice IRMA maiores que 0,20. Resultados contrário ao nosso estudo, onde os SCN apresentaram IRMA maiores de 0,20 em 50% das espécies.

Sobre pesquisas realizadas no estado do Maranhão quanto a multirresistência aos antimicrobianos, Silva et al (2019), avaliaram o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de seis cepas bacterianas patogênicas, isoladas de leite cru do estado do Maranhão (*Acinetobacter septicus*, *Hafnia alvei*, *Lactococcus garvieae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pantoea spp.* e *Klebsiella spp.*) e observaram que todas apresentaram sensibilidade a pelo menos cinco tipos de antimicrobianos pesquisados. Os autores ressaltam que é importante controlar a presença desses microrganismos durante a ordenha, armazenamento, transporte e beneficiamento do leite, através de boas práticas de higiene durante a ordenha nas propriedades rurais e de fabricação nas indústrias de laticínios. Além disso, órgãos de fiscalização e vigilância epidemiológica em saúde devem atuar continuamente para coibir o comércio de leite e derivados crus e conscientizar os consumidores e comerciantes sobre os riscos relacionados ao consumo desses produtos crus.

6 CONCLUSÃO

O leite bovino cru oriundo de propriedades produtoras de leite no município de Bacabal/MA, de forma geral, encontra-se nos padrões exigidos pela legislação quanto as características físico-químicas e microbiológicas.

Entretanto, o grande percentual de amostras com resíduos de antibióticos (80%) oferece risco à saúde dos consumidores. Considerando que, nesta pesquisa, fez-se somente uma avaliação quantitativa da presença de resíduos, estudos qualitativos são necessários para que se identifique as classes destes resíduos.

Diante dos resultados observados, a presença de resíduos reflete as falhas na administração de antimicrobianos utilizados pelas propriedades em estudo, fato comprovado pela elevada resistência das espécies aos antibióticos estudados e do fenômeno da multirresistência observado, fator que prejudica a eficácia dos tratamentos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados, aqui obtidos, devem ser motivo de preocupação para autoridades sanitárias e laticínios, pelo risco que pode causar à saúde do consumidor e os prejuízos na produção de derivados lácteos.

Faz-se necessário fomentar ações educativas aos produtores com orientações sobre o uso das Boas Práticas de Fabricação (BPF), da adoção de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e cuidados com a manipulação dos equipamentos e utensílios utilizados na ordenha, além, dos riscos do uso irracional dos antibióticos.

No tocante à saúde e orientação do consumidor, é preponderante orientá-los sobre os cuidados básicos com o leite adquirido como a refrigeração e a fervura, este segundo, importante para reduzir a carga de microrganismos patogênicos.

Novos estudos que caracterizem o perfil das propriedades quanto a qualidade do leite e sistemas de ordenha utilizado, a qualidade da água e higiene dos equipamentos e utensílios, e ainda a utilização de antibióticos, são necessários para obter um amplo espectro que estas propriedades apresentam a fim de que medidas de controle de qualidade sejam adotadas visando reduzir os riscos que o leite pode acarretar.

REFERENCIAS

- ABREU, Dandara Dias Cavalcante; MOÉSIA, Renelita da Rocha. Análise microbiológica do leite bovino não industrializado comercializado na cidade de Cajazeiras, Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.12, n. 3, p. 629-633, 2017.
- ADZITEY, Frederick; SABA, Courage Kosi Setsoafia; TEYE, Gabriel Ayum. Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Milk and Hands of Milkers in Nyankpala Community of Ghana. **Current Research in Dairy Sciences**, 8: 6-11. 2016.
- AGNESE, A. P. et al. Avaliação físico-química do leite cru comercializado informalmente no Município de Seropédica – RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n. 94. p. 58-61, 2002.
- AKEJU, Tolutope. Enumeration of coliform bacteria and characterization of *Escherichia coli* isolated from Staff Club swimming pool in Ile-Ife, Nigeria, 2015. **bioRxiv** 018127; doi: <https://doi.org/10.1101/018127>.
- ANDRADE, Nélio José de. Higiene na Indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008.
- ÂNGELO, Fabíola Fonseca; BARBOSA, Allan de Oliveira; ARAÚJO, Tatiane Ferreira. Staphylococcus coagulase positivo isolado de leite cru de tanques comunitários. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. Semestral. Ano XII- n°22 – janeiro de 2014.
- ANIKA, T.T et al. Time dependent screening of antibiotic residues in milk of antibiotics treated cows. **J. Adv. Vet Anim Res**, 2019; 6(4):516–520.
- ANJOS, D. A. dos.; LIMA, F. S.; Neto, J. M. da S.; SOUSA, M. C. de. Quantificação do teor de proteínas e lactose do liofilizado do leite de cabra. In: 5º Encontro Regional de Química & 4º Encontro Nacional de Química. **Anais**. Blucher Chemistry Proceeding. vol. 3 num. 1, nov. 2015.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RM Controle 2007 - Medidas de prevenção e controle da resistência microbiana e Programa de Uso Racional de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. MÓDULO 1. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm. Acesso em: 22 jul. 2020.
- _____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal**. Documento. Gerência de Avaliação de Risco e Eficácia - GEARE Gerência Geral de Alimentos – GGALI. Brasília, 2018.
- ARAÚJO, G. B. et al. Detecção de resíduo de antibiótico em leite in natura em laticínio sob inspeção federal. **Scientia Plena**. v. 11, n. 04. 2015.
- _____. W. M.C.; MONTEBELLO, N. di P.; BOTELHO, R. B. A.; BORGIO, L. A. **Alquimia dos alimentos**. 3. ed. – Brasília: Editora Senac-DF, 2016.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 775-790, abr. 2012.

