



**INSTITUTO FEDERAL
DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**
Rio de Janeiro

**Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos

**CARACTERIZAÇÃO DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS
E DETECÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE
ANTIBIÓTICOS EM LEITE CAPRINO CRU**

RIO DE JANEIRO – RJ

2019

Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos

**CARACTERIZAÇÃO DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS
E DETECÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE
ANTIBIÓTICOS EM LEITE CAPRINO CRU**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - *Campus* Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaína dos Santos Nascimento

Rio de Janeiro

2019

Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos

CARACTERIZAÇÃO DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS E DETECÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE CAPRINO CRU

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - *Campus* Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Data da defesa: 14 de fevereiro de 2019.

Prof^a. Dr^a. Janaína dos Santos Nascimento

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

Prof^a. Msc. Iracema Maria de Carvalho da Hora

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

Prof^a. Dr^a. Hilana Ceotto Vigoder

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro - IFRJ

Prof^a. Dr^a. Alice Gonçalves Martins Gonzalez

Universidade Federal Fluminense – UFF

Dedico este trabalho ao meu
companheiro Gabriel Araujo Corrêa e à
minha tia Tania Anciens Guimarães,
por todo o apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu companheiro Gabriel, pela companhia de todos os dias e por todo o amor oferecido. Agradeço à minha sogra Neiva, pelo auxílio em conseguir as preciosas amostras e por todo apoio.

Agradeço à minha família, por todo o suporte e apoio necessários, em especial à minha tia Tania.

Agradeço às minhas amigas que sempre estiveram presentes: Marina, Isabella, Dayane, Tatiana, Thainá, Thaiane, Shirley e Viviane.

Agradeço aos colegas da turma do mestrado de 2017, por todo o apoio e momentos de incentivo. Em especial, agradeço às grandes amigas que ganhei: Caroline, Ana Paula e Júlia.

Agradeço ao pessoal de meu trabalho, a UFF, por todo o apoio durante este percurso. Em especial, agradeço às professoras Alice Gonzalez e Márcia Barreto por tantos ensinamentos e incentivos. Agradeço ao pessoal do Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos da UFF, por todo apoio e troca de conhecimentos.

Agradeço à toda a equipe do laboratório de microbiologia do IFRJ, por todo o apoio e ótima companhia: professores, bolsistas, monitores. Em especial, agradeço ao Brendon e Carlos pela colaboração direta neste trabalho.

Agradeço às pessoas que gentilmente deram sua valorosa contribuição neste trabalho participando das bancas de avaliação: professoras Hilana, Iracema, Alice e Zilma.

Agradeço à coordenação do curso de mestrado, professores Márcia Cristina e Adriano Gomes, por toda a assistência e incentivo.

Agradeço à pessoa mais especial de todo este processo: minha orientadora Janaína. Nada disto seria possível sem seu apoio, desde a época do ensino técnico. Agradeço por todos os ensinamentos e pela maravilhosa companhia.

RAMOS, G. L. P. A. Caracterização de bacilos gram-negativos e detecção da presença de resíduos de antibióticos em leite caprino cru. **Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2019.**

RESUMO

O leite de cabra vem se revelando uma opção ao leite de origem bovina, por questões de menor alergenicidade e melhor digestibilidade. O leite de diversos mamíferos em geral, tem um alto valor nutritivo e por isso tende a ser um meio de cultura excelente para micro-organismos deteriorantes e patogênicos e apresenta grande variedade de bactérias Gram-negativas. Os bacilos Gram-negativos são considerados importantes agentes causadores de infecções hospitalares, e os mais relevantes, especialmente a família *Enterobacteriaceae* e o gênero *Pseudomonas*, são frequentemente relacionados à área de alimentos e lácteos em geral, exibindo maior capacidade de disseminação quando comparados aos cocos Gram-positivos. Neste trabalho, objetivou-se a detecção e a caracterização de bacilos Gram-negativos em 21 amostras de leite de cabra cru comercializados informalmente em diversas cidades do Estado do Rio de Janeiro, além de verificar possíveis resíduos de antimicrobianos nestas amostras. A obtenção dos isolados foi realizada através de plaqueamento das amostras em Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG), que foram, posteriormente, identificados por meio de espectrometria de massas (ionização e dessorção à laser assistida por matriz – MALDI-TOF). A caracterização dos isolados se deu por meio da avaliação de atividades lipolítica (Ágar leite), proteolítica (Ágar *Spirit Blue* modificado) e produtora de biofilme (Ágar vermelho congo). Ainda, realizou-se teste de susceptibilidade a antimicrobianos por meio do método de difusão em disco, e verificou-se a ocorrência de fenótipos produtores de enzimas degradadoras de antibióticos beta-lactâmicos, por inoculação em meios de cultura cromogênicos. Também foram analisados os parâmetros físico-químicos das amostras e eventuais resíduos de antimicrobianos foram verificados por meio do teste rápido DelvoTest T. Foram obtidos 222 isolados, sendo a população microbiana do leite de cabra cru representada por *Pseudomonas* sp. (61%), família *Enterobacteriaceae* (27%), *Stenotrophomonas maltophilia* (7,5%) e *Acinetobacter* sp. (4,5%). 26% dos isolados apresentaram atividade produtora de biofilme

(maioria de enterobactérias), enquanto 32% apresentaram atividades proteolítica e lipolítica, altamente associadas à *Pseudomonas* sp.. Apenas 24 isolados apresentaram resistência à antimicrobianos, sendo três deles resistentes à três ou quatro classes diferentes, e sendo classificados como multirresistentes (*Klebsiella variicola* (2) e *Pantoea agglomerans*). Houve alta taxa de fenótipos produtores de ESBL (91%) e KPC (60%). Estes resultados demonstram os riscos associados ao consumo de leite de cabra cru, e ainda é evidenciada a falta de rigor nas boas práticas de higiene durante a ordenha. Ainda, foi observado um importante problema tecnológico do leite, associado à produção de enzimas deteriorantes termorresistentes. Nenhuma amostra apresentou resíduos de antimicrobianos, fato coerente com a baixa taxa de resistência e com o fato de os produtores em questão serem de pequeno porte.

Palavras-chave: leite caprino cru; *Enterobacteriaceae*; *Pseudomonas*; qualidade do leite; resistência a antimicrobianos.

RAMOS, G. L. P. A. Caracterização de bacilos gram-negativos e detecção da presença de resíduos de antibióticos em leite caprino cru. **Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2019.**

ABSTRACT

Goat milk has been shown to be an option for milk of bovine origin, due to lower allergenicity and better digestibility. Milk from several mammals, in general, has a high nutritional value and therefore tends to be an excellent culture medium for deteriorating and pathogenic microorganisms and has a wide variety of Gram-negative bacteria. Gram-negative bacilli are considered important agents of nosocomial infections, and the most relevant ones, especially *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas*, are frequently related to food and dairy area, exhibiting a greater dissemination capacity when compared to Gram-positive cocci. In this work, we aimed the detection and characterization of Gram-negative bacilli in 21 samples of raw goat milk commercialized informally in several cities of the State of Rio de Janeiro, in addition to verifying possible antimicrobial residues in these samples. The isolates were obtained by plating the samples in Violet Red Agar Bile Glucose (VRBG), which were later identified by mass spectrometry (matrix assisted laser desorption and ionization - MALDI-TOF). The characterization was done through the evaluation of lipolytic activity (milk agar), proteolytic (modified Spirit Blue Agar) and biofilm producer (red congo agar). An antimicrobial susceptibility test was also carried out by disc diffusion test, and the occurrence of antibiotic degrading enzyme producing phenotypes was verified by inoculation in chromogenic culture media. The physico-chemical parameters of the samples were also analyzed and the presence of antimicrobial residues were verified by DelvoTest T rapid test. A total of 222 isolates were identified. The microbial population of raw goat milk was represented by *Pseudomonas* sp. (61%), *Enterobacteriaceae* (27%), *Stenotrophomonas maltophilia* (7.5%) and *Acinetobacter* sp. (4.5%). 26% of the isolates presented biofilm activity (most *Enterobacteriaceae*), while 32% presented proteolytic and lipolytic activity, highly associated to *Pseudomonas* sp.. Only 24 isolates showed antimicrobial resistance, three of them resistant to three or four different classes, and being classified as MDR (*Klebsiella variicola* (2) and *Pantoea agglomerans*).

There was a high rate of ESBL producing phenotypes (91%) and KPC (60%). These results demonstrate the risks associated with the consumption of raw goat's milk, and the lack of rigor in good hygiene practices during milking is evidenced. Also, an important technological problem of milk was observed, associated with the production of thermoresistant deteriorating enzymes. No samples showed antimicrobial residues, a fact consistent with the low resistance rate and the fact that the producers in question were small.

Keywords: raw goat milk; *Enterobacteriaceae*; *Pseudomonas*; milk quality; antimicrobial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efetivo de caprinos no Brasil entre os anos de 2007 e 2016	3
Figura 2	Classificação dos bacilos Gram-negativos e exemplos de seus representantes mais relevantes	11
Figura 3	Esquema de funcionamento do MALDI-TOF	12
Figura 4	Colônias típicas de enterobactérias em ágar VRBG	13
Figura 5	Interpretação de resultados do teste DelvoTest® T	18
Figura 6	Subclasses da classe de antibióticos dos β -lactâmicos	19
Figura 7	Mecanismo de hidrólise de antibióticos β -lactâmicos por ESBL	22
Figura 8	Mecanismo de formação do biofilme	24
Figura 9	Mapa de amostragem de leite de cabra cru coletados no Estado do Rio de Janeiro	29
Figura 10	Aspecto de algumas das colônias bacterianas isoladas de leite de cabra cru, observadas em ágar VRBG	42
Figura 11	Fragmento do relatório gerado pelo software acoplado ao MALDI-TOF	43
Figura 12	Identificação geral dos isolados obtidos das amostras de leite caprino cru	45
Figura 13	Identificação dos isolados obtidos das amostras de leite caprino cru, identificados por MALDI-TOF e pertencentes à família <i>Enterobacteriaceae</i>	46
Figura 14	Identificação dos isolados obtidos das amostras de leite caprino cru, identificados por MALDI-TOF e pertencentes ao gênero <i>Pseudomonas</i> .	47
Figura 15	Características de isolados de diferentes gêneros no ágar VRBG	49
Figura 16	Exemplos de resultados obtidos no ágar vermelho congo	50
Figura 17	Gêneros bacterianos que apresentaram atividade produtora de biofilme	51
Figura 18	Gêneros bacterianos que apresentaram atividade proteolítica	52

Figura 19	Gêneros bacterianos que apresentaram atividade lipolítica	54
Figura 20	Exemplos de resultados obtidos em meios cromogênicos para detecção de fenótipos de resistência produtores de ESBL.	59
Figura 21	Gêneros bacterianos que apresentaram atividade produtora de ESBL	60
Figura 22	Gêneros bacterianos que apresentaram atividade produtora de KPC	61
Figura 23	Resultados negativos do DelvoTest para duas amostras de leite de cabra cru comparativamente ao controle negativo	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição média dos principais nutrientes dos leites de cabra, ovelha, vaca e humano.	4
Tabela 2	Comparação da composição (%) dos ácidos graxos presentes nos leites caprino e bovino	5
Tabela 3	Comparação da composição (%) proteica nos leites caprino e bovino	6
Tabela 4	Padrões microbiológicos para leite pasteurizado	9
Tabela 5	Padrões de qualidade para leite de cabra in natura, segundo a IN 37/2000	10
Tabela 6	Limites máximos de resíduos de antimicrobianos para leite	21
Tabela 7	Procedência das amostras de leite de cabra cru utilizadas e períodos de coleta	28
Tabela 8	Antibióticos empregados para avaliação de resistência de micro-organismos da família <i>Enterobacteriaceae</i>	36
Tabela 9	Antibióticos empregados para avaliação de resistência de micro-organismos do gênero <i>Pseudomonas</i>	37
Tabela 10	Antibióticos empregados para avaliação de resistência de micro-organismos do gênero <i>Acinetobacter</i>	37
Tabela 11	Antibióticos empregados para avaliação de resistência de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	38
Tabela 12	Padrão de colônias típicas observadas nos meios cromogênicos	38
Tabela 13	Quantificação de enterobactérias totais e de mesófilos aeróbios nas amostras de leite de cabra cru	40
Tabela 14	Identificação de micro-organismos divididos por amostra de leite de cabra cru	44

Tabela 15	Isolados de leite caprino cru que apresentaram resistência a antimicrobianos	55
Tabela 16	Resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras de leite caprino cru	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de padrões clínicos laboratoriais)
CPP	Contagem padrão em placas
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adesão difusa
DNA	<i>Deoxiribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESBL	<i>Extended spectrum beta-lactamase</i> (beta-lactamase de espectro estendido)
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura)
HCCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> (ácido α-ciano-4- hidroxicinâmico)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFRJ	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LMR	Limite máximo de resíduos
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i> (Ionização e dessorção à laser assistida por matriz – tempo de voo)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	<i>Multidrug resistant</i> (multirresistente a drogas)
PAMVET	Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem animal
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)

PDR	<i>Pandrug resistant</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina-Shiga
UFC	Unidade formadora de colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UHT	<i>Ultra High Temperature</i> (Temperatura ultra alta)
VRB	Violeta vermelho bile
VRBG	Violeta vermelho bile glicose
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização mundial da saúde)
XDR	<i>Extensively drug-resistant</i> (Extensivamente multirresistente)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 LEITE CAPRINO	2
2.1.1 Definição e mercado	2
2.1.2 Propriedades físico-químicas	3
2.1.3 Propriedades funcionais	6
2.1.4 Qualidade microbiológica	8
2.2 BACILOS GRAM-NEGATIVOS	11
2.2.1 Família <i>Enterobacteriaceae</i>	13
2.2.2 Gênero <i>Pseudomonas</i>	15
2.2.3 Gênero <i>Acinetobacter</i>	16
2.3 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM ALIMENTOS LÁCTEOS	19
2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS BACILOS GRAM-NEGATIVOS	23
2.4.1 Resistência à antimicrobianos	23
2.4.2 Produção de biofilme	23
2.4.3 Atividades proteolítica e lipolítica	25
3 JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 AMOSTRAGEM	28
5.2 CONTAGEM DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS E ENTEROBACTÉRIAS TOTAIS	30
5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS	30

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	31
5.4.1 Avaliação qualitativa da produção de biofilme	31
5.4.2 Avaliação da atividade proteolítica	31
5.4.3 Avaliação da atividade lipolítica	31
5.4.4 Perfil de resistência à antimicrobianos	
5.4.5 Fenótipos de produção de ESBL e KPC	
5.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE LEITE CAPRINO CRU	32
5.5.1 Determinação de pH	32
5.5.2 Determinação de acidez	32
5.5.3 Determinação do percentual de gordura	33
5.5.4 Determinação do extrato seco total	33
5.5.5 Determinação do extrato seco desengordurado	34
5.5.6 Determinação do teor de lactose	34
5.6 AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS	39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS AERÓBIAS E ENTEROBACTÉRIAS TOTAIS	40
6.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	42
6.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	50
6.3.1 Atividade produtora de biofilme	
6.3.2 Atividade proteolítica	
6.3.3 Atividade lipolítica	
6.3.4 Perfil de resistência à antimicrobianos	
6.3.5 Fenótipos de produção de ESBL e KPC	
6.4 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	55
6.5 DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS	62

7. CONCLUSÕES	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9. ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

O consumo de leite caprino vem aumentando mundialmente, especialmente em razão de sua baixa alergenicidade, quando comparado ao leite bovino, e as outras questões relacionadas à saúde, como melhor digestibilidade.

Com o crescente consumo e produção de leite e conseqüente maior aglomeração dos animais, há uma maior ocorrência de infecções. Assim, ocorre um aumento exacerbado e muitas vezes mal controlado na administração de antibióticos tornando a presença de resíduos destes medicamentos no leite uma situação preocupante.

Anualmente no mundo, são usados cerca de 12 milhões de quilos de antibióticos na pecuária, sendo que 75% são utilizados no tratamento de infecções dos animais, e o restante com o objetivo de prevenção (MOGHADAM *et al.*, 2016). Além dos riscos relacionados à ingestão desses resíduos com impacto na saúde humana, a presença dos antibióticos em alimentos pode acarretar o desenvolvimento de multirresistência à antimicrobianos nos micro-organismos presentes. Ainda, traz prejuízos aos processos tecnológicos subsequentes como produção de queijo ou iogurte, onde os micro-organismos empregados nestes processos serão inibidos (FERNANDES *et al.*, 2013).

Os produtos lácteos bovinos, por serem de baixo custo e alto consumo e por possuírem um processo de produção com muitos pontos críticos, se tornam importantes veículos de propagação de patógenos e têm sido muito estudados neste aspecto, especialmente com relação ao grupo dos bacilos Gram-negativos. Porém, os lácteos de origem caprina carecem de estudos e se revelam como um mercado em ascensão.

É cada vez mais alarmante o problema relacionado a micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* e outros Gram-negativos resistentes a antibióticos, provocando casos de severas infecções hospitalares. O gênero *Pseudomonas*, além de possuir importância clínica, se revela como potencial causador de perdas na indústria leiteira, devido à sua forte ação enzimática que atua na redução da vida útil do leite.

Diante do exposto, faz-se necessário avaliar possíveis relações entre a ocorrência de fenótipos de multirresistência em micro-organismos do grupo dos bacilos Gram-negativos, como representantes da família *Enterobacteriaceae* e dos gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, no leite de cabra cru com a presença de resíduos de antibióticos nestes produtos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LEITE CAPRINO

2.1.1 Definição e mercado

Os produtos lácteos caprinos são considerados saudáveis e com características bioquímicas e sensoriais desejáveis, permitindo a produção de uma grande variedade de derivados, principalmente vários tipos de queijo com alto valor de mercado (CAVICCHIOLI *et al.*, 2015).

Segundo a Instrução Normativa Nº 37 de 31 de Outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta o procedimento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra, este é definido como o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados. Neste regulamento técnico são explicitados os requisitos para o processo de produção, assim como sua higiene, controle e beneficiamento. Apresenta, ainda, os critérios de classificação, designação, composição e aborda pontos relacionados a fraudes, contaminantes, rotulagem e critérios microbiológicos (BRASIL, 2000).

Mundialmente, existem cerca de um bilhão de cabras, sendo o leite de cabra o terceiro mais produzido, atrás dos leites de vaca e búfala. O Brasil possui um rebanho de caprinos que figura entre os vinte maiores do mundo, sendo que mais da metade deste consiste de animais leiteiros. Ainda assim, a produção nacional é pouco expressiva, correspondendo a apenas cerca de 2% da produção mundial. Em termos de América do Sul, o Brasil é o maior produtor, correspondendo a 80% do total. (FAO, 2018).

Em 2015, o país atingiu um efetivo de caprinos de 9,61 milhões de cabeças, valor este que representa um crescimento de 8,6% em relação ao ano anterior e mantém uma sequência de crescimento. Em 2016, o efetivo de caprinos foi registrado em 9,78 milhões de cabeças, um crescimento de 1,7% com relação ao ano anterior (**Figura 1**). A região Nordeste corresponde a 93% da produção e exibe crescimento de cabeças juntamente com as regiões norte e centro-oeste, ao contrário das regiões sudeste e sul, que seguem uma tendência de declínio de criação de caprinos. Bahia e Pernambuco abrigam mais da metade do efetivo nacional. Dos 5.570 municípios brasileiros, 5.025 (90,2%) apresentaram criação de caprinos em 2016 (IBGE, 2016).

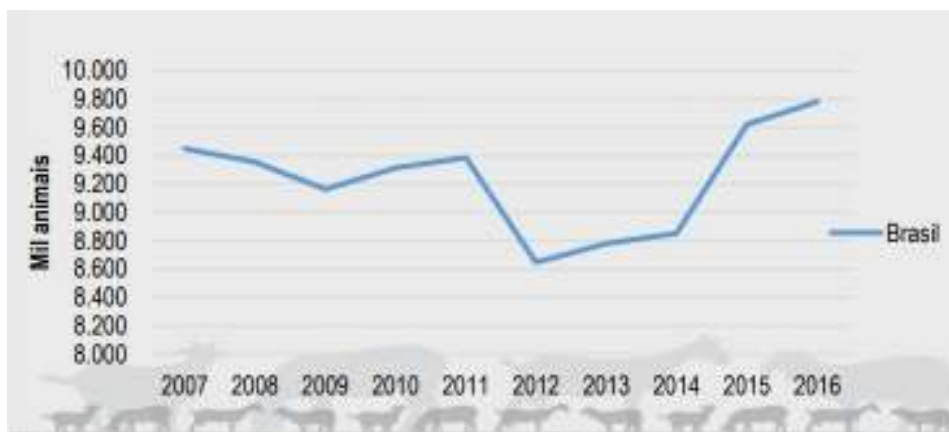


Figura 1: Efetivo de caprinos no Brasil entre 2007 e 2016 (Fonte: IBGE, 2016).

O mercado de produção de leite caprino apresenta sazonalidade e pequena produção de leite por animal, fatores que resultam em produtos com altos preços e incentivam fraudes. Os altos preços se justificam pelo pequeno tamanho das cabras em relação às vacas, gerando menor volume de produção, e pela produção irregular, influenciada pelo clima seco do país, gerando um custo de cerca do triplo que é pago pelo leite bovino (GOLINELLI *et al.*, 2014).

2.1.2 Propriedades físico-químicas

No Brasil não há método analítico oficial indicado para a pesquisa de adulteração em leite de cabra. Um estudo nacional recente apontou que vinte amostras de quatro marcas diferentes de queijo de cabra apresentaram adulteração com leite de vaca, informação esta omitida de seus rótulos. Ainda, foi constatada a percepção de consumidores por meio de análise sensorial em queijos de cabra produzidos propositalmente com porcentagens determinadas de adulteração com leite de vaca a partir de 10% (v/v) (GOLINELLI *et al.*, 2014).

Um dos problemas que leva à uma certa rejeição do leite de cabra é o odor característico. Alguns fatores que influenciam neste odor são a alta concentração de ácidos graxos livres, principalmente os de cadeia curta, a concentração de cloreto de potássio e a presença de alguns cresóis. Estudos indicam que a permanência do leite caprino sob refrigeração pode acentuar o odor, enquanto que tratamentos térmicos tendem a reduzi-lo (GOLINELLI *et al.*, 2014).

A **Tabela 1** apresenta um comparativo entre a composição do leite caprino e outros tipos de leite. A composição média do leite de cabra é de 87% de água, 4% de lipídeos, 4% de lactose, 3,5% de proteínas e 1% de cinzas, com pH em torno de 6,5 (PARK, *et al.*, 2007), se apresentando com uma coloração mais esbranquiçada com relação ao leite de vaca,

devido à ausência de β -caroteno. Tem níveis satisfatórios de minerais como cálcio, cobre, manganês, zinco e selênio, e de vitaminas como vitamina A, niacina e riboflavina (LIMA *et al.*, 2016).

Tabela 1: Composição média dos principais componentes nos leites de cabra, ovelha, vaca e humano.

Composição	Cabra	Ovelha	Vaca	Humano
Gordura (%)	3,8	7,9	3,6	4,0
Sólidos-não-gordura (%)	8,9	12,0	9,0	8,9
Lactose (%)	4,1	4,9	4,7	6,9
Proteína (%)	3,4	6,2	3,2	1,2
Caseína (%)	2,4	4,2	2,6	0,4
Albumina, globulina (%)	0,6	1,0	0,6	0,7
Não-proteína N (%)	0,4	0,8	0,2	0,5
Cinzas (%)	0,8	0,9	0,7	0,3
Calorias /100 ml	70	105	69	68

Fonte: Park *et al.* (2007).

Com relação ao conteúdo lipídico, o leite de cabra tem majoritariamente triacilgliceróis em sua composição (98%), com traços de fosfolípídeos, colesterol e ácidos graxos livres. Ainda, o leite caprino apresenta glóbulos de gordura menores e maior presença de ácidos graxos de cadeia média e curta, causando um impacto positivo no processo digestivo, que também é justificado pela composição dos ácidos graxos. Como exibido na **Tabela 2**, Os ácidos cáprico, caprílico e capróico representam em torno de 15% dos ácidos graxos no leite de cabra, enquanto no leite bovino representam 7%, fato este também associado ao odor característico do leite caprino (TAYLOR & MACGIBBON, 2011).

Tabela 2: Comparação da composição (%) dos ácidos graxos presentes nos leites caprino e bovino

Ácido graxo	Leite caprino	Leite bovino
Palmítico	28,0	28,3
Oleico	19,3	18,8
Cáprico	10,0	3,2
Mirístico	9,8	11,1
Esteárico	8,9	11,8
Láurico	5,0	3,6
Outros	3,9	5,5
Linoleico	3,2	1,4
Caprílico	2,7	1,5
Capróico	2,4	2,4
Butírico	2,2	3,7
Palmitoleico	1,6	1,6
Pentadecanóico	0,7	1,2
Linolênico	0,4	0,9
Miristoleico	0,2	0,9

Fonte: adaptado de Verruck, Dantas e Prudencio, 2019.

O conteúdo proteico, assim como no leite de vaca, é dividido em caseínas e proteínas do soro do leite (*whey proteins*) no leite de cabra, cujos valores são exibidos na **Tabela 3**. A maior parte das proteínas do leite bovino se dá por α_{s1} -caseína, enquanto no leite caprino, as proteínas majoritárias são β -caseína e α_{s2} -caseína. A diferença do conteúdo proteico entre os ruminantes abordados se dá em razão do polimorfismo genético e sua alta frequência em caprinos, especialmente com relação à α_{s1} -caseína (VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019).

O leite de cabra vem se revelando uma opção ao leite de origem bovina por razões de alergenicidade, especialmente em crianças. A proteína α_{s1} -caseína, associada à alergenicidade, é presente no leite bovino em cerca de 12 a 15 g/L, enquanto no leite caprino, este valor chega no máximo a 7 g/L. A alergia ao leite de vaca atinge cerca de 6% de crianças brasileiras, e a substituição por leite caprino demonstra resultados satisfatórios em até 40% dos casos. (HODGKINSON *et al.*, 2017).

Tabela 3: Comparação da composição (%) proteica nos leites caprino e bovino

Componente	Leite bovino	Leite caprino
Caseínas (g/100mL)	2,40 – 2,80	2,33 – 4,63
α_{s1} -caseína	43 - 54	0 - 28
α_{s2} -caseína	11 - 14	10 - 25
β -caseína	32 - 40	0 - 64
κ -caseína	11 - 14	15 - 29
Whey proteins (g/100mL)	0,50 – 0,70	0,37 – 0,70
α -lactoalbumina	14 - 21	18 - 33
β -lactoglobulina	29 - 57	39 - 72
seroalbumina	1 - 6	5 - 21
imunoglobulina	9 - 14	5 - 21

Fonte: adaptado de Verruck, Dantas e Prudencio, 2019. As caseínas e *whey proteins* individuais estão expressadas em porcentagens relativas ao total de cada grupo.

2.1.3 Propriedades funcionais

Os ácidos linoleicos conjugados presentes no leite, definidos como uma família de isômeros do ácido linoleico, tem importância comprovada na inibição do câncer e aterosclerose e melhora das funções imunológicas (ELWOOD *et al.*, 2010).

A β -lactoglobulina do leite de cabra apresenta diferenças com relação ao leite de vaca, gerando peptídeos bioativos durante o processo de digestão e durante o processamento do alimento. Estes peptídeos exercem papéis biológicos específicos, como atividades anti-hipertensivas, antimicrobianas, antioxidantes e imunomoduladoras (BALTHAZAR *et al.*, 2017).

Além da lactose, outros tipos de carboidratos presentes no leite de cabra são oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas. Os oligossacarídeos do leite caprino exibem uma série de efeitos benéficos à saúde humana, como propriedades antigênicas e efeitos anti-inflamatórios na região intestinal (VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019).

Com relação ao conteúdo mineral, sabe-se que além do leite caprino ter maiores níveis de cálcio, fósforo, magnésio, ferro e cobre comparativamente ao leite de vaca, suas biodisponibilidades são aumentadas. O conteúdo de vitamina A também se mostra mais elevado em relação ao leite de vaca, pois as cabras são capazes de converter carotenos em vitamina A (VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019).

O leite de cabra pode ser utilizado como matéria prima na produção de diversos produtos, como queijos, sorvetes, manteigas, produtos condensados e doces. Estes produtos desempenham importante papel especialmente na dieta de crianças e idosos devido aos seus benefícios relativos aos produtos lácteos bovinos, tornando o leite caprino uma excelente matriz para o desenvolvimento de produtos funcionais, incluindo probióticos (VERRUCK; DANTAS; PRUDENCIO, 2019). O abundante uso do leite como matriz para elaboração de probióticos é relacionado à sua composição, mais favorável ao desenvolvimento de bifidobactérias e bactérias ácido lácticas (CHAMPAGNE; CRUZ; DAGA, 2018).

Os probióticos são definidos como micro-organismos viáveis que proporcionam efeitos benéficos à saúde quando presentes em quantidades adequadas no hospedeiro, sendo os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* os mais utilizados em produtos lácteos (CHAMPAGNE; CRUZ; DAGA, 2018). Muitos estudos demonstraram a viabilidade de probióticos em leite de cabra durante o tempo de armazenamento, como leites fermentados, bebidas lácteas fermentadas, iogurte, kefir, queijo coalho, ricota e sorvete (CHEN *et al.*, 2018; RANADHEERA *et al.*, 2016; CAIS-SOKOLIŃSKA *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2017)

Uma recente pesquisa avaliou as atividades redutora de colesterol e antioxidante em leites caprino e bovino fermentados com probióticos (bifidobactérias e lactobacilos), e estas se apresentaram em maiores níveis nas bebidas de origem caprina, sendo justificado por diferenças estruturais e maior atividade proteolítica na estrutura primária do leite caprino (ZHANG *et al.*, 2015).

Um prebiótico é definido como um substrato que é utilizado seletivamente por um microrganismo do hospedeiro, gerando efeitos benéficos à saúde. São em sua maioria carboidratos e presentes em maior quantidade no leite de cabra, comparativamente ao leite de outros ruminantes. Um estudo demonstrou que frações do soro do leite caprino, coletado após produção de queijo e ricas em oligossacarídeos, apresentaram funcionalidade e promoção da saúde intestinal, indicando que estes oligossacarídeos concentrados poderiam ser aplicados no desenvolvimento de produtos funcionais derivados de leite de cabra (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A combinação de um ou mais prebióticos com um ou mais probióticos origina um produto simbiótico. Na literatura, existem registros de produção de diversos produtos simbióticos originados a partir do leite de cabra, sendo em sua maioria diversos tipos de queijos e iogurte (KINIK *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2015).

2.1.4 Qualidade microbiológica

O leite de diversos mamíferos em geral, tem um alto valor nutritivo e por isso tende a ser um meio de cultura excelente para micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Por isto, deve ser obtido em rígidas condições de higiene e imediatamente refrigerado, com posterior tratamento térmico (WESCHENFELDER *et al.*, 2016).

A cadeia de produção de lácteos em geral envolve uma série de riscos, o que torna este tipo de produto uma fonte usual de micro-organismos patogênicos. Além da contaminação primária durante a criação do animal, existem pontos críticos durante o processamento, transporte e armazenamento dos produtos finais (AGRIMONTI *et al.*, 2017).

Durante o processo de ordenha, além da importância do uso das técnicas de boas práticas, é necessário realizar a contagem de células somáticas, que indica se o animal possui algum processo inflamatório, em especial, mastite. Para cabras, utiliza-se um valor aceitável de até 300.000 células/ml. Acima deste valor, existe o risco da presença de patógenos e possíveis toxinas no leite, trazendo riscos à saúde do consumidor e reduzindo o preço de venda do leite, ou até mesmo inviabilizando seu consumo (SILANIKOVE *et al.*, 2010).

As condições higiênico-sanitárias no processo de obtenção do leite estão diretamente relacionadas com os parâmetros microbiológicos do produto, e conseqüentemente com a qualidade do produto final. Os processos lipolíticos decorrentes da ação bacteriana resultam na degradação de ácidos graxos e formação de compostos voláteis, gerando alterações nas características sensoriais (QUEIROGA *et al.*, 2007).

A microbiota natural do leite de cabra cru é composta em sua maior parte por bactérias ácido-láticas, como espécies dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*, e por membros da família *Enterobacteriaceae*. A composição microbiológica pode variar de acordo com a estação do ano em que o leite foi coletado, devido às mudanças na alimentação e saúde do animal relacionadas à temperatura do ambiente (QUIGLEY, *et al.*, 2013).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. No grupo de alimentos denominado leite de bovinos e de outros mamíferos e derivados, são indicados os micro-organismos que devem ser pesquisados, assim como seus valores de tolerância máximos, para que a qualidade mínima do produto seja garantida (**Tabela 4**). Para leite fluido pasteurizado, a recomendação é que sejam pesquisados coliformes termotolerantes e *Salmonella* spp. Já para queijos, a orientação varia de acordo com o tipo e a umidade de cada produto. Em geral, devem ser avaliados coliformes

termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. (BRASIL, 2001).

Tabela 4: Padrões microbiológicos para leite pasteurizado

Grupo de alimentos: Leite de bovinos e de outros mamíferos						
Leite pasteurizado	Micro-organismo	Tolerância para amostra indicativa	Tolerância para amostra representativa			
			n	c	m	M
	Coliformes a 45°C/g (mL)	4	5	1	2	4
	<i>Salmonella</i> sp./25g (mL)	Aus	10	0	Aus	-

Legenda: Aus – Ausência. Fonte: RDC 12 de 2001 (BRASIL, 2001). n: número de amostras de um determinado lote em que devem ser realizadas as análises indicadas. c: número de amostras que podem apresentar valores entre m e M sem reprovação do lote. m: valor intermediário. M: valor máximo.

No ano de 2018 houve um processo de revisão na RDC 12 de 2001, através da Consulta pública nº 542, onde importantes mudanças estruturais foram observadas durante seu processo de consulta pública. Para leites pasteurizados em geral, o único parâmetro exigido é a contagem de enterobactérias (*Enterobacteriaceae/ml*), apresentando um limite de 10 UFC/mL como critério microbiológico de higiene. Para queijos e outros derivados lácteos em geral, a RDC proposta sugere a pesquisa de *Salmonella* sp., enterotoxina estafilocócica, estafilococos coagulase positiva e *Escherichia coli*, além de indicar a pesquisa de bolores e leveduras para alguns produtos do gênero (BRASIL, 2018).

Para o leite caprino cru, a Instrução Normativa Nº 37 de 31 de outubro de 2000 descreve um padrão aceitável de contagem padrão em placas (CPP), assim como padrões de qualidade físico-químicos, descritos na **Tabela 5** (BRASIL, 2000).

O leite de cabra cru é frequentemente relacionado na literatura à presença de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico e *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Ainda, é ocasionalmente relacionado à presença de *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., e outros micro-organismos dos gêneros *Salmonella* e *Cronobacter*, ressaltando que o consumo de leite cru é um problema de saúde pública (OSMAN *et al.*, 2013; ÁLVAREZ-SUÁREZ *et al.*, 2015).

Tabela 5: Padrões de qualidade para leite de cabra in natura, segundo a IN 37/2000

Padrão microbiológico	
Contagem padrão em placas (CPP)	Máximo de 500000 UFC/ml

Padrões físico-químicos	
Acidez, % ácido láctico	0,13 – 0,18
Sólidos não gordurosos, % m/m	Mínimo 8,20
Densidade a 15°C	1,0280 – 1,0340
Proteína total, % m/m	Mínimo 2,8
Lactose, % m/m	Mínimo 4,3
Cinzas, % m/v	Mínimo 0,7

Fonte: IN 37 de 2000 (BRASIL, 2000). Observação: para leite de cabra cru congelado, a faixa aceitável de acidez vai de 0,11 a 0,18, em % de ácido láctico.

À nível nacional, estudo recente avaliou a qualidade microbiológica do leite caprino cru na Paraíba, sendo obtidas contagens acima do considerado tolerável de mesófilas totais e de coliformes, indicando falhas no processo higiênico de ordenha. Ainda, foram detectadas contagens significativas de *Staphylococcus aureus* em cerca de 5% das amostras, revelando um potencial problema relacionado à produção de toxinas por estes micro-organismos e associação com mastite no animal, pois este micro-organismo é o mais relacionado à esta infecção. *Salmonella enterica* foi isolada em 1,3% das amostras pesquisadas, revelando a variedade e gravidade dos patógenos encontrados no leite caprino cru (MONTE et al., 2016).

Outros estudos exibem resultados igualmente preocupantes. Em São Paulo, foi detectada alta prevalência (cerca de 35%) e diversidade de micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, além de representantes das enterobactérias, ambos frequentemente associados à surtos alimentares e potenciais riscos à saúde humana (MACHADO et al., 2018).

Em um estudo realizado no Rio Grande do Norte, houve prevalência de coliformes e estafilococos em mais de um quarto das amostras de leite cru analisado, além da presença de micro-organismos psicrotóxicos, que se revelam um importante problema para a indústria, ocasionando perdas em razão da produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas que desestabilizam o produto e acarretam perda de qualidade, reduzindo sua vida útil (SILVA et al., 2017).

2.2 BACILOS GRAM-NEGATIVOS

Os bacilos Gram-negativos são considerados importantes agentes causadores de infecções hospitalares, e os mais relevantes são frequentemente relacionados à área de alimentos, exibindo maior capacidade de disseminação quando comparados aos cocos Gram-positivos (HERNÁNDEZ-GÓMEZ *et al.*, 2013). São divididos em dois grandes grupos, os fermentadores e os não-fermentadores, como exibido na **Figura 2**.

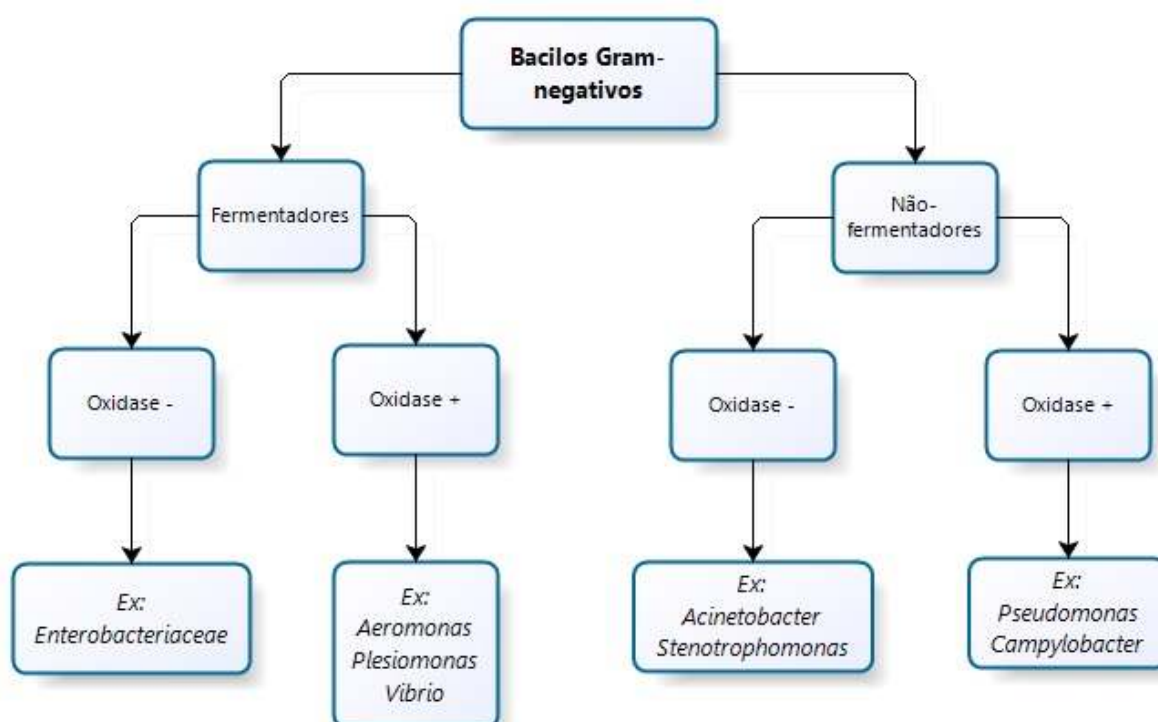


Figura 2: Classificação dos bacilos Gram-negativos e exemplos de seus representantes mais relevantes.

Para realizar a identificação de micro-organismos, um método que atualmente vem ganhando destaque é a espectrometria de massas MALDI-TOF (ionização e dessorção à laser assistida por matriz – tempo de voo). A técnica consiste em inserir a cultura bacteriana diretamente em uma placa metálica, onde ocorre uma mistura com uma matriz composta de ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico (HCCA), com posterior cristalização da amostra em conjunto com a matriz (**Figura 3**). A partir disto, a placa é inserida no espectrômetro de massas e feixes de laser são emitidos, ocasionando a evaporação da amostra com liberação de proteínas ionizadas de diferentes cargas e massas. Assim, estas são acelerados por um campo eletrostático até um tubo metálico com atmosfera de vácuo, onde percorrem a distância até o detector em função do binômio massa/carga, gerando diferentes

espectros com base no micro-organismo em questão. Assim, o equipamento compara o espectro obtido com um vasto banco de dados, exibindo a identificação precisa do micro-organismo. Este método se revela altamente confiável e ágil, podendo exibir resultados em menos de uma hora (CROXATTO, PROD'HOM & GREUB, 2012).



Figura 3: Esquema de funcionamento do MALDI-TOF (Fonte: <https://sbmicrobiologia.org.br/wp-content/uploads/2015/09/Revista23.pdf>).

2.2.1 Família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é composta por 53 gêneros e mais de 170 espécies descritas. São bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos. Possuem flagelos peritríquios, com exceção de algumas espécies imóveis. No geral, possuem características como temperatura ótima de crescimento de 37°C e produzem ácido ao fermentar a glicose. Alguns gêneros patogênicos se revelam de grande importância clínica, como *Enterobacter* e *Salmonella*, assim como as espécies *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2015).

No Brasil, a Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), descreve o procedimento recomendado para a contagem de enterobactérias em alimentos, que emprega o uso do Ágar VRBG (*Violet Red Bile Glucose*) (BRASIL, 2003). O grupo dos coliformes também fermenta a lactose, porém outras espécies da família *Enterobacteriaceae* fermentam apenas a glicose. Assim, o ágar VRB (*Violet Red Bile Agar*), indicado para detecção de coliformes, teve a lactose substituída pela glicose em sua composição, dando origem ao ágar VRBG, indicado para detecção de todas as enterobactérias. O pH do meio é diminuído devido à fermentação da glicose pelas enterobactérias, acarretando em colônias de tom rosado, em virtude da presença do indicador vermelho neutro na formulação (**Figura 4**). Ainda, ocorre a formação de halos devido à precipitação dos sais biliares. Os micro-organismos Gram-positivos são inibidos pela presença do cristal violeta e dos sais biliares (CORRY, CURTIS & BAIRD, 2003).