BARBOSA, Homero Perazzo, et al. Caracterização físico-química de amostras de leite in natura comercializados no estado da Paraíba. **Rev. Ciênc. Saúde Nova Esperança** – Dez. 2014;12(2).

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**. 1966 Apr;45(4):493-6. PMID: 5325707

BELOTI, Vanerli (Org.). **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Planta, 2015. 417 p.

BEZERRA, A. S.; SANTOS, M. A. Souza dos; REBELLO, F. K.; FREITAS, A. C. R. de; SENA, A. L. dos S. Comportamento da produção e dos preços de leite bovino no estado do Maranhão. **Revista Nucleus Animalium**, v. 9, n.1, nov. 2017.

BITTENCOURT, Fabiana Santos Silva. **Avaliação de desempenho e validação de ensaios analíticos qualitativos comerciais para triagem de resíduos de antimicrobianos em leite cru**. Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2017. 93 p.

BORGES, Maria de Fatima, et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Rev. Ciência Rural**, v.38, n.5, ago, 2008.

BOTELHO, Clarisse Vieira. **Staphylococcus coagulase positiva e Staphylococcus aureus: Resistentes a antibióticos em cadeia produtiva de carne suína**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais. 2017.

BRASIL, Rafaella Belchior et al. Avaliação da qualidade do leite cru em função do tipo de ordenha e das condições de transporte e armazenamento. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, nov/dez, nº. 389, 67: 34-42, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 2006.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 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. Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 76, de 26 de novembro de 2018. **Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A.** Diário Oficial. Brasília, DF, 30 nov. 2018. Seção 1, p. 9.

_____. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa n° 77, de 26 de novembro de 2018. **Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial.** Diário Oficial. Brasília, DF, 30 nov. 2018. Seção 1, p. 10.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 2017.

_____. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial. Brasília, DF. 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

CARVALHO, A. P. C. D. et al. Pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru no município de Araiões – MA. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha-MA, 6, n. 12, 2012.

CHEN, Yiqiang, et al. Near-infrared fluorescence-based multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of four antibiotic residue families in milk. **Biosensors and Bioelectronics** 79 (2016) 430–434.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

COSTA, Amanda Beatriz de Lima, et al. avaliação de resíduos de antibióticos em leite cru produzido na região de Marília – São Paulo. **UNIMAR CIÊNCIAS** - ISSN 1415-1642, Marília/SP, V. 26, (1-2), p. 114-123, 2017.

_____. Geraldo Márcio da., et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

CRUZ, Adriano Gomes da; et al. **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados.** 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

_____. F. N. da.; BORBA, G. L.; ABREU, L. R. D. de. **Ciências da natureza e realidade: interdisciplinar**. Natal, RN: EDUFRN Editora da UFRN, 2005.

DANTAS, Vanderson Vasconcelos et al. Nível tecnológico da pecuária leiteira no estado do Maranhão, Brasil. **Nucleus Animalium**, v. 10, n. 2, nov. 2018.

DE VISSCHER, A. et al. Coagulase-negative Staphylococcus species in bulk milk: Prevalence, distribution, and associated subgroup- and species-specific risk factors. **Journal of Dairy Science**. v. 100, n. 1, p. 629-642, jan. 2017.