Figura 4: Colônias típicas de enterobactérias em ágar VRBG (Fonte: <http://separations.co.za/products/vrbg-agar/>).

O ágar VRBG também é associado à recuperação de micro-organismos do gênero *Pseudomonas*, segundo a farmacopeia internacional da Organização Mundial da Saúde (OMS). Este meio é indicado para uso com bactérias Gram-negativas tolerantes à bile, e possui as propriedades de promotor de crescimento e indicador dos micro-organismos abordados (WHO, 2017).

Os coliformes são um grupo de micro-organismos utilizados frequentemente como indicadores, com a finalidade de verificar a condição microbiológica geral da amostra. Os micro-organismos desse grupo se caracterizam por serem fermentadores de lactose com produção de ácido e gás a 32-35°C, sendo denominados coliformes totais. Ainda, existem aqueles que conseguem fermentar a lactose até a temperatura de 45°C, sendo identificados como coliformes termotolerantes. Neste último grupo, destaca-se a importância da espécie *Escherichia coli*, que indica contaminação fecal devido à sua origem exclusiva das fezes. Quase todos os membros do grupo coliforme pertencem à família *Enterobacteriaceae* (sendo os principais os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*), com exceção de integrantes do gênero *Aeromonas*. O uso deste grupo como indicadores em produtos lácteos vem sendo debatido na comunidade científica e novas soluções têm sido propostas, como o uso do chamado “Grupo EB” ou Enterobactérias totais, que compreende todos os membros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo assim o grupo coliforme e sem os representantes do gênero *Aeromonas*, e como a contagem de Gram-negativas totais, que inclui todas as enterobactérias e os outros Gram-negativos não fermentadores, como o gênero *Pseudomonas*, importante indicador relacionado à formação de biofilme e maior gênero associado à contaminação pós-processamento na indústria de lácteos. Em relação aos coliformes, o uso do grupo EB se torna vantajoso por detectar um número maior de possíveis contaminantes pós-pasteurização. Ambos os grupos propostos, apesar de incluírem patógenos, são considerados indicadores higiênico-sanitários (MARTIN *et al.*, 2016).

Acompanhando a discussão da comunidade científica mundial, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Consulta pública nº 542, de 17 de julho de 2018, propôs a completa retirada do grupo coliformes do Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, sugerindo a substituição por pesquisa de *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli* em âmbito nacional (BRASIL, 2018).

Embora não haja diferença significativa na prevalência de coliformes nos leites bovino, caprino e ovino, queijos feitos com leite de cabra tendem a apresentar uma probabilidade maior de detecção de coliformes. Isso pode se justificar devido à fatores intrínsecos do leite e queijo caprinos, procedimento de produção do queijo e menos recursos disponíveis pelos produtores de queijos caprinos, com relação à segurança de alimentos (TRMČIĆ *et al.*, 2016).

No leite cru, coliformes são encontrados em 98% das amostras. Se detectados mais de 10.000 UFC/mL supõe-se que haja uma correlação com práticas inadequadas de higiene, refrigeração ineficiente do produto ou condição de mastite no animal. No leite

pasteurizado, a presença de coliformes indica contaminação pós-pasteurização, relacionada à formação de biofilme, ou falha no processo térmico (MARTIN *et al.*, 2016).

E. coli é um micro-organismo comensal, habitando o intestino humano e animal em uma relação de benefícios mútuos, sendo o principal indicador de contaminação fecal (TCHAPCHET e HANSEN, 2011). Existem seis principais categorias de *E. coli* patogênicas: produtora de toxina Shiga (STEC), enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) e de adesão difusa (DAEC) (MATHUSA *et al.*, 2010).

Um sorotipo da classe de *E. coli* STEC é a mundialmente conhecida *E. coli* O:157H7, que possui alta virulência e é de grande relevância com relação à segurança da indústria láctea. STEC é o tipo de *E. coli* mais relacionado a doenças de origem alimentar. Seu principal fator de virulência é a produção de citotoxinas Shiga 1 e 2 (Stx1 e Stx2). Alguns sorotipos podem crescer no leite sob temperaturas de refrigeração de até 6°C, e a *E. coli* O157:H7 pode sobreviver por meses em sorvetes, frutas e carnes congeladas a -20°C. Segundo estudos publicados, cerca de 50% das cabras são portadoras de STEC de diversos sorotipos envolvidos em doença humana e sua presença é frequente em leite cru e queijos de cabra, podendo ocasionar desde diarreia branda até casos mais graves, como a síndrome hemolítica-urêmica, relacionada à anemia e falência dos rins (FARROKH *et al.*, 2013).

Estudos recentes realizados em leite bovino cru e pasteurizado detectaram presença de STEC, incluindo fenótipos resistentes e multirresistentes à antimicrobianos, além de *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter cloacae* (NTULI, NJAGE & BUYS, 2016). Ainda, é evidenciada a facilidade de se isolar *Salmonella spp.* de amostras lácteas comerciais (SARKAR, 2015).

Pesquisas na Europa avaliaram cerca de 800 amostras de leite de cabra cru, das quais cerca de 6% apresentaram STEC. A presença também foi detectada em queijos produzidos a partir do leite cru, ressaltando assim que o uso do leite cru continua sendo um importante veículo de transmissão de STEC para humanos (STEPHAN *et al.*, 2008)

2.2.2 Gênero *Pseudomonas*

Pseudomonas são bastonetes Gram-negativos ubíquos que constituem o maior gênero de bactérias encontradas em alimentos *in natura*. A presença em alimentos pode ser percebida por eventual produção de pigmentos azul-esverdeados. Algumas cepas de relevância em alimentos que eram classificadas dentro do gênero *Pseudomonas* agora pertencem a outros gêneros, como *Stenotrophomonas* e *Burkholderia* (JAY, 2005).

O gênero *Pseudomonas* é extremamente relevante na deterioração do leite cru, especialmente por serem psicrotóxicos, se multiplicando com eficiência durante o armazenamento refrigerado (crescem entre 4 e 42°C, com temperatura ótima a 20°C), e apresentarem atividade proteolítica e lipolítica. *Pseudomonas* sp. possuem uma grande diversidade genética e variedade metabólica, permitindo seu desenvolvimento em ambientes diversos, incluindo superfícies e equipamentos usados na cadeia produtiva láctea. As espécies *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *P. putida* são consideradas pela literatura como as mais relevantes no leite (SCATAMBURLO *et al.*, 2015).

Dentre os micro-organismos psicrotóxicos usualmente encontrados no leite, as espécies do gênero *Pseudomonas* possuem o menor tempo de geração a temperaturas entre 0 e 7°C, justificando sua prevalência. *P. fluorescens* é a espécie mais isolada em produtos lácteos e a que mais produz enzimas deteriorantes (FERREIRA *et al.*, 2012).

Embora os micro-organismos do gênero sejam inativados por eventuais tratamentos térmicos posteriores, as enzimas produzidas se mostram termorresistentes, resistindo até mesmo a tratamentos de temperatura ultra alta (UHT), e podem deteriorar o leite durante as etapas seguintes de armazenamento e transporte. A metaloprotease AprX é uma das enzimas produzidas, ocasionando a hidrólise da caseína, especialmente a fração κ-caseína, e resultando em importantes modificações físico-químicas e organolépticas, causando alterações na aparência, odor e sabor, instabilidade térmica e perda de rendimento na produção de queijos, além do impacto no rendimento industrial. Os efeitos causados em decorrência da deterioração provocada por *Pseudomonas* sp variam consideravelmente de acordo com cada cepa e condições de crescimento (FERREIRA *et al.*, 2012; MENG *et al.*, 2018).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* é a mais relevante do gênero do ponto de vista da saúde humana. É relacionada à infecções em pacientes com fibrose cística e altamente relacionada à infecções hospitalares, além de apresentar resistência intrínseca e adquirida a muitos antimicrobianos (MORADALI, GODS & REHM, 2017).

2.2.3 Gênero *Acinetobacter*

As bactérias do gênero *Acinetobacter* são cocobacilos Gram-negativos e se dividem em mais de 50 espécies, sendo *Acinetobacter baumannii* a de maior relevância e altamente associada à infecções hospitalares e pneumonia aspirativa. Os micro-organismos do gênero são ubíquos, podendo ser encontrados em diversos ambientes, alimentos, animais e humanos, e têm sido reportados em alimentos nos últimos anos, sendo encontrados em carnes, vegetais e lácteos (ATROUNI *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2016).

O gênero *Acinetobacter* é associado à alta taxa de mortalidade em infecções hospitalares e à expressão de multirresistência, sendo suas espécies boas competidoras na microbiota de matrizes alimentares devido à vários fatores como capacidade de formação de biofilme e sobrevivência por longos períodos em superfícies (AMORIM & NASCIMENTO, 2017^b).

Apesar de pouco relacionado à alimentos, as bactérias do gênero *Acinetobacter* já foram reportadas, embora poucas vezes, também em leite. Estudos asiáticos mostram que centenas de isolados, especialmente *A. baumannii*, de leite bovino cru apresentaram multirresistência a uma vasta gama de antibióticos (GURUNG *et al.*, 2013; TAMANG *et al.*, 2014).

Em estudo recente, cepas multirresistentes à antimicrobianos (MDR), resistentes inclusive à carpanenêmicos, do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* foram encontradas em fórmulas infantis e utensílios de lactário em hospital público no Rio de Janeiro, ressaltando o alarmante problema de saúde pública associada à este gênero (ARAÚJO *et al.*, 2015).

2.3 RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM ALIMENTOS LÁCTEOS

Em bovinos e caprinos em lactação, é usual o tratamento de mastites e outras infecções com antibióticos. Porém, o uso indiscriminado e muitas vezes sem o acompanhamento de um médico veterinário ocasiona superdosagem ou rota de administração inadequada (BELTRÁN *et al*, 2013). Ainda, pode ocorrer o uso de substâncias não adequadas para o animal em questão ou o descumprimento do tempo de não utilização do leite após a administração do medicamento, gerando resíduos no leite obtido (BELTRÁN *et al*, 2014). A associação do uso de antimicrobianos nos animais com o desenvolvimento de multirresistência pelos micro-organismos têm desencadeado estudos no sentido de buscar alternativas para o tratamento de infecções, especialmente de mastite, com o objetivo de reduzir a administração destes fármacos (KRÖMKER e LEIMBACH, 2017).

A presença de resíduos de antibióticos no leite é um problema de saúde pública que pode acarretar reações alérgicas em indivíduos sensíveis e tem efeitos negativos na microbiota intestinal humana. Ainda, estes resíduos podem causar desordens intestinais, problemas no fígado e escurecimento dos dentes. Do ponto de vista ambiental, estes resíduos de antibióticos em produtos animais acarretam na poluição do meio ambiente e da

água, além de desenvolver resistência aos micro-organismos presentes no ambiente (MOGHADAM *et al.*, 2016).

Segundo o *Codex Alimentarius*, é recomendado que quando animais leiteiros são tratados com antibióticos o leite produzido seja descartado por um período de segurança, que pode ser de dias ou semanas dependendo do medicamento. Ainda, ressalta que o tratamento e a prevenção de doenças no rebanho devem ser realizados apenas com medicamentos veterinários autorizados, visando a inocuidade e idoneidade do leite (WHO, 2018).

A Instrução Normativa nº. 62, de 29 de dezembro de 2011 do MAPA (que será revogada em Maio de 2019, sendo substituída pela IN nº. 77 de 26 de Novembro de 2018) proíbe a administração de medicamentos no animal em lactação, além de orientar que o animal que esteja sendo tratado com droga veterinária seja afastado da produção pelo período recomendado pelo fabricante da droga, com o objetivo de que não haja resíduos desta acima do permitido no leite. Ainda, exige a pesquisa periódica mensal de resíduos antibióticos em leite cru, não devendo haver presença destes em quantidade superior aos limites máximos de resíduos (LMR), especificados na **Tabela 6**. (BRASIL, 2011).

O MAPA possui uma ferramenta de gerenciamento de risco denominada Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC/Animal), onde são elaborados planos de amostragem de carnes, pescados, ovos, leite e mel, buscando contaminantes químicos, micotoxinas, agrotóxicos e drogas veterinárias, como os antimicrobianos. A ANVISA complementa o monitoramento com o Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem animal (PAMVET) (BRASIL, 2017; BRASIL, 2009)

No PNCRC 2016, foi detectada uma concentração quatro vezes maior de ivermectina do que o limite máximo de resíduo em leite bovino (concentração de 37,5 µg/L, sendo o LMR igual a 10 µg/L). Em caso de violação dos limites, são abertos programas de investigação da causa, onde a propriedade é fiscalizada e sancionada administrativamente, com o objetivo de controle futuro. Estas propriedades entram em um regime especial de testes, onde lotes são retidos até que se obtenha conformidade. No PNCRC 2017, foram encontrados resultados igualmente preocupantes, chegando a concentrações superando em dez vezes o LMR de antibióticos, como para espiramicina (concentração de 1117 µg/L, sendo o LMR de 200 µg/L), ivermectina (concentração de 38 µg/L) e cloxacilina (concentração de 305 µg/L, sendo o LMR de 30 µg/L) (BRASIL, 2018²).

Tabela 6: Limites máximos de resíduos de antimicrobianos para leite.

Grupo de antimicrobianos	Antimicrobiano	LMR ($\mu\text{g/L}$)	Referência
Beta-lactâmicos - penicilinas	Ampicilina	4	Mercosul
	Amoxicilina	4	Mercosul
	Oxacilina	30	UE
	Cloxacilina	30	UE
Beta-lactâmicos - Cefalosporinas	Cefapirina	60	UE
	Cefazolina	50	UE
	Cefoperazone	50	UE
Aminoglicosídeos	Estreptomicina	200	Mercosul
	Neomicina	500	
Macrolídeos	Eritromicina	40	Mercosul
Tetraciclina	Oxitetraciclina	100	Mercosul
	Tetraciclina		
	Clortetraciclina		
Anfenicóis	Cloranfenicol	0	Mercosul
	Tianfenicol	50	UE
Sulfonamidas	Sulfametazina	100	Mercosul
	Sulfametoxina		

Legenda – UE: União Européia. Fonte: Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem animal (PAMVET).

Para monitorar os resíduos de antibióticos em leite, são usadas técnicas imunológicas, de inibição microbiológica e instrumentais, especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência, sendo um método que apresenta facilidade de separação, identificação e quantificação de cada antibiótico separadamente. Em uma análise de dez anos de pesquisas do gênero realizadas pela comunidade científica no Brasil, foram observados resultados entre 1% e 65% de amostras positivas em leite pasteurizado e cru em várias regiões do país, utilizando-se vários métodos de quantificação, resultando em uma média de 8% de contaminação nacional (TROMBETE, SANTOS E SOUZA, 2014).

Existem alguns testes rápidos com a finalidade de detecção de antimicrobianos em produtos lácteos, dentre eles, o Delvotest®, referência mundial no ramo. O Delvotest® T se baseia em micro tubos contendo meio de cultura sólido com glicose e púrpura de bromocresol, onde são pré-inoculados esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, espécie

esta que apresenta alta sensibilidade especialmente aos antibióticos beta-lactâmicos (ROMERO *et al*, 2014). Com a adição da amostra com substância antimicrobiana, os esporos não germinarão e a aparência de coloração arroxeadada do meio de cultura se manterá. Na condição de não haver substância inibitória, o esporo germinará e produzirá ácido decorrente da fermentação da glicose, alterando o pH do meio e consequentemente sua coloração para amarelo (**Figura 5**) em virtude da presença do indicador de pH púrpura de bromocresol (BION *et al*, 2016).



Figura 5: Interpretação de resultados do teste DelvoTest® T. As colorações roxa e amarela, representam, respectivamente, presença e ausência de resíduos. Este teste se aplica a uma grande variedade de tipos de leite (ovelha, vaca, cabra, búfala) e é capaz de detectar resíduos de substâncias antimicrobianas em geral, incluindo sulfonamidas. Apresenta limites de sensibilidade definidos para Penicilina, sulfodiazina e oxitetraciclina. (Fonte: http://www.carbon.ie/contentfiles/delvotest%20sp%20nt%20procedure_en.pdf)

Os resíduos de antibióticos no leite não são eliminados termicamente por processos de beneficiamento, representando assim perigos químicos e deficiência tecnológica nos derivados eventualmente produzidos com a matéria prima contaminada, pois as culturas eventualmente empregadas são inibidas. Por trás do uso indiscriminado de antibióticos nos animais, ainda pode ocorrer a adição proposital desses medicamentos, com o objetivo de encobrir a qualidade sanitária do produto e aumentar seu prazo de validade (SANTOS, CRUZ e BRANDÃO, 2015).

Outro fato preocupante consiste na venda de leite sem inspeção governamental, principalmente em cidades pequenas. No país, há uma tendência de aumento no consumo de leite orgânico, pois é livre de resíduos antibióticos, já que os animais não podem ser tratados com estes medicamentos. Porém, estudo recente indicou contaminação por

antibióticos em leite orgânico, indicando necessidade de supervisão destes produtores (TROMBETE, SANTOS E SOUZA, 2014).

2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS BACILOS GRAM-NEGATIVOS

2.4.1 Resistência à antimicrobianos

Um microrganismo pode ser classificado de acordo com a quantidade de classes de antibióticos a qual apresenta resistência. Um isolado é classificado como multirresistente à antimicrobianos (MDR) quando não é suscetível a pelo menos um antibiótico de três classes diferentes, enquanto um isolado extensivamente multirresistente (XDR) não é suscetível a pelo menos um antimicrobiano de todas as classes, com exceção de duas. Ainda, um isolado pan-resistente (PDR) não é suscetível a um antimicrobiano de todas as classes definidas. Para cada grupo ou gênero de micro-organismos, são definidas classes e antimicrobianos específicos de maior relevância. Ainda, é importante o conceito de resistência intrínseca, no qual determinadas espécies microbianas apresentam resistência natural à determinados antibióticos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Para se avaliar a condição de resistência de um isolado, o método mais utilizado é a difusão em disco, onde discos impregnados com antimicrobianos são inseridos em placas com ágar Mueller Hinton e após a incubação, são produzidos halos de inibição de crescimento, sendo estes relacionados com o padronizado pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) para cada grupo de micro-organismos (CLSI, 2018).

A evolução da resistência microbiana vem crescendo e os medicamentos para tratamento de infecções estão cada vez mais escassos, visto que a indústria farmacêutica não consegue acompanhar o ritmo dessa evolução com relação à criação de novos antibióticos. A disseminação de micro-organismos multirresistentes é acentuada por controle ineficaz destes, pelo uso indiscriminado de antimicrobianos e pela pressão seletiva (sobrevivência contínua das cepas resistentes, fazendo com que estas se tornem maioria em determinado ambiente) associada ao uso de antibióticos, favorecendo determinados genes (PATZER *et al.*, 2015). Muitos genes de resistência são localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos conjugativos (moléculas circulares de DNA que atuam principalmente em funções adaptativas) e transposons (segmentos de DNA que se deslocam de um sítio a outro dentro do genoma), permitindo uma rápida disseminação da resistência entre as bactérias (SKOČKOVÁ *et al.*, 2015).

Os bacilos Gram-negativos apresentam resistências intrínsecas e adquiridas a antimicrobianos, sendo estas determinadas tanto por mutações cromossômicas quanto por transferência de genes entre diferentes espécies (HERNÁNDEZ-GÓMEZ *et al.*, 2013).

As classes de antibióticos mais utilizadas no tratamento de patógenos e conseqüentemente nos testes de difusão em disco, são os beta-lactâmicos, tetraciclina, fenicóis, quinolonas e aminoglicosídeos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem) são a classe de antibióticos mais usados no tratamento de infecções causadas por micro-organismos patogênicos da família *Enterobacteriaceae* produtores de enzimas inativadoras de antimicrobianos, especialmente *E. coli* e *Klebsiella sp.* Esta classe de fármacos pertence ao grupo dos antibióticos β -lactâmicos, que além dos carbapenêmicos, abrange as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, como ilustrado na **Figura 6** (GAZIN *et al.*, 2012).

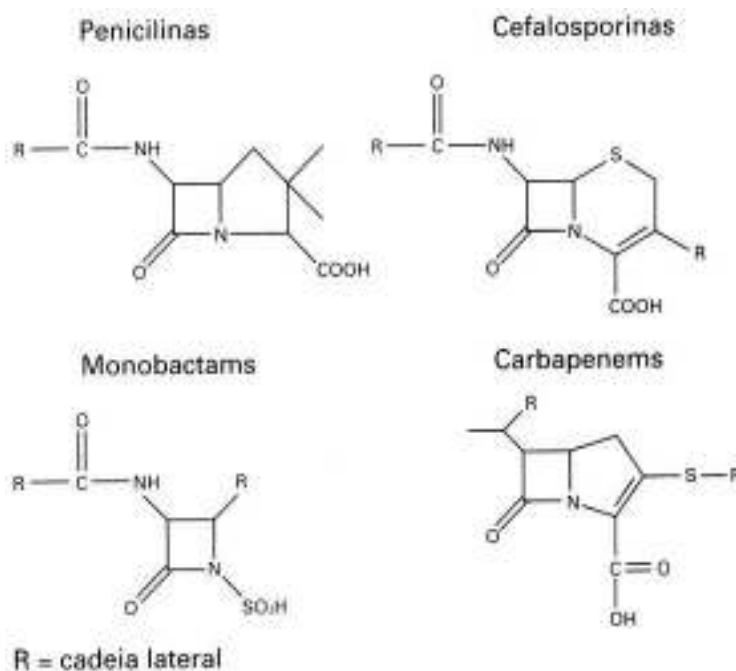


Figura 6: Subclasses da classe de antibióticos beta-lactâmicos. Fonte: Williams (1999).

Nos últimos anos tem se observado um problema de saúde pública mundial, onde cada vez mais estudos revelam enterobactérias MDR, incluindo produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que são capazes de hidrolisar os antibióticos beta-lactâmicos, incluindo as cefalosporinas de terceira e quarta geração e os monobactams (BRASIL, 2013). A enzima β -lactamase hidrolisa o anel β -lactâmico dos antimicrobianos, que é a estrutura responsável pela atividade bactericida. O mecanismo de inativação é ilustrado na **Figura 7**. A β -lactamase de espectro estendido é capaz de hidrolisar

cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos e o gene responsável pela produção da enzima é facilmente transferido entre os micro-organismos (SKOČKOVÁ *et al.*, 2015).

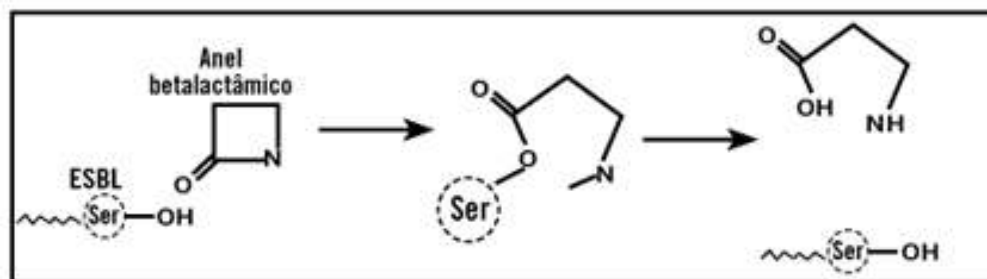


Figura 7: Mecanismo de hidrólise de antibiótico beta-lactâmico por ESBL. Um aminoácido presente na enzima (serina) se liga ao oxigênio da dupla ligação do anel beta-lactâmico, rompendo sua cadeia fechada. Legenda: Ser – serina. Fonte: adaptado de Livermore (1995).

Já as enzimas carbapenemases, em especial as *Klebsiella Pneumoniae* carbapenemases (KPC), são capazes de hidrolisar também os carbapenêmicos, além dos demais β -lactâmicos (BRASIL, 2013).

Infecções com enterobactérias MDR, especialmente as produtoras de ESBL e KPC, são associadas a alta taxa de mortalidade e longa permanência em hospitais. Essas infecções geralmente são relacionadas ao sistema urinário (BHAT, MULKI e RAMAMURTHY, 2017).

Em estudos recentes, verificou-se a presença de EPEC, EAEC e EHEC em leite, das quais grande parte apresentou resistência à ampicilina e carbenicilina, pertencentes à sub-classe das penicilinas na classe dos beta-lactâmicos. Ainda, foi verificada a produção de ESBL, indicando que podem ocorrer mecanismos de transferência gênica e consequente propagação da multirresistência à antimicrobianos entre os micro-organismos presentes (HINTHONG *et al.*, 2017; IBRAHIM *et al.*, 2016).

Em avaliação de psicrotróficos isolados de leite cru, membros da família *Enterobacteriaceae* (*Serratia marcescens* e *Hafnia alvei*) e diversas espécies do gênero *Pseudomonas* apresentaram altas taxas de resistência à diferentes classes de antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos (DECIMO, SILVETTI & BRASCA, 2016).

2.4.2 Produção de biofilme

Na cadeia de produção alimentar, superfícies industriais úmidas se revelam como ótimos ambientes de desenvolvimento de micro-organismos, que se organizam

especialmente em uma estrutura denominada biofilme. A maioria dos micro-organismos patogênicos são capazes de formar biofilme, em uma grande variedade de materiais e condições ambientais das plantas de produção. São usualmente detectados, na indústria láctea e de ovos, biofilmes formados por *E. coli*, *S. aureus* e os gêneros *Shigella*, *Pseudomonas* e *Listeria*. Os biofilmes relacionados à alimentos são polimicrobianos, pois não há ambiente estéril como na produção de medicamento, por exemplo. (BRIDIER *et al*, 2015).

O biofilme pode ser definido como uma comunidade bacteriana imersa em uma matriz polimérica produzida pelos próprios micro-organismos, composta de DNA extracelular, proteínas, polissacarídeos e água. A adesina intercelular polissacarídica é o componente mais relacionado à adesão das células. Um estudo realizado em planta de produção de lácteos caprinos revelou a capacidade de micro-organismos do gênero *Staphylococcus* produzirem biofilme (LIRA *et al.*, 2015).

A formação do biofilme se dá por meio de etapas sequenciais: adesão, expansão, maturação e dispersão, como exibido na **Figura 8**. Inicialmente, o micro-organismo formador de biofilme aumenta sua população e se adere à superfície por meio de flagelos e pili. O desenvolvimento do biofilme se inicia com ligações com a superfície, podendo estas serem reversíveis (forças de *Van der Waals*, forças eletrostáticas ou interações hidrofóbicas) ou irreversíveis (forças dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio ou ligação covalente). A partir disto, as células produzem o material polimérico, formando um aglomerado tridimensional. Com o biofilme maturado, células se desligam do aglomerado e retornam ao ambiente (COUGHLAN *et al*, 2016).

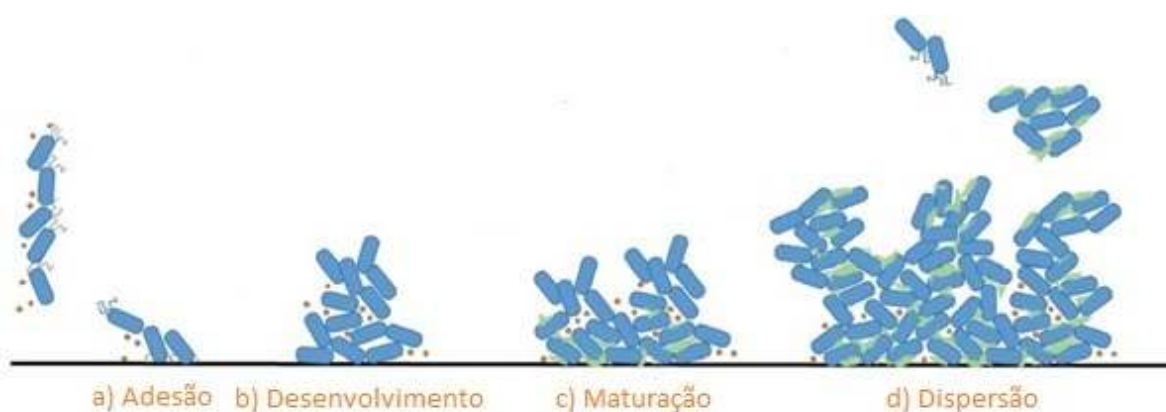


Figura 8: Mecanismo de formação do biofilme. a) com uma alta densidade populacional, as células se aderem à superfície na etapa de adesão. b) no desenvolvimento, as células se multiplicam e podem aderir irreversivelmente, desenvolvendo a estrutura do biofilme. c) na etapa de maturação, formam-se aglomerados tridimensionais e ocorre a produção da matriz

polimérica. d) na dispersão, células retornam ao ambiente de entorno da superfície (Fonte: Adaptado de COUGHLAN *et al*, 2016).

A matriz polimérica exerce função fundamental no processo, concentrando nutrientes para consumo das células, exercendo resistência física contra antimicrobianos e prevenindo a dessecação do aglomerado (COUGHLAN *et al*, 2016).

Além de ser uma potencial fonte de contaminação, o biofilme ainda pode aumentar a velocidade de corrosão do material, reduzir a transferência de calor e aumentar o fator de atrito do fluido em escoamento, além de poder causar um bloqueio mecânico na tubulação da planta de processo. No caso específico de produtos lácteos, são frequentemente reportadas ocorrências de biofilme nas linhas de produto, tanques de estocagem, trocadores de calor e sistemas de separação, como ultrafiltração e sistema de osmose reversa (MOGHA *et al.*, 2014).

Patógenos de importância em alimentos são frequentemente associadas à formação de biofilme relacionado à produtos lácteos, como STEC, sendo o sorotipo O157:H7 ou não. É importante realizar estudo de eficiência dos sanitizantes que serão empregados na planta industrial, pois sabe-se que se usados da maneira correta e em concentrações adequadas, apresentam resultados satisfatórios. Do contrário, serão removidas apenas as células superficiais do biofilme (LIMA *et al.*, 2015).

Além do controle químico, existem técnicas mecânicas e biológicas sendo estudadas com o objetivo de evitar e eliminar a ocorrência de biofilme, como a injeção de ar, aplicação de bacteriófagos e uso de produtos enzimáticos (MOGHA *et al.*, 2014).

2.4.3 Atividade proteolítica e lipolítica

Enquanto micro-organismos são inativados nos processos térmicos utilizados no leite, como pasteurização e aplicação de UHT, enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis continuam viáveis. A atividade dessas enzimas altera as propriedades do leite e de seus derivados (BAUR *et al.*, 2015).

O ato de refrigerar o leite imediatamente após a ordenha tem como objetivo inativar os micro-organismos mesófilos deteriorantes. Porém, longos períodos de refrigeração possibilitam a produção de lipases e proteases pelos micro-organismos psicrotófilos, principalmente do gênero *Pseudomonas*, que resistirão aos tratamentos térmicos subsequentes.

A atividade lipolítica se baseia na ação de lipases nos triglicerídeos, gerando um sabor amargo e odor desagradável, em decorrência da formação de ácidos graxos de

cadeia curta. Esta atividade é altamente associada à *Pseudomonas* sp. (CAPODIFOGGIO *et al.*, 2016).

As proteases, por sua vez, catalisam a degradação das moléculas de proteína em peptídeos e aminoácidos. Assim, no leite, as micelas de caseína são hidrolisadas, levando à desestabilização do produto tratado termicamente. Essas enzimas possuem uso industrial, nas áreas farmacêutica, alimentícia e de produtos de limpeza, correspondendo à 60% da demanda enzimática mundial. Ainda, são importantes fatores de virulência de alguns patógenos, propiciando sua sobrevivência no hospedeiro (ABED, AUTHMAN e YASSEIN, 2016).

A principal protease produzida por *Pseudomonas* é a metaloprotease, expressada pelo gene AprX. Tem sua importância especialmente no leite, pois a disponibilidade de cálcio torna a desnaturação da enzima mais difícil, conferindo uma maior resistência térmica (STOECKEL *et al.*, 2016).

Os micro-organismos da família *Enterobacteriaceae* também são capazes de produzir proteases e lipases frequentemente associados à deterioração de produtos lácteos. Além da desestabilização dos constituintes, ocorre alteração sensorial de cor, sabor, odor e textura, interferindo diretamente na aceitabilidade do produto pelo consumidor (AMORIM e NASCIMENTO, 2017^a).

3 JUSTIFICATIVA

Produtos lácteos são consumidos mundialmente e em todas as classes sociais, sendo que o consumo de leite caprino se mostra em ascensão à nível mundial, devido à sua menor alergenicidade e melhor digestibilidade comparativamente ao leite bovino.

Ainda que controverso, ainda existe o consumo do leite cru por muitas pessoas, inclusive idosos e crianças, e este tipo de produto é encontrado com certa facilidade no comércio de cidades menores sem nenhum tipo de inspeção. Por suas condições de produção e consumo, o leite caprino cru pode se revelar como um potencial reservatório de bacilos Gram-negativos, como espécies da família *Enterobacteriaceae*, incluindo patógenos como *E. coli* e *Salmonella* sp., e como membros do gênero *Pseudomonas*, associados à produção de enzimas que afetam drasticamente a qualidade do leite.

Com o crescimento da produção e conseqüente redução das áreas de criação e aglomeração dos animais, tornaram-se mais frequentes as infecções e verminoses. Assim, com o maior uso de antibióticos durante a criação, torna-se importante avaliar eventuais resíduos nos produtos finais, considerando que a presença destas substâncias pode acarretar efeitos graves na saúde humana e problemas na produção de derivados.

Grande parte dos bacilos Gram-negativos costumam apresentar fenótipos de resistência à antimicrobianos, se mostrando como um grande perigo à saúde humana, onde os tratamentos se tornam muito mais trabalhosos e invasivos, causando alta taxa de mortalidade especialmente em indivíduos imunocomprometidos.

Assim, é revelada a importância de se avaliar a resistência e multirresistência a antibióticos usualmente utilizados no tratamento de infecções, assim como relacionar estes resultados com eventuais resíduos de antibióticos no produto final.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo realizar a identificação e a caracterização de bacilos Gram-negativos, especialmente enterobactérias e o gênero *Pseudomonas*, isoladas de leite caprino cru oriundo de diferentes regiões do Estado do Rio de Janeiro, associando os resultados com a presença de resíduos de antibióticos nestes alimentos e avaliando a qualidade microbiológica e físico-química do produto.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento e a identificação de bacilos Gram-negativos em amostras de leite caprino cru obtidas no Estado do Rio de Janeiro;
- Realizar contagem de bactérias aeróbias mesófilas e de bacilos Gram-negativos para avaliação da qualidade do leite caprino cru;
- Determinar perfil de resistência a antibióticos dos isolados encontrados;
- Avaliar a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemases (KPC) nos isolados;
- Caracterizar os isolados com relação à produção de biofilme, de proteases e lipases;
- Investigar a presença de resíduos de antibióticos nas amostras de leite caprino cru;
- Avaliar a relação entre a resistência ou multirresistência antimicrobiana com a presença de resíduos de antimicrobianos nas amostras de leite de cabra;
- Caracterizar físico-quimicamente as amostras estudadas, avaliando possíveis relações com os resultados microbiológicos e comparando com o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) do produto.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM

Foram utilizadas 21 amostras de leite de cabra cru (**Tabela 7 e Figura 9**), adquiridas a partir de oito produtores do Estado do Rio de Janeiro (havendo amostras de cabras diferentes, mas do mesmo produtor) e transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Microbiologia do IFRJ, em curto espaço de tempo. A coleta de amostras foi realizada em dois períodos (Março e Agosto de 2018). Antes de iniciar os procedimentos, foi realizada a desinfecção das embalagens.

Tabela 7: Procedência das amostras de leite de cabra cru utilizadas e períodos de coleta

Amostra	Procedência (Bairro/município)	Tipo de fornecedor	Período de coleta
01	Centro / Santo Antônio de Pádua	Estabelecimento comercial	Fevereiro/2018
02	Taquara / Rio de Janeiro	Estabelecimento comercial	Março/2018
03	Taquara / Rio de Janeiro	Estabelecimento comercial	Março/2018
04	Jardim da Aldeia / Itaocara	Produtor	Março/2018
05	Porto das Barcas / Aperibé	Produtor	Março/2018
06	Recanto das Palmeiras / Cordeiro	Produtor	Março/2018
07	Vargem Pequena / Rio de Janeiro	Estabelecimento comercial	Março/2018
08	Vargem Pequena / Rio de Janeiro	Estabelecimento comercial	Março/2018
09	Vargem Pequena / Rio de Janeiro	Estabelecimento comercial	Março/2018
10	Taquara / Rio de Janeiro	Estabelecimento comercial	Março/2018
11	Taquara / Rio de Janeiro	Estabelecimento comercial	Março/2018
12	Jardim da Aldeia / Itaocara	Produtor	Março/2018
13	Jardim da Aldeia / Itaocara	Produtor	Agosto/2018
14	Cidade Nova / Santo Antônio de Pádua	Produtor	Agosto/2018
15	Cidade Nova / Santo Antônio de Pádua	Produtor	Agosto/2018
16	Recanto das Palmeiras / Cordeiro	Produtor	Agosto/2018
17	Recanto das Palmeiras / Cordeiro	Produtor	Agosto/2018
18	Recanto das Palmeiras / Cordeiro	Produtor	Agosto/2018
19	Centro / Santo Antônio de Pádua	Estabelecimento comercial	Agosto/2018
20	Centro / Santo Antônio de Pádua	Estabelecimento comercial	Agosto/2018
21	Porto das Barcas / Aperibé	Produtor	Agosto/2018

Legenda: Produtor – amostra retirada diretamente com o produtor no local de criação dos animais. Estabelecimento comercial – amostra adquirida em pequenos estabelecimentos, com venda informal do leite de cabra cru, podendo ser no mesmo local de criação do animal ou próximo.

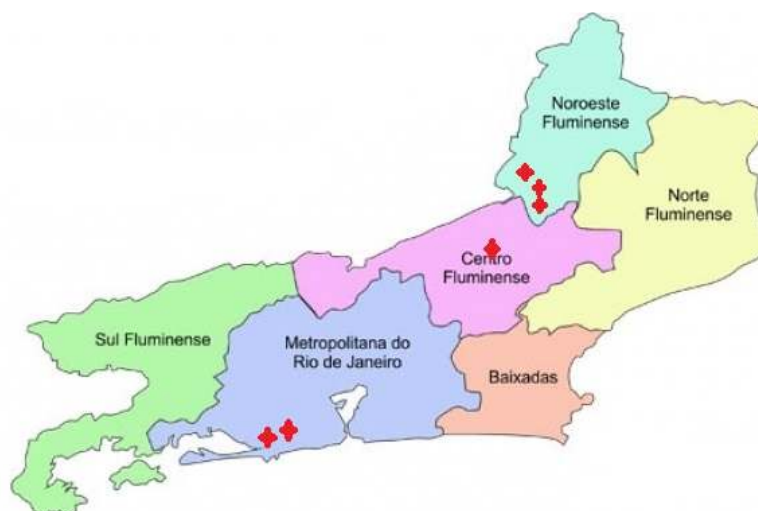


Figura 9: Mapa de amostragem de leite de cabra cru coletados no Estado do Rio de Janeiro. As cruzes indicam as regiões onde houve coleta de amostras.

5.2 CONTAGEM DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS E ENTEROBACTÉRIAS TOTAIS

Para avaliação da qualidade das amostras de leite caprino cru, foi realizada a contagem de bactérias aeróbias mesófilas. De cada amostra foram retirados 25 mL para inserção em 225 mL de água peptonada (BIOCEN, São Paulo) 0,1% e posteriormente foram realizadas diluições seriadas até a diluição 10^{-3} em tubos de ensaio com rosca utilizando o mesmo diluente. A partir das diluições, foram feitas inoculações em Ágar Padrão para Contagem (PCA), pela técnica de “*Spread Plate*”, e as placas, em duplicata, foram incubadas à 35°C por 48h. Para a contagem de enterobactérias totais, seguiu-se o mesmo procedimento inicial descrito anteriormente, com posterior inoculação em ágar VRBG (Kasvi, São Paulo), meio de cultura seletivo e diferencial e preparado com no máximo três horas de antecedência, também pela técnica de semeadura em superfície. Um ensaio em branco sempre foi realizado para cada dia de análise. Estes procedimentos são os indicados pela Instrução Normativa N° 62 (BRASIL, 2003).

5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS

As colônias típicas provenientes das placas de ágar VRBG (coloração rósea com halo) e atípicas, em média quinze por amostra, foram inoculadas em ágar Triptona de soja (Casoy, BIOCEN, São Paulo) para ganho de massa, e posteriormente, armazenados sob congelamento em criotubos com caldo Casoy (Merck, São Paulo) e glicerol (Merck, São Paulo) a 40%.

A identificação dos isolados foi realizada em espectrômetro de massas MALDI-TOF (Microflex LT, Bruker, Estados Unidos), no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para isto, as culturas bacterianas semeadas em ágar Casoy foram inseridas em duplicata na placa metálica própria do equipamento, com posterior adição de 1 µl de ácido fórmico 70% para que ocorra a lise celular. Após a secagem do ácido, foi inserido o mesmo volume de matriz, que se mostrou cristalizada ao final do processo. Assim, a placa foi inserida no equipamento previamente calibrado com uma cepa controle de *E. coli*, e a identificação de cada isolado foi gerada pelo software Biotype 3.1.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

Para execução da caracterização dos isolados, estes foram previamente transferidos para ágar Casoy, à 37 °C por 24 horas. A partir deste, foram inoculados conforme os métodos descritos nas seções seguintes.

5.4.1 Avaliação qualitativa de produção de biofilme

Os isolados foram estriados sobre a superfície de ágar vermelho congo, formulado a partir de 15 g/L de ágar nutriente (Merck, São Paulo), 37 g/L de sacarose (Pro Análisi, São Paulo) e 0,8 g/L de vermelho congo (VETEC, Rio de Janeiro), conforme indicado por FREEMAN, FALKINER e KEANE (1989), com incubação à 37 °C por 24 horas.

Neste método, as colônias produtoras de biofilme se apresentam de coloração negra, podendo tingir o ágar ao redor de negro. Os isolados de produção negativa, se revelam incolores ou avermelhados. Este método produz resultados satisfatórios apenas para bactérias Gram-negativas.

5.4.2 Avaliação de atividade proteolítica

O estriamento dos isolados foi feita em ágar leite, com o objetivo de se observar a hidrólise da caseína do leite por eventuais proteases produzidas pelo micro-organismo, evidenciada por halo ao redor das colônias. O ágar é preparado com 10% de leite em pó integral (Itambé, Minas Gerais) e 2% de ágar-ágar (Merck, São Paulo), sendo autoclavado por apenas 5 minutos para evitar possível caramelização do leite.