DIAS, Juliana Alves. **Qualidade físico-química, higiênico-sanitária e composicional do leite cru: indicadores e aplicações práticas da Instrução Normativa 62**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2014.

DUARTE, Phelipe Magalhães et al. Mastite bovina por Enterobacter aerogenes em Primavera do Leste/MT: relato de caso. **Ver.Veterinária em Foco**, v. 16, n. 2, p. 29-36, jan./jun. 2019.

FEITOSA, Antônio Cordeiro; TROVÃO, José de Ribamar. **Atlas Escolar do Maranhão: espaço geo-histórico e cultural**. João Pessoa, PB: Editora Grafset, 2006.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia e segurança dos alimentos**. Tradução: Andréia Bianchini... [et al]. 2. ed., Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRANCO, Bernadette D. Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016.

FUZETA, Francisco Pedro Cordeiro. **Relação entre a utilização de antibióticos nos animais de companhia e o surgimento de bactérias multirresistentes aos antibióticos utilizados em medicina humana**. Dissertação(mestrado) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde. Lisboa, 2017.

GASPAROTTO, Paulo Henrique Gilio et al. Principais gêneros bacterianos causadores de matite isolados no Laboratório de Microbiologia Veterinária do Hospital Veterinário do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná/RO. **Rev.Veterinária em Foco**, v. 14, n.1, jul./dez. 2016.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2015. 1112 p.

GONÇALVES, R.B.O., et al. Características microbiológicas, celulares, físicas e químicas de leite cru refrigerado em Aparecida do Taboado-MS. **Braz. J. of Develop.** 6(2) 7290-7300, 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades e Estados**. Dados 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/ma/bacabal.html>. Acesso em: 05 mar. 2021.

_____. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária** (out-dez 2019). Rio de Janeiro: IBGE, 2020. p. 72 e 78.

_____. **Produção da Pecuária Municipal 2018**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

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

KAISER, Tassiéli Senger, et al. Perfil microbiológico do leite bovino analisado no laboratório de microbiologia veterinária da UNIJUI. **Anais**. XXII Seminário de Iniciação Científica. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ. Rio Grande do Sul - Brasil, 2014.

KIM J. et al. Improved multiplex PCR primers for rapid identification of coagulase-negative staphylococci. **Arch Microbiol**. 2018 Jan; 200(1):73-83. doi: 10.1007/s00203-017-1415-9. Epub, 2017. Aug 9. PMID: 28795230; PMCID: PMC5758691.

KOBLITZ, Maria Gabriela Bello. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

KRISHNAMOORTHY, P.; SATYANARAYANA, M.L., SHOME, B.R. Coagulase Negative Staphylococcal Species Mastitis: An Overview. **Research Journal of Veterinary Sciences**, 9: 1-10. 2016.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Appl Environ Microbiol**. 1983; 46(1): 165-70.

KUROSAWA, Larissa Sayuri, et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associados a mastite bovina. **PUBVET**. v. 14, n. 5, a563, p. 1- 6, mai. 2020.

LABORCLIN, LABORCLIN Produtos para Laboratórios Ltda. Manual de Antibiograma 2019. **Rev 16** – 03/2019.

LAGE, Arianna Drumond. **Avaliação do Charm® Cow Side II Test e Charm® Blue Yellow II Test para a detecção de resíduos de antimicrobianos em leite**. Dissertação. Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 2010. 44 p.

LAMAITA, H. C. et al. 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.

LINS NETO, Otto Tenório de Albuquerque, et al. Qualidade do leite in natura produzido e comercializado no município de Timon no estado do Maranhão. **Revista Nucleus**, v. 13, n. 2, out. 2016.

LOVATO, Bárbara Ferreira. **Estudo da qualidade do leite in natura recebido pela usina escola de laticínios da UFSM**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. Santa Maria, 2013.

MACHADO, Antônia Maria de Oliveira; GALES, Ana Cristina. **Interpretação de dados microbiológicos**. Módulo/Curso, 2008. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/objetivos.htm. Acesso em: 25 fev. 2021.

MAPA. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>>. Acesso em: 16 fev. 2021.

MARQUES, Viviane F. et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus spp.* e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.** 33(2):161-170, fevereiro 2013.

MARTIN, José Guilherme Prado. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. **Rev. Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, 18(2): 80-87, 2011.

MARTIN, Nicole H., et al. The Evolving Role of Coliforms as Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. *Frontiers in Microbiology*. vol 7. Article 1549. September, 2016.