Após o meio ser vertido em placas e devidamente inoculado em superfície, este foi incubado à 37 °C por 18-24 horas (MINOTTO *et al.*, 2014).

5.4.3 Avaliação de atividade lipolítica

Os isolados foram estriados em placas contendo ágar Spirit Blue [1% de peptona (Himedia, Estados Unidos), 0,05% de extrato de levedura (Becton Dickinson, Estados Unidos), 2% de ágar-ágar e 970 mL de água destilada], onde após autoclavação e resfriamento à 55 °C, foi adicionado o reagente lipase em 3% [12 mL de azeite de oliva (Borges, Brasil), 0,12 mL de Tween 80 (Proquimios, Rio de Janeiro) e 17,9 mL de água destilada]. As placas foram incubadas a 37°C por 18 – 24 horas e foi observada a presença de halo, indicando a degradação lipídica por meio da produção de lipases pelo micro-organismo em questão (BECTON, DICKINSON AND COMPANY, 2009).

5.4.4 Perfil de resistência à antimicrobianos

Para a determinação do perfil de resistência à antimicrobianos, foi utilizado o método de difusão em disco, seguindo a metodologia descrita em *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

Partindo do isolado previamente crescido em ágar Casoy, a massa bacteriana foi transferida para tubos contendo solução salina (cloreto de sódio, Alphatec, Rio de Janeiro) a 0,85% (p/v) até obtenção de turvação similar à Escala 0,5 de Mcfarland.

Os isolados foram semeados em ágar Mueller Hinton (Himedia, Estados Unidos) com o auxílio de *swabs* descartáveis, a fim de que toda a superfície da placa fosse inoculada. Logo após, os discos de antibióticos (CEFAR, São Paulo; DME, São Paulo) de diferentes classes indicadas no método para micro-organismos dos gêneros encontrados foram colocados sobre a superfície das placas com auxílio de pinça, respeitando o limite máximo de seis discos por placa. As placas foram incubadas conforme as condições de tempo e temperatura indicadas pelo manual do CLSI para cada gênero. Os halos formados após o

tempo de incubação, relativos à sensibilidade ou resistência à cada antimicrobiano, são interpretados de acordo com as recomendações do método (CLSI, 2018).

Para avaliação de enterobactérias, foram utilizados 22 antibióticos de nove classes diferentes, indicados na **Tabela 8**. Os micro-organismos foram classificados como multirresistentes quando apresentaram condição de resistência a pelo menos três antibióticos de classes diferentes (MAGIORAKOS *et al.*, 2012). As **Tabelas 9, 10 e 11** apresentam os antibióticos utilizados para os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter* e para a espécie *Stenotrophomonas maltophilia*.

Tabela 8: Antibióticos empregados para avaliação de resistência de micro-organismos da família *Enterobacteriaceae*

Classe	Antibiótico	Código
Carbapenêmicos	Ertapenem 10 µg	ERT
	Meropenem 10 µg	MER
	Imipenem 10 µg	IPM
Penicilinas	Ampicilina 10 µg	AMP
Cefalosporinas - 1ª geração	Cefazolina 30 µg	CFZ
Cefalosporinas - 2ª geração	Cefuroxima 30 µg	CRX
	Cefoxitina 30 µg	CFO
Cefalosporinas - 3ª geração	Cefotaxima 30 µg	CTX
	Caftazidima 30 µg	CAZ
Cefalosporinas - 4ª geração	Cefepime 30 µg	CPM
Monobactâmicos	Aztreonama 30 µg	ATM
Tetraciclina	Tetraciclina 30 µg	TET
Quinolonas	Ciprofloxacino 5 µg	CIP
	Levofloxacino 5 µg	LVX
	Ácido Nalidíxico 30 µg	NAL
Aminoglicosídeos	Gentamicina 10 µg	GEN
	Tobramicina 10 µg	TOB
Fenicóis	Cloranfenicol 30 µg	CLO
Combinações de Beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases	Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10 µg	AMC
	Piperaciclina + Tazobactam 100/10 µg	PPT
	Ampicilina + Sulbactam 10/10 µg	ASB
	Ticarciclina + Ácido Clavulânico 75/10 µg	TAC

Tabela 9: Antibióticos empregados para avaliação de resistência de micro-organismos do gênero *Pseudomonas*

Classe	Antibiótico	Código
Carbapenêmicos	Meropenem 10 µg	MER
	Imipenem 10 µg	IPM
Cefalosporinas - 3a geração	Caftazidima 30 µg	CAZ
Cefalosporinas - 4a geração	Cefepime 30 µg	CPM
Monobactâmicos	Aztreonama 30 µg	ATM
Quinolonas	Ciprofloxacino 5 µg	CIP
	Levofloxacino 5 µg	LVX
Aminoglicosídeos	Gentamicina 10 µg	GEN
	Tobramicina 10 µg	TOB
Combinações de Beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases	Piperaciclina + Tazobactam 100/10 µg	PPT

Tabela 10: Antibióticos empregados para avaliação de resistência de micro-organismos do gênero *Acinetobacter*

Classe	Antibiótico	Código
Carbapenêmicos	Meropenem 10 µg	MER
	Imipenem 10 µg	IPM
Cefalosporinas - 3a geração	Cefotaxima 30 µg	CTX
	Caftazidima 30 µg	CAZ
Cefalosporinas - 4a geração	Cefepime 30 µg	CPM
Quinolonas	Ciprofloxacino 5 µg	CIP
	Levofloxacino 5 µg	LVX
Aminoglicosídeos	Gentamicina 10 µg	GEN
	Tobramicina 10 µg	TOB
Combinações de Beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases	Piperaciclina + Tazobactam 100/10 µg	PPT
	Ampicilina + Sulbactam 10/10 µg	ASB
	Ticarclina + Ácido Clavulânico 75/10 µg	TAC

Tabela 11: Antibióticos empregados para avaliação de resistência de *Stenotrophomonas maltophilia*

Classe	Antibiótico	Código
Cefalosporinas - 3a geração	Caftazidima 30 µg	CAZ
Quinolonas	Levofloxacino 5 µg	LVX
Fenicóis	Cloranfenicol 30 µg	CLO
Combinações de Beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases	Ticarciclina + Ácido Clavulânico 75/10 µg	TAC

5.4.5 Fenótipos de produção de ESBL e KPC

Para avaliação dos fenótipos produtores de KPC e ESBL, foram utilizados testes rápidos utilizando os meios de cultura cromogênicos CHROMagar®KPC e CHROMagar®ESBL, adquiridos em placas prontas para uso. O material foi incubado a 37°C por 18-24 horas. Os resultados foram interpretados de acordo com instruções do fabricante, indicados na **Tabela 12**. Caso haja correspondência da aparência da colônia com a identificação do isolado, este se confirma como produtor da enzima em questão (ESBL ou KPC, de acordo com o meio utilizado).

Tabela 12: Padrão de colônias típicas observadas nos meios cromogênicos

Micro-organismo	CHROMagar®KPC	CHROMagar®ESBL
<i>Escherichia coli</i>	Colônias rosas ou avermelhadas	Colônias rosas ou avermelhadas
<i>Enterobacter sp.</i>	Colônias azul metálico com ou sem halo avermelhado	Colônias azul metálico com ou sem halo avermelhado
<i>Klebsiella / Raoultella sp.</i>	Colônias azul metálico com ou sem halo avermelhado	Colônias azul metálico com ou sem halo avermelhado
<i>Acinetobacter sp.</i>	Colônias de coloração creme	Colônias de coloração creme
<i>Pseudomonas sp.</i>	Colônias translúcidas, com ou sem pigmentação creme ou esverdeada	Colônias translúcidas, com ou sem pigmentação creme ou esverdeada
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	Colônias incolores	Colônias incolores

Fonte: <http://www.chromagar.com/>

5.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DAS AMOSTRAS DE LEITE CAPRINO CRU

Todos os parâmetros físico-químicos foram determinados de acordo com as metodologias indicadas no manual de Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008) e realizados no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense (UFF).

5.5.1 Determinação de pH

O valor de pH foi determinado com auxílio de pHmetro (Tecnal, São Paulo) com eletrodo de vidro, previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,00 e 7,00 (Nalgon, São Paulo), onde 30mL da amostra foram dispostos em becher de vidro, com medição de temperatura e respectivo ajuste no equipamento antes da aferição do valor de pH.

5.5.2 Determinação de acidez

Foi realizado o procedimento de determinação de acidez em ácido láctico. Para isto, foram transferidos 10 mL de amostra para um erlenmeyer de 125 mL, por meio de pipeta volumétrica, com adição de 5 gotas de solução indicadora de fenolftaleína (VETEC, Rio de Janeiro) 1% em meio alcoólico.

Cada amostra foi titulada em duplicata com solução de hidróxido de sódio (NaOH, VETEC, Rio de Janeiro) 0,1 M, previamente fatorada com biftalato de potássio (VETEC, Rio de Janeiro). Para a titulação foi utilizada bureta de 10 mL, até o aparecimento de coloração rósea, indicando a viragem do indicador. A porcentagem de acidez em ácido láctico é calculada pela fórmula:

$$\% \text{ ácido láctico (m/v)} = \frac{v \times f \times 0,9}{a}$$

Onde:

v = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação

f = fator da solução de hidróxido de sódio

0,9 = fator de conversão para ácido láctico

a = volume de amostra utilizado (10 mL)

5.5.3 Determinação do percentual de gordura

A determinação de gordura foi realizada pelo método de Gerber. Em lactobutirômetros (Funke Gerber, Alemanha), foram inseridos 10 mL de ácido sulfúrico (ISO FAR, Rio de Janeiro) previamente diluído, resultando em densidade 1,8 (o uso de ácido concentrado acarretaria na total carbonização da amostra), 11 mL da amostra de leite e 1 mL de álcool isoamílico (Synth, São Paulo). As adições foram realizadas cuidadosamente, sem que houvesse queima imediata da amostra ao contato com o ácido, formando três camadas visualmente distintas e agitando após a colocada da rolha até a total dissolução da amostra.

Procedeu-se à centrifugação em centrífuga de Gerber (Caplab, São Paulo), a 1200 rpm por cinco minutos, e posterior inserção em banho maria (ITR, São Paulo) a 65 °C. Ao retirar o lactobutirômetro do banho, foi realizada a leitura da coluna de gordura diretamente na escala. Caso não fosse possível efetuar a leitura, eram inseridos mais 2 mL de álcool isoamílico e os processos repetidos, com o objetivo de subir a coluna de gordura até a escala.

5.5.4 Determinação do extrato seco total

A determinação do extrato seco total foi realizada pelo método de resíduo seco a 105 °C. Em cápsulas de porcelana, foram adicionadas cerca de 10 g de areia previamente lavada e um bastão de vidro de pequeno comprimento. As cápsulas foram mantidas em estufa (FANEM, São Paulo) a 105 °C por 2 horas, resfriadas por 15 minutos em dessecador com sílica e posteriormente pesadas em balança analítica (Shimadzu do Brasil, São Paulo). A transferência das cápsulas entre estufa, dessecador e balança foi realizada com pinça metálica, com o objetivo de não transferir eventual gordura das mãos para a porcelana e assim alterar seu peso.

Foram reservadas três cápsulas para cada amostra (análise em triplicata), onde foram inseridos 5 mL de amostra, por meio de pipetas volumétricas, com posterior registro de peso. Os bastões de vidro dispostos nas cápsulas foram utilizados para homogeneizar a amostra com a areia, com o objetivo de aumentar a superfície de contato na secagem.

As cápsulas com amostra foram submetidas à banho-maria fervente para secagem inicial, e transferidas para estufa a 105 °C por uma hora. Após, foram resfriadas em dessecador e pesadas, retornando para a estufa por 30 minutos e repetindo-se o ciclo até a obtenção de peso constante.

O extrato seco total se dá pela porcentagem relativa à massa restante da amostra após os ciclos de secagem, ou seja, a diferença percentual em relação à umidade.

5.5.5 Determinação do extrato seco desengordurado

O extrato seco desengordurado é expresso em porcentagem e calculado pela diferença entre o extrato seco total e o percentual de gordura obtidos experimentalmente.

5.5.6 Determinação do teor de lactose

Foi realizada a determinação de glicídios redutores em lactose pelo método de Fehling. Foram adicionados 10 mL de amostra em balão volumétrico de 100 mL, por meio de pipeta volumétrica, juntamente com 50 mL de água destilada e 2mL das soluções clarificantes: sulfato de zinco (Quimex, Minas Gerais) a 30% e ferrocianeto de potássio (Proquimios, Rio de Janeiro) a 15%. Estas soluções tem o objetivo de precipitar componentes da amostra que atrapalhariam o processo, deixando a solução da amostra límpida.

Após a adição, aguardou-se por cinco minutos até que ocorresse a sedimentação dos componentes indesejáveis e após isso completou-se o volume do balão. A solução de amostra proveniente do balão foi filtrada em papel de filtro por meio de um funil de vidro e o filtrado límpido foi recolhido em um bécher. Com este filtrado, foi completada uma bureta de 25 mL.

A solução de Fehling A foi preparada pela diluição de 34,639 g de sulfato de cobre (CuSO_4 , VETEC, Rio de Janeiro) em 1000mL de água destilada. A solução de Fehling B foi preparada com 173 g de tartarato duplo de sódio e potássio (VETEC, Rio de Janeiro) em 250 mL de água destilada, com adição de 250mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 20%. O volume foi completado a 1000 mL em balão volumétrico.

Para a padronização das soluções de Fehling, foram preparados erlenmeyers com 10 mL das soluções de Fehling A e B, 40 mL de água destilada e pérolas de vidro. Adicionalmente, preparou-se uma solução padrão de lactose (VETEC, Rio de Janeiro) a 1% e procedeu-se à titulação à quente, mantendo o conteúdo do erlenmeyer sob agitação e ebulição constante. Com base no volume gasto até a total dissolução da coloração azul do erlenmeyer e formação de precipitado vermelho, foi determinado o fator. A cada utilização da solução, a mesma foi fatorada novamente para manter a precisão analítica do método.

Assim, procedeu-se à análise das amostras, as quais foram tituladas à quente da forma como descrita na etapa de fatoração. O cálculo do percentual de lactose na amostra é calculado pela fórmula:

$$\% \text{ lactose} = \frac{d \times f \times 100}{l \times v}$$

Onde:

d = diluição da amostra (100mL)

f = fator da solução de Fehling para lactose

l = volume de amostra utilizado (10mL)

v = volume gasto na titulação em mL

5.6 AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

A avaliação de resíduos de antibióticos foi realizada inicialmente por meio do teste rápido Delvotest® T (DSM, Holanda). Foram seguidas as instruções do fabricante, onde foi inoculado 0,1 mL da amostra no tubo com o meio de cultura contendo esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, com pipeta pasteur descartável própria do kit.

Os tubos foram incubados em banho-maria a 64°C por 3 horas e 15 minutos. A virada de cor do meio de cultura de roxo para amarelo indica germinação do esporo, e consequente ausência de substância inibitória na amostra. Caso a amostra apresente resíduos de antimicrobianos, a coloração do meio de cultura permanecerá inalterada. O teste apresenta sensibilidade descrita para penicilina G (1 ppb), sulfadiazina (100 ppb) e oxitetraciclina (100 ppb).

Foi realizado um teste controle positivo, onde a partir de discos impregnados com ampicilina (10 µg) e tetraciclina (30 µg) foram produzidas amostras controle de leite de cabra com concentrações destes antimicrobianos próximas ao limite máximo permitido pela legislação. A partir do LMR para Penicilina estipulado em 4 µg/l, foi preparada uma amostra de leite de cabra selecionada aleatoriamente dentre as estudadas com concentração similar de ampicilina, e igualmente para a tetraciclina, com LMR de 100 µg/l. Feito isto, as amostras foram inoculadas no teste normalmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.7 CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS AERÓBIAS E ENTEROBACTÉRIAS TOTAIS

Apesar da dificuldade em se encontrar amostras de leite caprino cru no Estado do Rio de Janeiro, muitas vezes devido ao período de lactação dos animais, foram obtidas 21 amostras de leite caprino cru. As amostras foram submetidas à quantificação de enterobactérias totais e de mesófilos aeróbios e os resultados estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13: Quantificação de enterobactérias totais e de mesófilos aeróbios nas amostras de leite de cabra cru

Amostra	Contagem de enterobactérias totais (UFC/mL)	Contagem de mesófilos aeróbios (UFC/mL)
1	$4,9 \times 10^3$	$1,8 \times 10^{7*}$
2	$< 1,0 \times 10$	$1,5 \times 10^3$
3	$< 1,0 \times 10$	$8,0 \times 10^2$
4	$1,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{8*}$
5	$6,7 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{7*}$
6	$3,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$
7	$3,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^5$
8	$2,2 \times 10^3$	$4,0 \times 10^5$
9	$2,3 \times 10^3$	$> 1,0 \times 10^4$
10	$< 1,0 \times 10$	$1,6 \times 10^3$
11	$< 1,0 \times 10$	$7,2 \times 10^2$
12	$2,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{9*}$
13	$1,1 \times 10^4$	$8,8 \times 10^{7*}$
14	$9,5 \times 10^3$	$6,8 \times 10^{7*}$
15	$9,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^4$
16	$2,2 \times 10^4$	$> 1,0 \times 10^5$
17	$4,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$
18	$1,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$
19	$1,4 \times 10^3$	$> 1,0 \times 10^4$
20	$6,0 \times 10^2$	$9,6 \times 10^4$
21	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$

Legenda: Valores acompanhados de “*” indicam que estão fora dos padrões da IN 37/2000.

Excetuando-se as amostras que não apresentaram contagem até o limite de detecção da técnica (amostras 2, 3, 10 e 11), as enterobactérias totais foram quantificadas até a ordem de 10^6 , sendo as amostras 4 e 12 (amostras do mesmo produtor) exibindo as contagens mais altas. Com relação à contagem de mesófilos aeróbios, estas mesmas amostras também apresentaram as maiores contagens (ordem de 10^8 e 10^9). Outras quatro amostras também exibiram valores considerados altos, na ordem de 10^7 .

O procedimento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra (Instrução Normativa Nº 37 de 31 de outubro de 2000, MAPA) estabelece o padrão de $5,0 \times 10^5$ UFC/ml para contagem padrão em placa em leite de cabra cru, e assim, seis amostras (29%) se apresentam fora deste padrão.

Na literatura, é geralmente adotado um valor de 10^6 para indicar que as condições higiênicas utilizadas no processamento não foram adequadas. Um estudo brasileiro que analisou a qualidade microbiológica de 61 amostras de leite caprino cru em 12 fazendas em Minas Gerais, apresentou contagens padrão em placa oscilando entre a ordem de 10^4 e 10^6 (YAMAZI *et al.*, 2013). Em um estudo realizado na Grécia, foram encontrados valores aproximadamente dentro da mesma faixa (KONDYLI *et al.*, 2012). Já em um trabalho de um grupo francês, os valores ficaram na faixa de 10^3 (TORMO *et al.*, 2011).

No presente estudo, comparativamente a outros encontrados na literatura, foi obtida uma contagem maior em algumas amostras, podendo isto ser relacionado ao fato de amostras terem sido coletadas de pequenos produtores, os chamados “produtores de fundo de quintal”, onde aparentemente as medidas de boas práticas não são seguidas à risca e não há nenhum tipo de controle ou inspeção do leite de cabra, embora seja vendido cru ao consumidor. Ainda, altas contagens de mesófilos são relacionadas à falha no armazenamento, onde provavelmente não foi mantida a temperatura adequada.

Foram selecionados 271 isolados, a partir das placas de VRBG, das 17 amostras que apresentaram contagem, dentre colônias típicas e atípicas e selecionando-se uma média de 15 colônias por amostra, sendo todos submetidos à identificação por MALDI-TOF. As colônias apresentaram variação de cor (tons de rosa claro à escuro), de tamanho e de tipo de halo (transparente, esbranquiçado ou róseo). A **Figura 10** ilustra o aspecto de algumas das diferentes colônias encontradas.



Figura 10: Aspecto de algumas das colônias bacterianas isoladas de leite de cabra cru, observadas em ágar VRBG

5.8 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Dos 271 isolados submetidos ao MALDI-TOF, 194 foram identificados com precisão de espécie, enquanto outros 28 foram identificados com precisão somente relativa ao gênero, totalizando 222 isolados identificados. Os 49 isolados restantes não foram possíveis de se identificar.

A **Figura 11** mostra um fragmento do relatório gerado pelo software acoplado ao equipamento. A primeira coluna se refere à posição da amostra na placa do equipamento, sempre inserida em duplicata. As colunas seguintes são os dois principais resultados obtidos, com base na comparação relativa ao banco de dados de espectros do software. Os números exibidos ao lado dos nomes dos micro-organismos consistem de uma escala de 0 a 3, onde quanto mais próximo de 3, mais semelhança ocorreu entre um espectro armazenado, garantindo maior certeza na identificação. Resultados com valores amarelos apresentam certeza na identificação do gênero e provável espécie, enquanto os valores verdes exibem alta precisão na identificação da espécie. No caso deste fragmento do relatório, dois isolados (60 e 61) não apresentaram correspondência de espectros satisfatória, e não foram possíveis de serem identificadas.

59	Hafnia alvei	2.259	Hafnia alvei	2.259
59	Hafnia alvei	2.248	Hafnia alvei	2.248
60	not reliable identification	2.208	not reliable identification	2.208
60	not reliable identification	2.205	not reliable identification	2.205
61	Raoultella ornithinolytica	2.259	Raoultella ornithinolytica	2.259
61	Raoultella ornithinolytica	2.242	Raoultella ornithinolytica	2.242
62	not reliable identification	2.199	not reliable identification	2.199
62	not reliable identification	2.195	not reliable identification	2.195
63	Pantoea agglomerans	1.999	Pantoea agglomerans	1.955
63	Pantoea agglomerans	1.905	Pantoea agglomerans	1.751

Figura 11: Fragmento do relatório gerado pelo software acoplado ao MALDI-TOF

Dos 222 isolados identificados, 26,6% corresponderam à membros da família *Enterobacteriaceae*. Outros 61,3% dos isolados foram identificados como espécies do gênero *Pseudomonas* e 4,5% como espécies do gênero *Acinetobacter*. Ainda, 7,7% corresponderam à espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, uma espécie que anteriormente era classificada como pertencente ao gênero *Pseudomonas*. O gráfico exibido na **Figura 12** ilustra a identificação geral obtida e a **Tabela 14** exhibe os gêneros encontrados divididos por amostra, assim como algumas espécies predominantes.

Inicialmente, o estudo era voltado para a detecção de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, por isso, foi realizada a escolha do ágar VRBG. No entanto, a maior proporção de isolados foi pertencente ao gênero *Pseudomonas*.

Um estudo japonês ressalta a relevância do gênero *Pseudomonas* em ágar VRBG, comparando a influência deste grupo frente à detecção de enterobactérias em amostras alimentícias em diferentes meios de cultura. Dependendo do tipo de amostra, da temperatura e das espécies presentes, podem-se obter diferentes taxas de crescimento dos micro-organismos presentes. Ainda, é ressaltada a alta frequência de ocorrência do gênero *Pseudomonas* em leite cru e pasteurizado, especialmente os submetidos à refrigeração por maiores períodos de tempo (SATO, OHNO & MATSUI, 2014).

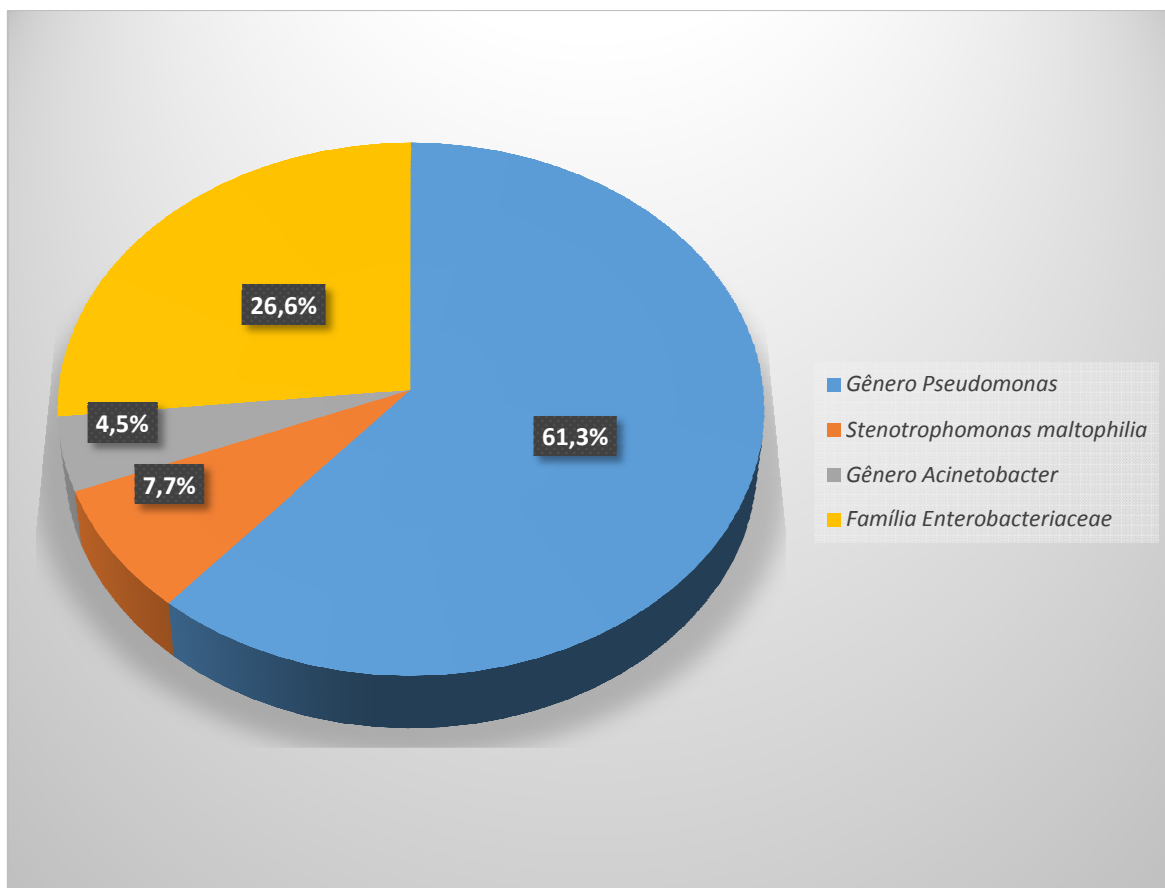


Figura 12: Identificação geral dos isolados obtidos das amostras de leite caprino cru

Com exceção das amostras 4, 14, 15, 19 e 20, foi observado que não houve presença de enterobactérias e *Pseudomonas* na mesma amostra. Ainda, destaca-se que todas as enterobactérias dos gêneros *Serratia*, *Pantoea* e *Hafnia* foram identificadas somente na amostra 5. A amostra 14 se apresentou como a mais diversificada do ponto de vista da população microbiana, apresentando diversos gêneros de enterobactérias, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Em cinco amostras (22%) foram encontrados exclusivamente micro-organismos do gênero *Pseudomonas*.

Um estudo chinês, que avaliou a diversidade bacteriana de leite de cabra cru, também encontrou os mesmos grupos detectados neste estudo, porém em proporções diferentes, sendo as enterobactérias correspondentes a cerca de 25% do total (juntamente com alguns isolados Gram-positivos), seguidas por *Pseudomonas* (13%), *Acinetobacter* (13%) e *Stenotrophomonas* (3%) (ZHANG *et al.*, 2017).

Tabela 14: Identificação de micro-organismos divididos por amostra de leite de cabra cru

Amostra	Divisão por gêneros
1	<i>Stenotrophomonas</i> (26%) <i>Pseudomonas</i> (74%)
4	<i>Enterobacter</i> (82%) <i>Escherichia</i> (13%) <i>Pseudomonas</i> (5%)
5	<i>Serratia</i> (44%) <i>Pantoea</i> (28%) <i>Raoultella</i> (11%) <i>Hafnia</i> (11%) <i>Enterobacter</i> (6%)
6	<i>Pseudomonas</i> (60%) <i>Moelerella</i> (20%) <i>Stenotrophomonas</i> (20%)
7	<i>Pseudomonas</i> (89%) <i>Leclercia</i> (11%)
8	<i>Pseudomonas</i> (100%)
9	<i>Pseudomonas</i> (100%)
12	<i>Enterobacter</i> (88%) <i>Escherichia</i> (12%)
13	<i>Pseudomonas</i> (100%)
14	<i>Pseudomonas</i> (54%) <i>Enterobacter</i> (22%) <i>Stenotrophomonas</i> (11%) <i>Klebsiella</i> (8%) <i>Raoultella</i> (3%) <i>Acinetobacter</i> (3%)
15	<i>Pseudomonas</i> (75%) <i>Klebsiella</i> (12%) <i>Acinetobacter</i> (12%)
16	<i>Pseudomonas</i> (100%)
17	<i>Acinetobacter</i> (60%) <i>Pseudomonas</i> (40%)
18	<i>Pseudomonas</i> (100%)
19	<i>Pseudomonas</i> (80%) <i>Klebsiella</i> (10%) <i>Stenotrophomonas</i> (10%)
20	<i>Pseudomonas</i> (80%) <i>Acinetobacter</i> (13%) <i>Klebsiella</i> (7%)
21	<i>Stenotrophomonas</i> (83%) <i>Enterobacter</i> (17%)

Com relação aos membros da família *Enterobacteriaceae* obtidos (59 isolados), a **Figura 13** exibe suas identificações e respectivas proporções em relação ao total da família. Foram identificadas espécies pertencentes aos gêneros *Escherichia* (5%), *Enterobacter* (48%), *Raoultella* (5%), *Hafnia* (5%), *Pantoea* (8%), *Klebsiella* (11%), *Serratia* (14%), *Leclercia* (2%) e *Moelerella* (2%).

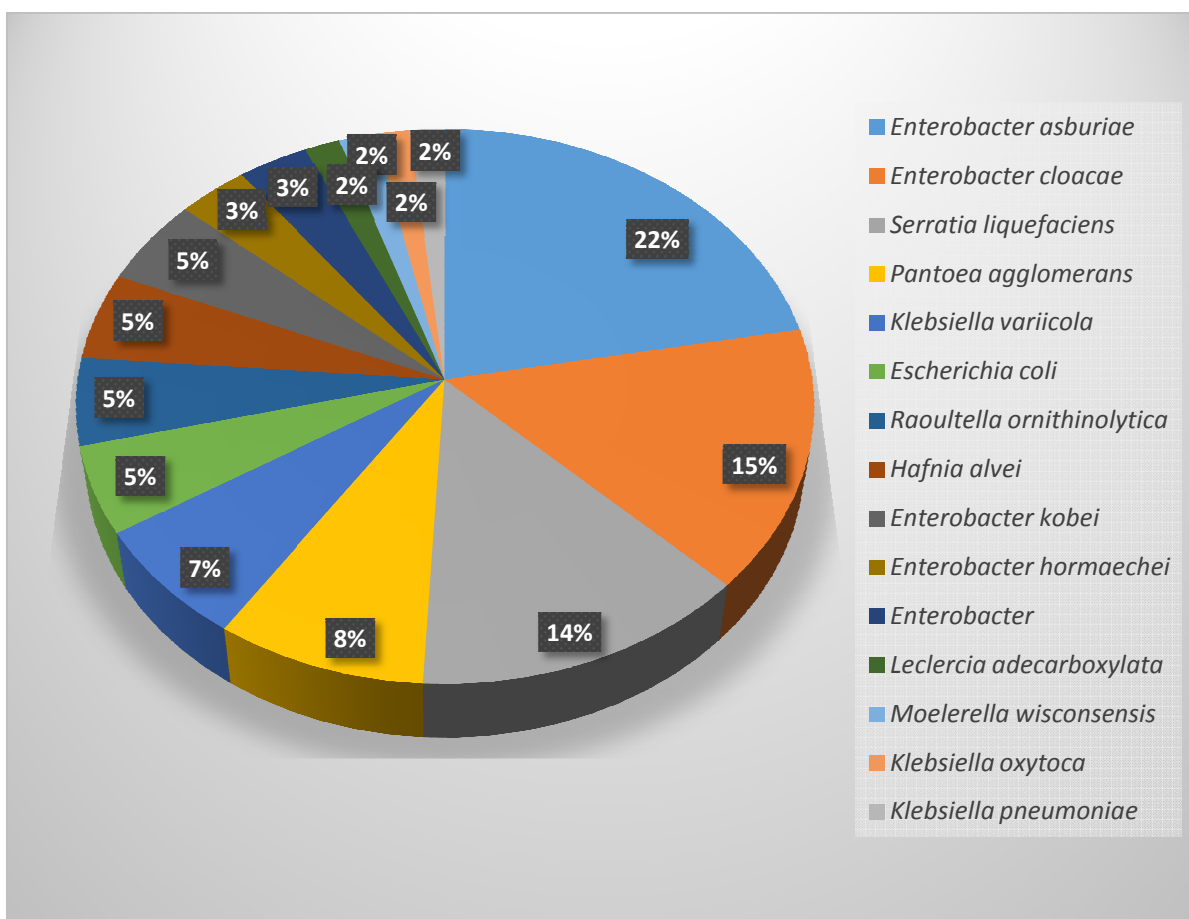


Figura 13: Identificação dos isolados obtidos das amostras de leite caprino cru, identificados por MALDI-TOF e pertencentes à família *Enterobacteriaceae*

Em estudo realizado no Quênia, foram identificados diversos gêneros de enterobactérias em leite de cabra cru, como *Serratia* (20% do total), *Klebsiella* (11%), *Enterobacter* (7%), e *E. coli* (6%) (MAHLANGU, MAINA & KAGIRA, 2018).

Bactérias frequentemente encontradas no leite podem permanecer presentes em seus derivados e levar a características indesejadas nesses produtos, conforme verificado por Tabla e colaboradores (2018). Amostras de queijo de cabra produzidos com leite cru foram analisadas e mostraram a presença de *K. oxytoca*, *E. cloacae*, *H. alvei* e *P.*

agglomerans, todas elas associadas à produção de gás e consequente geração de olhaduras (“*early blowing*”) no queijo (TABLA *et al.*, 2018).

Foram identificados 136 isolados de 16 espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, conforme ilustrado na **Figura 14**, sendo *P. putida* e *P. koreensis* as espécies mais representadas (10% cada). Ainda, 26 isolados foram identificados apenas com precisão de gênero (12%).

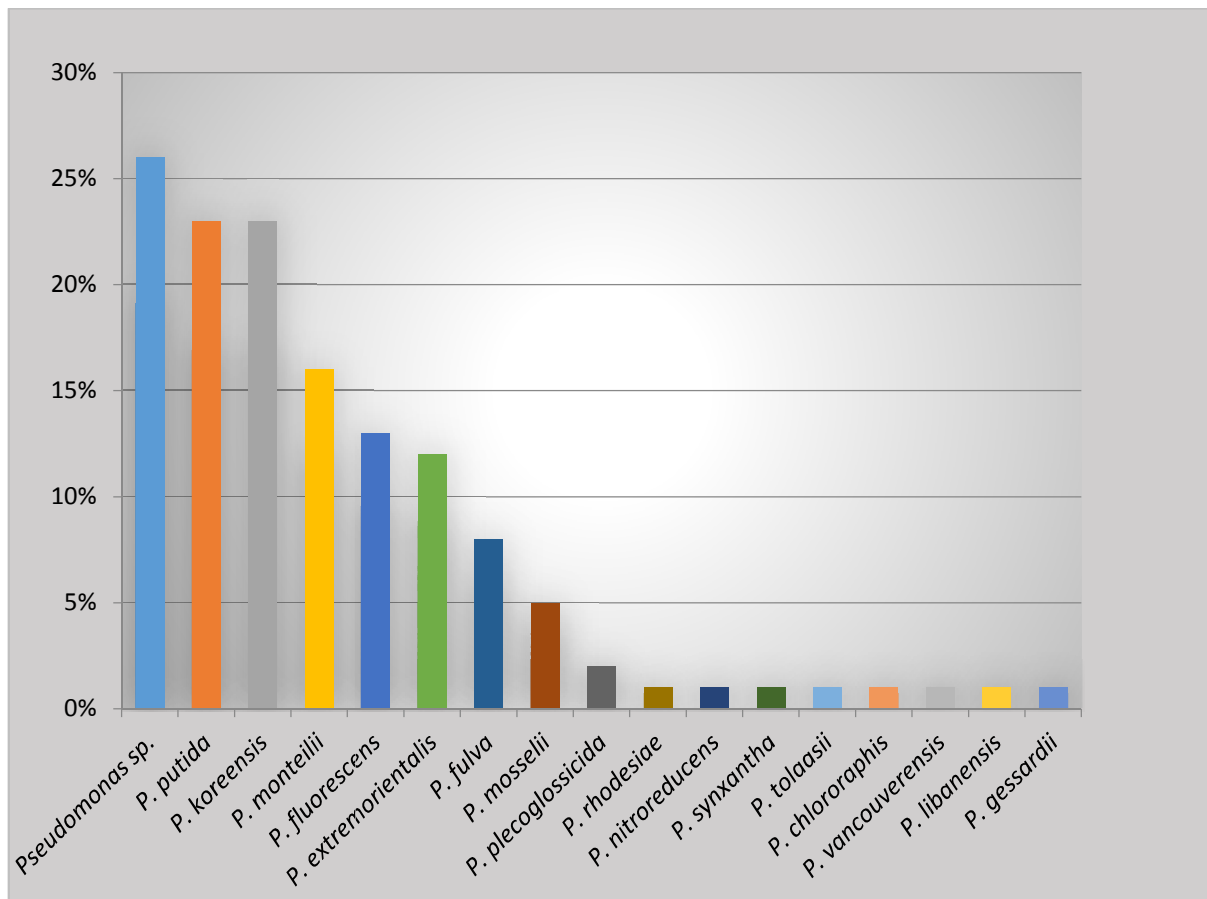


Figura 14: Identificação dos isolados obtidos das amostras de leite caprino cru, identificados por MALDI-TOF e pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

A literatura menciona a espécie *Pseudomonas fluorescens* como a mais frequentemente isolada de produtos lácteos (FERREIRA *et al.*, 2012). Um recente estudo chinês avaliou 87 amostras de leite de cabra cru e identificou 146 isolados do gênero *Pseudomonas*, sendo a maioria *P. fluorescens* (42%) e *P. fragi* (16%) (MENG *et al.*, 2018). Em nosso trabalho, no entanto, foi observado que apenas 10% dos isolados do gênero corresponderam a espécie *P. fluorescens*.

Em leite bovino, *P. fluorescens* também é uma das bactérias mais encontradas. Rossi e colaboradores realizaram um estudo envolvendo vários produtos lácteos oriundos

de leite bovino e verificaram que 70% dos isolados correspondiam à *P. fluorescens*. Os autores também identificaram *P. putida* e *P. koreensis* (ROSSI *et al.*, 2018). Amostras de leite cru bovino analisadas na Itália também apresentaram, dentre as bactérias do gênero *Pseudomonas*, *P. fluorescens* como a mais isolada (30%), seguida por *P. aeruginosa* (22%), *P. putida* (11%), *P. fulva* (6%), *P. mosselii* (5%) e *P. rhodesiae* (3%) (DECIMO *et al.*, 2014).

P. fluorescens é altamente associada com a produção de pigmentos azuis e esverdeados, fato que ocorreu visivelmente em duas amostras nas quais foi encontrada esta espécie (amostras 16 e 18). Estas se apresentaram com uma coloração levemente esverdeada, comparada às outras amostras. Estudos relatam que este é um importante problema associado à perda industrial de produtos lácteos, como apontado em estudo feito neste sentido com queijo mussarela, pois a coloração alterada leva à rejeição do consumidor (CHIERICI *et al.*, 2016).

A variedade de espécies do gênero *Pseudomonas* em leite caprino e bovino, assim como sua prevalência em diversos produtores e em locais extremamente distantes demonstra a ubiquidade do gênero e sua relevância como microbiota contaminante destes produtos (SCATAMBURLO *et al.*, 2015). Esta variedade indica baixa pressão seletiva no ambiente de produção em razão da falta de boas práticas, permitindo que uma grande variedade de espécies entre em contato com o produto durante ou após a produção (JÚNIOR *et al.*, 2018).

No Paraná, foi detectada uma contagem média da ordem de 10^4 UFC/ml de *Pseudomonas* em leite de cabra cru, sendo obtidos 54 isolados identificados em sua maioria como *P. azotoformans*, *P. aeruginosa* e *P. koreensis*. Em semelhança a este estudo, também foram detectadas *P. monteilii*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. plecoglossicida* e *P. vancouverensis*. Em amostras de leite bovino, foi identificada unicamente *P. aeruginosa*. (JÚNIOR *et al.*, 2018).

Um fato interessante é a ausência de detecção de *P. aeruginosa* nas amostras de leite de cabra cru analisadas neste trabalho. Essa espécie é frequentemente relatada como a mais relevante do gênero do ponto de vista da saúde humana (MORADALI, GODS & REHM, 2017).

Com relação ao gênero *Acinetobacter*, foram identificados 10 isolados, dois quais 6 representam a espécie *A. guillauiae*, 3 representam *A. ursingii* e 1 representa *A. bereziniae*. Vale ressaltar que *A. baumannii*, um importante patógeno (SANTAJIT & INDRAWATTANA, 2016), não foi encontrado em nenhuma das amostras analisadas.

A diversidade de gêneros e espécies encontradas nesse trabalho após a identificação corresponde com a variedade de características fenotípicas das colônias crescidas em ágar VRBG durante a etapa de isolamento. A **Figura 15** exemplifica essa

variedade, deixando mais claras as diferenças entre os isolados, como descoloração do meio, presença de halos e coloração mais esbranquiçada de certos isolados.