MARTINS, J.N. SANTOS, D.C.; OLIVEIRA, E.N.A. Qualidade microbiológica de leites pasteurizados comercializados na cidade de Morada Nova, Ceará. **Revista Verde**, v. 7, n. 3, p. 119-123, 2012.

MATSUBARA, M. T. et al. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 277-286, jan./mar. 2011.

MAZAL, C.; SIEGER, B. *Staphylococcus lentus*: The troublemaker. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 14, SUPPLEMENT 1, E397, MARCH 01, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.02.502>.

MELO, C. W. B. de; BARBOSA, F. R.; PEREIRA, D. E. Avaliação da qualidade do leite cru refrigerado obtido em propriedades rurais localizadas no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 20, n. 2, p. 137-142, 2018.

_____, Dayanne Araújo de. **Staphylococcus meticilina-resistentes de origem animal: detecção de variantes do gene mec e seus reguladores**. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Instituto de Veterinária: Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Seropédica, RJ, 2017. 82 f.

_____, Vivianne Vieira; DUARTE, Izabel de Paula; SOARES, Amanda Queiroz. Guia de Antimicrobianos – 1.ed. - Goiânia, 2012. 57f.

MENDES, E. A. S.; PIRES, C. V.; SILVA, A. M. da; SILVA L. S. Análises físico-químicas de amostras de leite cru refrigerado coletadas de produtores do município de Paracatu–Mg.

Anais. 5º Simpósio de Segurança Alimentar, Alimentação e Saúde. Bento Gonçalves, RS de 26 a 29 de maio de 2015.

MENSEN, Jessika Fernanda Rocha. **Controle da qualidade: análises físico-químicas do leite e derivados em uma indústria de beneficiamento de leite.** Monografia, Curso de Zootecnia- Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015. 81f.

MILEN, Abigail F. **Estudo do clima urbano das cidades médias do meio norte brasileiro: o caso de bacabal (MA).** Dissertação. Mestrado em Geografia. Universidade Estadual Vale do Acaraú. Sobral, 2018.

_____. Abigail F.; CARACRISTI, Isorlanda. Sistemas atmosféricos produtores de tempo na cidade de Bacabal – MA. XI Encontro de Pesquisa Pós-Graduação e Inovação. 18 à 20 agosto de 2016. Sobral/CE.

NASCIMENTO, Mariana R. et al. Caracterização físico-química do leite em propriedades do município de Santa Rita do Passa Quatro – SP. **Rev. Investigação** 15(1):49-54, 2016.

NOBRE, Márcio Leonardo de Moraes. **Caracterização fenotípica, genotípica e perfil de resistência antibiótica de *Staphylococcus aureus* isolados em suínos.** Dissertação. Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal do Piauí – Teresina, 2017. 99 f.

NOEL, Caroline da Costa. et al. Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Produção de “Slime” de Isolados de *Staphylococcus spp.* Provenientes de casos de Mastite Bovina na Região Sul-Fluminense. **Revista de Saúde.** 2016 jan./jun.; 07 (1): 22-26.

NUNES, Elâne Rafaela Cordeiro. **Avaliação de antimicrobianos do leite in natura procedente do rebanho bovino leiteiro da microrregião de Garanhuns – Pernambuco.** Monografia. Universidade Federal Rural de Pernambuco – Curso de Medicina Veterinária. Garanhuns, 2013. 69 p.

OLIVEIRA, D. R. de; OLIVEIRA, E. N. A. de; FEITOSA, B. F.; MATIAS, J. K. da Silva; OLIVEIRA, S. N. de. Avaliação da qualidade físico-química de amostras de leite cru proveniente de fazenda produtora da cidade de Ipanguaçu-RN. **Revista Brasileira de Agrotecnologia.** v. 7, n. 2 (2017) p. 32 -37.

_____. Marcos Rei; MEDEIROS, Magela de Margareti. Agentes causadores de mastite e resistência bacteriana. **REVET - Revista Científica de Medicina Veterinária - FACIPLAC Brasília - DF,** v.2, n. 1, dez. 2015.

PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J. R. de; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovo. **Rev. Quim. Nova,** Vol. 37, No. 1, 111-122, 2014.

PAMVET. Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Relatório 2006-2007 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Junho – 2009.

PEREIRA, Marcella Nunes; SCUSSEL, Vildes Maria. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. **Revista de Ciências Agroveterinárias,** Lages, v.16, n.2, p.170-182, 2017.

PEREIRA, Marcos Felipe Bentes Cansanção et al. Avaliação microbiológica no leite de vaca in natura e pasteurizado comercializado na cidade de Tucuruí, Pará. **Rev. Biota Amazônia**. Macapá, v. 9, n. 3, p. 52-56, 2019.

PICCOLO, M. da P, et al. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: produção e sustentabilidade**. Jundiaí, Paco Editorial: 2014.

POLL, Paula Suzana Elisa Maciel. **Genotipificação de Staphylococcus aureus isolados de queijo minas frescal e leite de bovinos com mastite subclínica**. Tese (Doutorado em Saúde Animal). Universidade de Brasília. Brasília, 2020. 115p.

PORTZ A. J.; COUTO E.P.; FERREIRA M. A. Resíduos de antibióticos e qualidade microbiológica de leite cru e beneficiado. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 2014; 73(4):345-50.

PRADO, Renata Resende et. al. *Staphylococcus spp.*: importantes riscos à saúde pública. **PubVet, Maringá**, v. 9, n. 8, p. 363-368. Agosto, 2015.

RAJIC-SAVIC, N. et al. Characteristics of enterotoxigenic coagulase positive staphylococci isolated from bovine milk in cases of subclinical mastitis. **Procedia Food Science** 5. 2015. p. 250 – 253.

RASPANTI, C.G., et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina. **Rev. Argent. Microbiol.** 48, 50 –56, 2016.

RODRIGUES, M. X. Presença de resíduos de antibióticos em leite e derivados. **Revista Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 20, n. 3, 2013. 297-308.

SÁ, João Paulo Natalino de., et al. Os principais microrganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental (Pombal - PB - Brasil)**, v. 12, n. 1, p. 01- 13, jan-mar, 2018.

SALES, R. L. D.; ROCHA, J. L. M.; BRESSAN, J. Utilização de hormônios e antibióticos em produtos alimentícios de origem animal: aspectos gerais e toxicológicos. **Revista Nutrire**, São Paulo, v. 40, n. 3, dezembro, 2015.

SANDES, A. B., et al. Contagem de micro-organismos indicadores em leite cru obtidos por ordenha não mecanizada e mecanizada de propriedades do Recôncavo Baiano. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** (v.10, n. 3) p. 396 – 414, jul - set (2016).

SANTANA, E.H.W. de; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; Mendonça, M.B.O.C. de. Estafilococos em alimentos. *Arq. Inst. Biol.*, **São Paulo**, v. 77, n. 3, p. 545-554, jul./set., 2010.

SANTOS, Aylpy Renan Dutra Santos. **Manejo de bovinos leiteiros jovens em propriedades da Mesorregião Leste Maranhense**. Monografia: Curso de Zootecnia – Universidade Federal do Maranhão. Chapadinha, MA. 2016.

_____. Cristiane Diniz. Matoso; LEAL, Geraldo Sodoyama; ROSSI, Daise Aparecida. Frequência e suscetibilidade a antimicrobianos de Staphylococcus spp isolados de leite de

vacas com mastites recorrentes de rebanhos da região de Uberlândia – MG. **Vet. Not.**, v. 12, n. 2, p. 83-88, dez. 2006.

_____. Livia Lima dos, et al. Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011; 70(1):1-7 SENAR/MA, Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Perspectivas do leite no Maranhão. Artigos. Disponível em <https://senar-ma.org.br/perspectivas-do-leite-no-maranhao/>. Acesso em: 11 abr. 2018.

SHAREEF, L. G.; ALI, W. I; FAWZI, H. A.; NASER H. A. (2019). *Staphylococcus lentus* as a cause of septic shock. 10.13140/RG.2.2.30096.05120.

SILVA JUNIOR, Lourival Souza. **Diagnóstico da qualidade higiênico-sanitária de leite cru destinado a um laticínio do Recôncavo da Bahia**. Dissertação Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas – BA. 2018.

SILVA, Amanda Thaís Ferreira; RIZZO, Huber. Efeitos da mastite por *Staphylococcus* coagulase negativa sobre a qualidade do leite: uma revisão. **REVISTA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**. Ano XVI. N. 32. JANEIRO de 2019.

SILVA, Ana Elisa Pereira da. Incidência de *Staphylococcus* multirresistentes a antimicrobianos nas mãos dos profissionais de unidade básica de saúde – Fernandópolis, 2017. 101 f.: il.; 29,5cm.

_____. Camilla Mércia Teixeira; ANDRADE, Mariana, Figueiredo. Qualidade microbiológica do leite bovino no Brasil associada à *Staphylococcus aureus*. **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.**, v. 6, n. 1, p. 196-216, 2019.