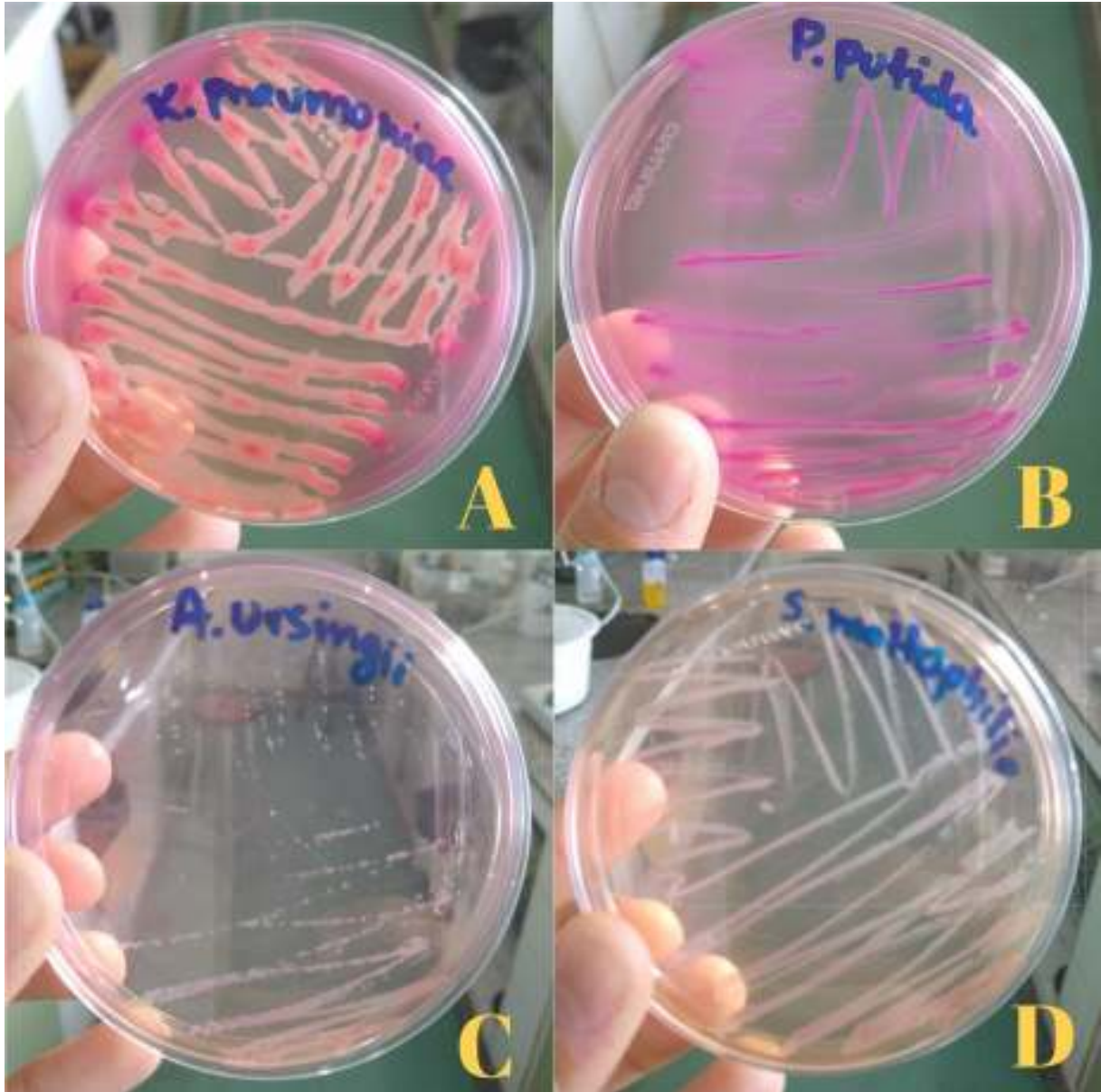


Figura 15: Características de isolados de diferentes gêneros no ágar VRBG. A – *Klebsiella pneumoniae*, representando o comportamento das enterobactérias, padrão para este meio de cultura. B – *Pseudomonas putida* indicando a característica do gênero *Pseudomonas*, o qual não fermenta a glicose, produzindo colônias rosas estreitas com discreto halo róseo. C – *Acinetobacter ursingii* apresenta colônias mais esbranquiçadas com crescimento mais escasso, sem nenhum tipo de halo e com descoloração do meio. D – *Stenotrophomonas maltophilia* apresenta crescimento abundante, colônias levemente róseas e descoloração do meio.

5.9 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

5.9.1 Atividade produtora de biofilme

A atividade produtora de biofilme foi avaliada por meio do ágar vermelho congo, baseado na produção de exopolissacarídeos. É um método de baixo custo e rápido que apresenta boa sensibilidade e reprodutividade (AMORIM *et al.*, 2017^a; HEDAYATI, EFTEKHAR & HOSSEINI, 2014), permitindo uma detecção qualitativa rápida de microorganismos Gram-negativos produtores de biofilme, fator importante para garantir a qualidade e segurança do leite e produtos lácteos (HASSAN *et al.*, 2011; SHERIFF & SHANA, 2016).

Foram detectados 58 isolados (26% do total) com atividade produtora de biofilme, sendo a maioria absoluta de membros da família *Enterobacteriaceae* (52 isolados, correspondendo a 88% do total de enterobactérias). Exemplos de resultados obtidos no ágar vermelho congo são exibidos na **Figura 16**. A **Figura 17** exibe os gêneros bacterianos que apresentaram atividade produtora de biofilme, e a porcentagem correspondente ao total de isolados do gênero em questão.



Figura 16: Exemplos de resultados obtidos no ágar vermelho congo. As colônias ou áreas demarcadas de coloração negra indicam que o isolado possui atividade produtora de biofilme.

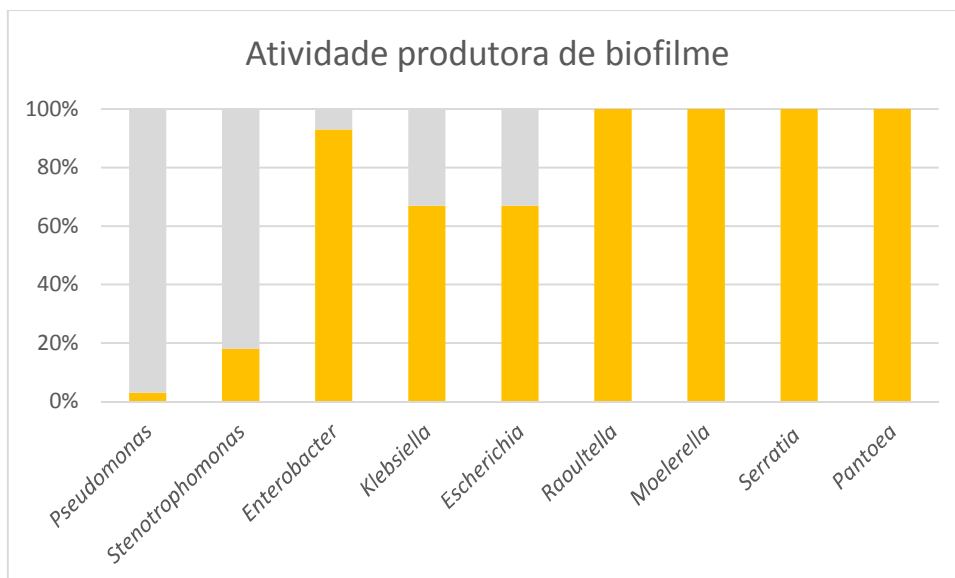


Figura 17: Gêneros bacterianos que apresentaram atividade produtora de biofilme. As porcentagens são expressas por isolados com resultado positivo (coloração laranja) em relação ao total de isolados de cada gênero. Os gêneros não mencionados no gráfico não apresentaram nenhum tipo de atividade produtora de biofilme.

A atividade produtora de biofilme pesquisada em isolados do gênero *Pseudomonas* provenientes de leite e derivados, exibiu uma taxa de cerca de 15% de positividade em condições semelhantes às realizadas, valor consideravelmente mais alto que o obtido neste estudo (3%) (ROSSI, et al., 2018).

Bactérias Gram-negativas, e principalmente membros da família *Enterobacteriaceae* são associados à formação de biofilme na indústria láctea, como exemplifica um estudo na Nova Zelândia onde a partir de um biofilme desenvolvido a ponto de haver bloqueio na linha, foram isolados *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, e *Raoultella sp* (DIXON et al., 2017).

Apenas 4 isolados do gênero *Pseudomonas* foram capazes de exibir atividade produtora de biofilme, sendo um correspondente a *P. monteilii* e três a *P. fluorescens*. Um estudo ressalta a espécie *P. fluorescens* por sua habilidade de produzir biofilme, e verificando que ocorre a formação de biofilmes de forte aderência e alta atividade metabólica em temperaturas baixas (ASWATHANARAYAN & VITTAL, 2014).

5.9.2 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi observada em 71 isolados (32% do total), sendo a maioria dos gêneros *Pseudomonas* (36), *Stenotrophomonas* (17) e *Serratia* (7). A **Figura 18** exibe

os gêneros bacterianos que apresentaram atividade proteolítica observada no ágar leite, e a porcentagem correspondente ao total de isolados do gênero em questão.

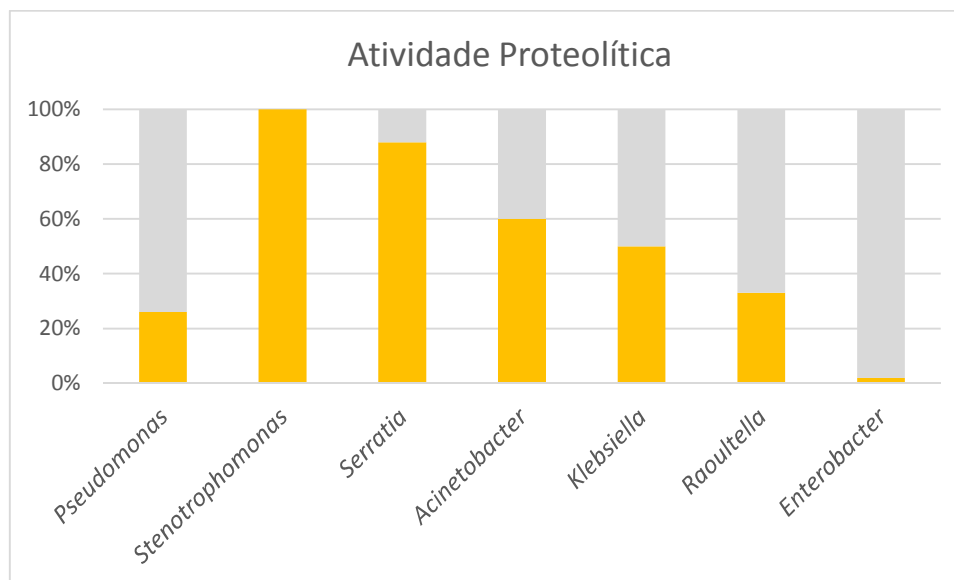


Figura 18: Gêneros bacterianos que apresentaram atividade proteolítica. As porcentagens são expressas por isolados com resultado positivo (coloração laranja) em relação ao total de isolados de cada gênero. Os gêneros não mencionados no gráfico não apresentaram atividade proteolítica.

Dentre os isolados do gênero *Pseudomonas* com atividade proteolítica observada, as espécies mais representadas foram *P. koreensis* com 15 isolados (65% dos isolados desta espécie) e *P. mosselii* com 4 isolados (80% dos isolados desta espécie). Todos os isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* (17) apresentaram atividade proteolítica.

Um estudo com leite bovino e derivados exibiu que 47% dos isolados do gênero *Pseudomonas*, em sua maioria *P. rhodesiae*, exibiram atividade proteolítica inclusive em temperatura de refrigeração de 5°C (CALDERA *et al.*, 2016). Outro estudo com leite de cabra cru, indicou que de 61 amostras pesquisadas, 22 apresentaram alta atividade proteolítica, como mais de 50% da contagem de psicrotóxicos produzindo proteases. Ainda, constatou-se que o armazenamento por longos períodos em refrigeração ocasiona em uma seleção natural das psicrotóxicas, gerando produção intensa de enzimas deteriorantes termoestáveis (YAMAZI *et al.*, 2013).

A multiplicação de *Pseudomonas* em baixa temperatura é favorecida pela produção de proteases e lipases. Em estudo paranaense, de 60 isolados do gênero em leite de cabra cru, 91% exibiram atividade proteolítica em temperatura na faixa mesófila e 80% exibiram atividade a 10°C por 7 dias. Comparativamente, em leite bovino, foi observado que apenas

35% dos isolados de *Pseudomonas* apresentou atividade proteolítica (sendo todos *P. aeruginosa*) à 35°C, enquanto nenhum isolado apresentou atividade em temperatura de refrigeração. Ainda, foi evidenciado que isolados da mesma espécie possuindo o gene *aprX* (gene associado à metaloprotease) apresentaram comportamentos diferentes, com expressão do gene em uma condição de temperatura e não em outra ou até mesmo não expressando em temperatura alguma, indicando que variações na expressão gênica devem ser influenciadas por outros fatores não específicos a cada espécie, e que outros tipos de proteases também são produzidos por *Pseudomonas*. Por exemplo, *P. fluorescens* apresentou atividade proteolítica apenas em temperatura de refrigeração (SCATAMBURLO *et al.*, 2015; JÚNIOR *et al.*, 2018).

Neste estudo, observou-se o mesmo comportamento, onde isolados da mesma espécie apresentaram fenótipos diferentes. Por exemplo, dentre os 23 isolados de *P. koreensis*, 14 apresentaram atividade proteolítica e 10 apresentaram atividade lipolítica.

Não há constatação de que exclusivamente algumas espécies do gênero *Pseudomonas* sejam produtoras de proteases. Para evitar isto, deve-se manter a temperatura do leite baixa e pelo menor tempo possível, sempre associando estes controles com boas práticas de higiene (MENG *et al.*, 2018).

Em leite bovino cru, isolados do gênero *Acinetobacter* apresentaram atividade proteolítica em cerca de 60% dos casos. No caso de *Stenotrophomonas sp.* e *Serratia sp.*, todos os isolados, semelhantemente ao presente estudo, apresentaram atividade produtora de proteases. No caso de outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* encontrados (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella* e *Hafnia*) não foi detectada atividade produtora de proteases (BAUR *et al.*, 2015). Na Itália, a atividade proteolítica de enterobactérias observada em leite bovino foi restrita à *Serratia marcescens* (DECIMO *et al.*, 2014).

5.9.3 Atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi evidenciada no ágar Spirit Blue em 71 isolados (32% do total), sendo os isolados com resultado positivo muito semelhantes com os obtidos na avaliação de atividade proteolítica, com relação à classificação por gêneros, como observado na **Figura 19**, que exhibe os gêneros bacterianos que apresentaram atividade lipolítica.

Dentre os isolados do gênero *Pseudomonas* com atividade lipolítica observada, as espécies mais representadas foram *P. koreensis* com 9 isolados (39% dos isolados desta espécie), *P. manteilli* com 7 isolados (44% dos isolados desta espécie), *P. putida* com 6 isolados (26% dos isolados desta espécie) e *P. mosselii* com 5 isolados (100% dos isolados

desta espécie). Todos os isolados de *Stenotrophomonas maltophilia* (17) apresentaram atividade proteolítica.

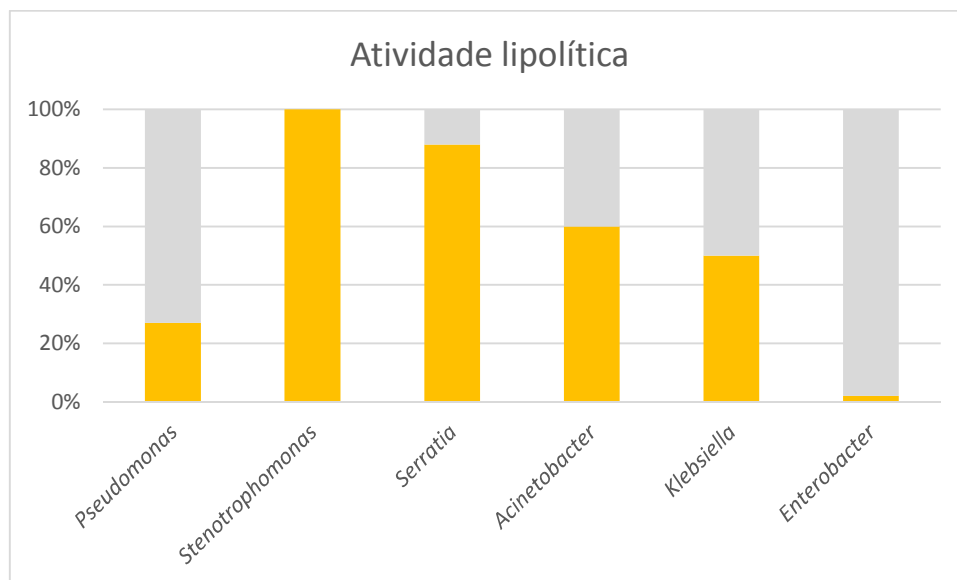


Figura 19: Gêneros bacterianos que apresentaram atividade lipolítica. As porcentagens são expressas por isolados com resultado positivo (coloração laranja) em relação ao total de isolados de cada gênero. Os gêneros não mencionados no gráfico não apresentaram atividade lipolítica.

Dos 60 isolados de *Pseudomonas* obtidos de leite caprino cru em estudo no Paraná, 95% apresentaram atividade lipolítica à 35°C e 78% em temperatura de refrigeração. Quando avaliados os isolados de leite bovino cru, apenas 25% apresentaram atividade produtora de lipases em ambas as temperaturas (JÚNIOR *et al.*, 2018). Também em leite bovino, outro estudo determinou que apenas 9% dos isolados de *Pseudomonas* apresentaram atividade lipolítica. O gênero *Acinetobacter*, especificamente *A. guillaouiae*, também identificado neste estudo, se se mostrou o maior isolado produtor de lipases. (BAUR *et al.*, 2015).

Assim, analisando os resultados de diversos estudos, o leite bovino além de apresentar menores contagens, apresenta uma atividade deterioradora muito inferior ao encontrado em leite caprino, especialmente em temperatura de refrigeração.

Conhecida a gravidade do problema da presença de enzimas deteriorantes em alimentos, especialmente relacionado ao gênero *Pseudomonas*, alternativas vêm sendo desenvolvidas para contornar este problema tecnológico, como o uso de bacteriófagos específicos para o gênero e outros psicrotróficos (HU, MENG & LIU, 2016), o

desenvolvimento de técnicas colorimétricas para quantificação de proteases em leite de cabra e ovelha (PALOMBA *et al.*, 2017) e o desenvolvimento de métodos de desativação das enzimas deterioradoras no leite, com o objetivo de desenvolver produtos lácteos com maior vida de prateleira (STOECKEL *et al.*, 2016).

5.9.4 Perfil de resistência à antimicrobianos

Do total de 222 isolados identificados, 21 isolados (9%) apresentaram resistência a uma ou duas classes de antimicrobianos. Três isolados (1%) apresentaram resistência a 3 ou 4 classes de antimicrobianos, sendo classificados como MDR (MAGIORAKOS *et al.*, 2012). A **Tabela 16** exibe o detalhamento destes isolados, indicando a amostra de origem e a quais antibióticos a resistência foi observada.

Com relação ao gênero *Pseudomonas*, 13 isolados (9,6%) apresentaram resistência a antibióticos de uma ou duas classes, sendo geralmente resistentes à aztreonam e/ou cefepime. Já as enterobactérias exibiram 11 isolados apresentando algum tipo de resistência, principalmente à tetraciclina e ceftadizima, sendo 8 isolados (13,6%) resistentes a uma ou duas classes de antimicrobianos e 3 isolados (5,1%) multirresistentes (resistentes a 3 ou 4 classes de antimicrobianos), sendo que um isolado de *E. hormaechei* apresentou resistência à imipinem. Ainda, 3 isolados do gênero *Acinetobacter* (30%) apresentaram resistência a uma ou duas classes de antimicrobianos, exclusivamente imipinem e piperaciclina + tazobactam.

A amostra 14 apresentou o maior número de isolados resistentes (3) e multirresistentes (2), e das 21 amostras, 11 (52%) apresentaram pelo menos um isolado com resistência a pelo menos uma classe de antimicrobianos.

No Quênia, um estudo avaliou a susceptibilidade à antimicrobianos de isolados obtidos a partir de leite de cabra cru, onde foram avaliados diversos gêneros de enterobactérias. As taxas de resistência à antimicrobianos foram baixas, como no presente estudo, e os únicos isolados que apresentaram fenótipo MDR foram *Serratia sp.* e *E. coli* (MAHLANGU, MAINA & KAGIRA, 2018).

Em isolados de *Pseudomonas sp.* em leite bovino cru, um estudo relata que houve alta prevalência de resistência à aztreonam (32% dos isolados), especialmente *P. fluorescens*, com 47% destes, e *P. putida*. Também se observou resistência de 22% dos isolados à cefepime e 11% à carbapenêmicos. A maior taxa de resistência foi observada com relação à ticarciclina + ácido clavulânico (52%). Já em isolados de enterobactérias, especialmente *Serratia sp.*, foi reportada uma maior taxa de resistência à ampicilina (76%) e tetraciclina (24%) (DECIMO, SILVETTI & BRASCA, 2016).