_____. Diego Pereira da, et al. Resíduos de antibiótico em leite: prevalência, danos à saúde e prejuízos na indústria de laticínios. Evidência, Joaçaba v. 13 n. 2, p. 127-152, jul./dez. 2013.

_____. Neusely da., et al. Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água. 4.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

_____. R. M. D.; SILVA, R. C. D.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de antibióticos em leite. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, PR, v. 7, n. 1, p. 30-44, jan./abr. 2012.

_____. R. T. et al. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias patogênicas humanas isoladas de leite cru. Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 74, n. 3, p. 185-194, jul/set, 2019.

_____. Thieres G. F. da, et al. Cenários de mudanças climáticas e seus impactos na produção leiteira em estados nordestinos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 8, p. 863–870, 2010 - Campina Grande, PB.

SINGH, Priyanka; PRAKASH, Alka. Prevalence of coagulase positive pathogenic *Staphylococcus aureus* in milk and milk products collected from unorganized sector of Agra. **Acta argiculturae Slovenica**, 96/1, 37– 41, Ljubljana 2010.

SOARES, Karoline Mikaelle de Paiva; BEZERRA, Nicholas Morais. Características de identidade e qualidade do leite bovino brasileiro. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 6, Ed. 111, Art. 750, 2010.

_____. Lidiane de Castro. Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010. 82 p.

_____. Lidiane C., et al. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *bla_Z* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesq. Vet. Bras.** v. 32, n. 8, p. 692-696, agosto, 2012.

SOUSA, F. C. D, et al. Resíduos de antibiótico em amostras de leite pasteurizado tipo C comercializado na região cariense. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, 7, n. 2, p. 21 – 22, 2012.

_____. Valdemar Manuel de. **Avaliação de três protocolos de secagem em bovinos leiteiros**. Dissertação (Mestrado). Escola de Ciências e Tecnologias - Departamento de Medicina Veterinária. Universidade de Évora. Évora, 2017.

SOUZA, Lara Barbosa de, et al. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino cru no estado do Rio Grande do Norte. **Ciênc. anim. bras.**, Goiânia, v. 18, 2017.

SOVINSKI, Ângela Idalia. **Perfil genotípico e fenotípico da resistência à antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* em cadeia produtiva de carne suína**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Anima. Palotina, 2019. 97f.

TEIXEIRA, Alysson Ribeiro; FIGUEIREDO, Ana Flávia Costa; FRANÇA, Rafaela Ferreira. Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. **Revista Saúde em Foco** – Edição nº 11 – Ano: 2019.

TRONCO, Vania Maria. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 5. ed. – Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2013. 208 p.

VANDERHAEGHEN, Wannes et al. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. **The Veterinary Journal**. Volume 203, Issue 1, January 2015, Pages 44-51.

VELÁSQUEZ, Sabrina del C. Jiménez, et al. Perfil de resistncia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus* spp. obtenidos de leche bovina en Colombia. **Rev Argent Microbiol**. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.05.004>.

WANJALA, W.N.; NDUKO, J.M.; MWENDE, M.C. Coliforms Contamination and Hygienic Status of Milk Chain in Emerging Economies. **Journal of Food Quality and Hazards Control**. 5: 3-10.2018.

WATTIAUX, Michel A. Composição do leite e seu valor nutricional. In: Dairy essentials: nutrition and feeding, reproduction and genetic selection, lactation and milking, raising dairy heifers. Chapter 19.

University of Wisconsin--Madison. Babcock Institute for International Dairy Research and Development, 1995. Disponível em: <https://kb.wisc.edu/dairynutrient/page.php?id=52752> . Acesso em 06 de abril de 2021.

WU, Chang-Qing; FEN, Jun; SHEN, Yi; ZHANG, Yu-Zhu. Research progress on classification and detection methods of antibiotic residues in animal-derived foods. **Journal of Food Safety and Quality**. v. 10, n. 21. nov. 2019.

ZAFALONI, L.F.; et al. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 67, n.2, p. 118-125, 2008.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc e Ciência**, Joaçaba, v.1, n.1, p. 65-70. jan/jun. 2010.

ZIMERMANN, Katia Fabiane; ARAÚJO, Maria Eugênia Moraes. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Campo Digit@l**, v. 12, n. 1, p.1-7, jan./jul., 2017.

ZUNIGA, Eveline. Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina: análise fenotípica, detecção de genes e relação com a presença de genes codificados de adesinas e biofilmes. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.