Tabela 15: Isolados de leite caprino cru que apresentaram resistência a antimicrobianos

Amostra de origem	Isolado	Resistência à antibióticos	Resistência a classes de antibióticos
Isolados resistentes			
7	<i>Pseudomonas putida</i>	IMP/MER	1
12	<i>Escherichia coli</i>	CFO	1
14	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	AMP/TET	2
14	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	ATM	1
14	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	ATM	1
15	<i>Klebsiella oxytoca</i>	CFZ/TET	2
15	<i>Pseudomonas putida</i>	CAZ	1
16	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATM	1
16	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	ATM	1
17	<i>Acinetobacter guillauiae</i>	PPT	1
17	<i>Acinetobacter guillauiae</i>	PPT/IPM	2
17	<i>Pseudomonas synxantha</i>	ATM	1
18	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATM/CPM	2
18	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	ATM	1
18	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	ATM	1
19	<i>Klebsiella variicola</i>	TET	1
19	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	ATM	1
19	<i>Pseudomonas libanensis</i>	ATM	1
20	<i>Acinetobacter ursingii</i>	IPM	1
20	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	ATM	1
21	<i>Enterobacter hormaechei</i>	IPM	1
Isolados multirresistentes (MDR)			
5	<i>Pantoea agglomerans</i>	CFO/AMC/CFZ	3
14	<i>Klebsiella variicola</i>	CFO/CFZ/TET/	3
14	<i>Klebsiella variicola</i>	AMC/PPT/CFZ/	4

Ao contrário do que foi observado neste estudo, onde de 3 isolados apenas um apresentou resistência à um único antibiótico, isolados de *Escherichia coli* são reportados frequentemente na literatura como caracterizados por multirresistência em produtos lácteos (ZHAO *et al.*, 2014; AWOSILE *et al.*, 2017)

5.9.5 Avaliação de fenótipos de produção de ESBL e KPC

Os resultados da avaliação de fenótipos de resistência produtores de ESBL e KPC em meios cromogênicos são exemplificados na **Figura 20**.

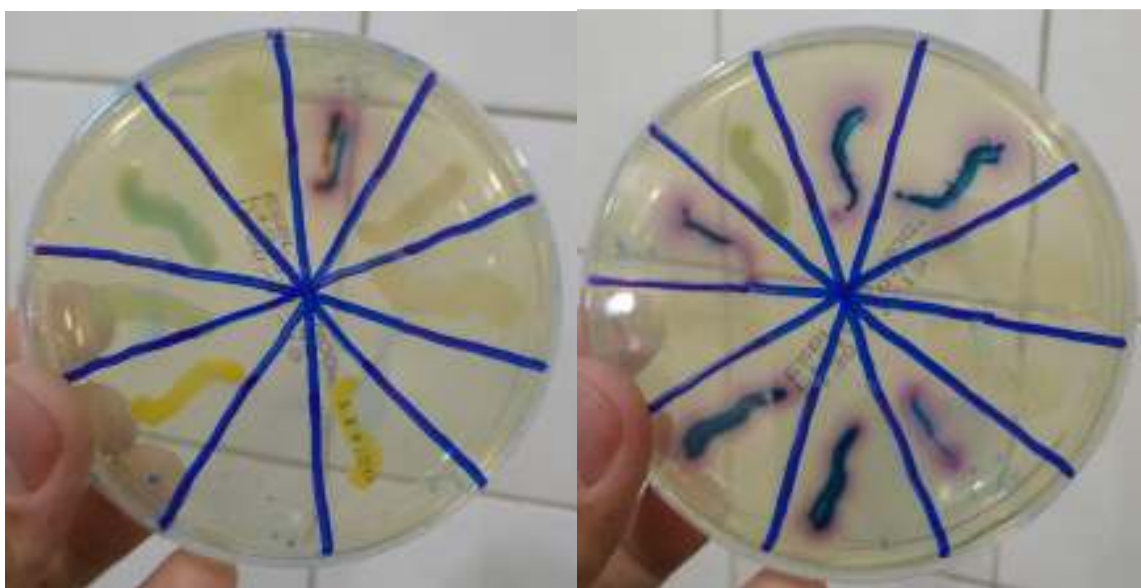


Figura 20: Exemplos de resultados obtidos em meios cromogênicos para detecção de fenótipos de resistência produtores de ESBL. Os isolados que se apresentam com coloração azulada, correspondem aos gêneros *Enterobacter* ou *Klebsiella*. Os isolados de *Pseudomonas* sp. se apresentam com coloração creme ou levemente esverdeada, enquanto *Acinetobacter* sp. se apresentam com coloração creme. *Stenotrophomonas maltophilia* se apresenta praticamente incolor.

Com relação à identificação de fenótipos de resistência produtores de ESBL, avaliados pelo meio cromogênico Chromagar ESBL, 201 isolados (91% do total) se apresentaram com resultado positivo, ou seja, com crescimento das colônias de determinado gênero bacteriano de acordo com o indicado pelo fabricante. A **Figura 21** exhibe os gêneros bacterianos que apresentaram atividade produtora de ESBL, e a porcentagem correspondente ao total de isolados do gênero em questão. Os gêneros *Serratia*, *Hafnia*, *Pantoea*, *Leclercia* e *Moellerella* não foram avaliados quanto atividade produtora de ESBL e KPC, pois não haviam padrões de crescimento disponíveis pelo fabricante do meio para estes grupos.

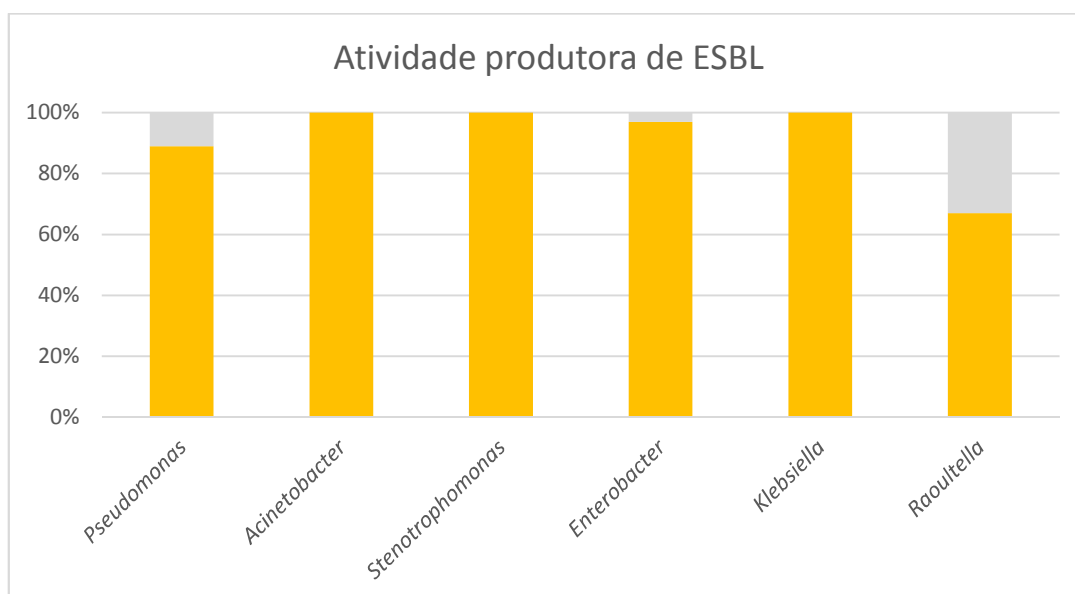


Figura 21: Gêneros bacterianos que apresentaram atividade produtora de ESBL. As porcentagens são expressas por isolados com resultado positivo (coloração laranja) em relação ao total de isolados de cada gênero. Os gêneros não mencionados no gráfico não apresentaram atividade produtora de ESBL detectada no meio cromogênico.

A maioria absoluta dos isolados se apresentou como produtor de ESBL, o que não foi evidenciado nos testes de difusão em disco, onde apenas 11% destes apresentaram resistência a algum dos antibióticos beta-lactâmico testados. No entanto, esse resultado pode ser uma consequência do fato de que foram desconsiderados os antibióticos cujo isolado correspondente apresenta resistência intrínseca, como por exemplo, a família *Enterobacteriaceae*, em relação à vários beta-lactâmicos (CLSI, 2018).

Estudos relatam a eficiência e a sensibilidade do uso do meio cromogênico Chromagar® ESBL, indicando altas taxas de correspondência comparativamente à outros métodos (KATTER & SHERIF, 2014; PRABHA, EASOW & SWAPNA, 2016).

De acordo com a literatura, a sensibilidade de testes de difusão em disco para detecção de produção de ESBL depende dos agentes antimicrobianos testados, e o uso de cefotaxima e aztreonam podem indicar melhores resultados (MANHAS *et al.*, 2012). De fato, neste estudo, a maioria dos isolados do gênero *Pseudomonas* que apresentaram resistência, foram exclusivamente resistentes ao aztreonam.

Um estudo realizado na Argentina verificou a produção de ESBL em amostras clínicas de isolados da família *Enterobacteriaceae* e também relatou discordância entre os

testes cromogênico e de difusão em disco, onde o Chromagar® ESBL apresentou maior identificação de isolados produtores da enzima (VILLAR, BASERNI & JUGO, 2013).

Quanto à identificação de fenótipos de resistência produtores de KPC, 133 isolados (60%) apresentaram resultado positivo. A **Figura 22** exibe os gêneros bacterianos que apresentaram atividade produtora de KPC, e a porcentagem correspondente ao total de isolados do gênero em questão.

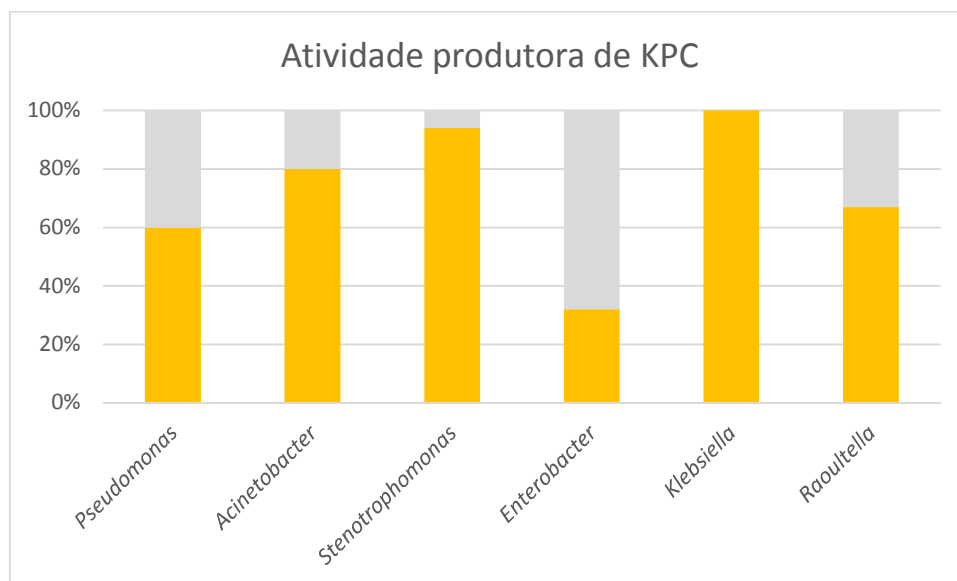


Figura 22: Gêneros bacterianos que apresentaram atividade produtora de KPC. As porcentagens são expressas por isolados com resultado positivo (coloração laranja) em relação ao total de isolados de cada gênero. Os gêneros não mencionados no gráfico não apresentaram atividade produtora de KPC detectada no meio cromogênico.

O meio cromogênico Chromagar® KPC apresenta alta sensibilidade e especificidade, alcançando resultados de 100% e 98,4%, respectivamente, quando comparado ao método de PCR para detecção do gene bla_{KPC} (SAMRA *et al.*, 2008). Quando comparado ao teste de Hodge, também foi relatada correspondência de 100% (HAJI *et al.*, 2012).

No presente estudo, foi observada uma ínfima taxa de correspondência entre isolados que apresentaram resistência a algum carbapenêmico no teste de difusão em disco (4 isolados, todos relacionados ao imipinem) e os que apresentaram resultado positivo no meio de cultura cromogênico (133 isolados), equivalendo a apenas 3%.

Esta ocorrência pode ser justificada pela existência de diferentes tipos de carbapenemases e, conseqüentemente, diferentes níveis de expressão. A significância das carbapenemases produzidas, especialmente por *Enterobacteriaceae*, é descrita pela classificação de *Ambler*, onde o nível de resistência aos antibióticos da classe dos

carbapenêmicos pode variar significativamente (GIRLICH, POIREL & NORDMANN, 2013; CODJOE & DONKOR, 2017). Assim, o meio cromogênico apresenta uma maior sensibilidade para detectar diferentes níveis de resistência aos carbapenêmicos, níveis estes que podem ser indetectáveis no teste de difusão em disco. Assim, a dificuldade de detecção das enzimas pelo teste de susceptibilidade aos carbapenêmicos vem contribuindo para a disseminação de bactérias que as produzem (LANDMAN *et al.*, 2010).

5.10 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A **Tabela 16** exibe os resultados dos parâmetros físico-químicos analisados, com exceção da amostra 1, que por motivos operacionais, não pôde ser analisada neste aspecto.

Tabela 16: Resultados dos parâmetros físico-químicos das amostras de leite caprino cru

Amostra	Padrão microbiológico	Umidade (%)	Gordura (%)	Lactose (%)	Acidez (% Ác. Lático)	EST (%)	ESD (%)	pH
2	C	89,5	2,8	4,22*	0,091*	10,5	7,7*	6,3
3	C	89,1	3,0	4,14*	0,096*	10,9	7,9*	6
4	NC	89,2	3,7	4,15*	0,126	10,8	7,1*	6,0
5	NC	87,3	3,3	4,76	0,119	12,7	9,4	6,5
6	C	86,7	3,6	4,70	0,124	13,3	9,7	6,5
7	C	85,8	4,1	4,23*	0,111	14,2	10,1	6,7
8	C	88,2	4,0	3,36*	0,084*	10,8	7,8*	7,0
9	C	89,7	2,8	3,85*	0,126	10,3	7,5*	6,7
10	C	89,7	2,7	4,21*	0,088*	10,3	7,6*	6,0
11	C	88,8	2,9	4,17*	0,087*	11,2	8,3	6,3
12	NC	89,0	3,6	4,14*	0,122	11,0	7,4*	6,0
13	NC	89,0	3,4	4,24*	0,119	11,0	7,6*	6,5
14	NC	90,1	2,2	4,79	0,071*	9,9	7,7*	6,7
15	C	88,0	3,7	4,49	0,078*	12,0	8,3	7,0
16	C	90,7	3,1	4,83	0,114	9,3	6,2*	7,0
17	C	92,7	2,1	4,54	0,116	7,3	5,2*	7,0
18	C	93,0	1,8	4,48	0,082*	7,0	5,2*	6,3
19	C	89,0	3,4	4,57	0,116	11,0	7,6*	7,0
20	C	87,5	4,2	5,00	0,097*	12,5	8,3	7,0
21	C	88,7	3,5	4,52	0,084*	11,3	7,8*	7,0

Legenda: EST – Extrato seco total; ESD – Extrato seco desengordurado. Valores acompanhados de “*” indicam que estão fora dos padrões da IN 37/2000. NC: Não conforme com o valor padrão de $5,0 \times 10^5$ para contagem padrão em placas descrito na IN 37/2000. C: Conforme com o valor padrão de $5,0 \times 10^5$ para contagem padrão em placas descrito na IN 37/2000.

Dez amostras (48%) se apresentaram com valor de acidez abaixo da faixa recomendada pela IN 37/2000 (0,11-018 % ácido láctico para leite de cabra cru congelado, visto que as amostras foram congeladas após a análise microbiológica, para posterior realização das análises físico químicas.). Outras dez amostras apresentaram teor de lactose abaixo do mínimo estabelecido (4,3%) e 14 (67%) amostras apresentaram valores de extrato seco desengordurado abaixo do mínimo estabelecido (8,2%), valor este relacionado com o teor de umidade e o teor de gordura.

Os baixos valores de acidez podem ser justificados pelo fato da colheita de amostras ter sido de “leite de retenção”, que é o leite obtido na fase final da lactação do animal, tendo suas características físico-químicas alteradas. Ainda, algumas amostras podem estar relacionadas com a ocorrência de mastite na cabra, pois isto acarreta valores menores de acidez, teor de lactose e teor de gordura (BRITO & BRITO, 1998), como observado na amostra 8, que apresenta os três valores baixos e de um grupo de três cabras deste produtor, apenas esta apresentou este comportamento nos parâmetros físico-químicos.

As amostras 17 e 18 apresentaram valores muito altos de umidade e muito baixos de gordura, porém os valores de lactose detectados foram normais, e suas contagens microbianas se mostraram baixas. Isto pode ser relacionado ao descongelamento múltiplo das amostras para realização das análises físico-químicas.

A amostra 14, que apresentou a maior contagem microbiana e maior diversidade de micro-organismos, teve reflexos em seus parâmetros físico-químicos. Seu extrato seco se apresentou baixo, indicando relação direta com a contagem microbiana e produção de enzimas deteriorantes, aumentando o valor de umidade e conseqüentemente diminuindo os valores de gordura e acidez.

5.11 DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Todas as 21 amostras de leite caprino cru apresentaram resultado negativo no DelvoTest. A **Figura 24** exibe um exemplo de dois resultados de amostras estudadas, ao lado de um teste usado como controle negativo. Espera-se que o fato da ausência de resíduos de antibióticos se dê pelo fato das amostras terem sido obtidas de pequenos produtores, que não devem fazer uso de medicamentos para tratar seus poucos animais.



Figura 24: Resultados negativos do DelvoTest para duas amostras de leite de cabra cru comparativamente ao controle negativo (à esquerda). O controle negativo se mantém na coloração original (roxa), enquanto nos tubos inoculados foi observada ausência de resíduos inibitórios, permitindo que o esporo germinasse e fermentasse o açúcar do meio, alterando seu pH e ocasionando a viragem do indicador para amarelo.

Um estudo recente demonstrou que 46% de amostras de leite de cabra analisadas na Bahia apresentaram resíduos de antibióticos acima do limite máximo recomendado (LMR), a partir do uso de testes rápidos de detecção, sendo que determinadas propriedades apresentaram percentual de até 67% de amostras com resultado positivo. Esse percentual se revelou consideravelmente maior em relação à estudos realizados na década passada, que oscilaram entre 7 e 30% de amostras com resíduos de antibióticos identificados, revelando a gravidade e o avanço deste problema de saúde pública (SANTOS, CRUZ e BRANDÃO, 2015).

Evidencia-se que o fato de haver baixa taxa de resistência da microbiota do leite de cabra cru neste estudo pode justificar-se pela ausência de resíduos de antimicrobianos.

6 CONCLUSÕES

- O leite de cabra cru analisado neste trabalho se mostrou com grande população microbiana de bacilos Gram-negativos, especialmente a família *Enterobacteriaceae* e os gêneros *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Chama a atenção, comparativamente ao leite bovino, a grande variedade de espécies de *Pseudomonas* encontradas.
- Altas contagens de mesófilos totais aeróbios em cerca de um terço das amostras sugerem que os pequenos produtores alvo deste estudo não praticam as boas práticas de higiene da forma correta, havendo falha em algum ponto da produção.
- A caracterização dos isolados revelou resultados preocupantes em termos de segurança do alimento: Além da considerável taxa de atividade produtora de biofilme, ligada à disseminação de patógenos pelo processo produtivo, em especial enterobactérias, atividades proteolítica e lipolítica foram detectadas em quase um terço dos isolados, ressaltando o grave problema ocasionado pelas enzimas deteriorantes termoestáveis, que pode resultar em prejuízo aos produtores pela desestabilização do produto.
- Com a verificação dos parâmetros físico-químicos, foi possível observar importantes indicadores, como a possibilidade de mastite na cabra leiteira e como a verificação do efeito dos micro-organismos nas propriedades do leite, como a redução do extrato seco total em virtude da ação de enzimas deteriorantes.
- Em virtude de as amostras serem provenientes de pequenos produtores, foram observadas baixas taxas de resistência dos isolados, possivelmente pela razão de que não há um descontrole na aplicação de medicação nos animais como é relatado nas grandes indústrias. Ainda, este fato é relacionado à ausência de resíduos de antimicrobianos nas amostras.
- Foram identificadas altas taxas de identificação de fenótipos produtores de enzimas deteriorantes de antimicrobianos (ESBL e KPC), embora este comportamento não tenha sido evidenciado no teste fenotípico. Este fato ressalta a dificuldade laboratorial de se identificar a produção destas enzimas, dificultando o tratamento e facilitando a disseminação dos micro-organismos produtores.
- Assim, com o ascendente consumo do leite caprino, frente a seus benefícios quando comparado ao leite bovino, fica evidenciado o alto risco do consumo do leite de cabra cru, devendo ser tomadas medidas de conscientização para que seu consumo não ocorra. Sugere-se, portanto, maior rigor de fiscalização nos produtores para que as boas práticas de higiene sejam seguidas à risca.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABED, B. K.; AUTHMAN, S. H.; YASSEIN, K. H. Optimization of extracellular protease extracted from *Escherichia coli*. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 3, n. 2, p. 113-118, 2016.

AGRIMONTI, C.; BOTARI, B.; SARDARO, M. L. S.; MARMIROLI, N. Application of real-time PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 53, n. 7, p. 1157-1226, 2017.

ÁLVAREZ-SUÁREZ, M.; ANDRÉS, O.; GARCÍA-LOPEZ, M.; SANTOS, J. A. Microbiological Examination of Bulk Tank Goat's Milk in the Castilla y León Region in Northern Spain. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 12, p.2227-2232, 2015.

AMORIM, A. M. B.; NASCIMENTO, J. S. A Highlight for Non-*Escherichia coli* and Non-*Salmonella* sp. Enterobacteriaceae in Dairy Foods Contamination. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p.1-4, 2017^a.

AMORIM, A. M. B.; NASCIMENTO, J. S. *Acinetobacter*: an underrated foodborne pathogen?. **The Journal Of Infection In Developing Countries**, v. 11, n. 02, p.111-114, 2017^b.

ARAÚJO, B. C.; MORAES, M. S.; COSTA, L. E. O.; NASCIMENTO, J. S. Short communication: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolated from infant milk formula and utensils in a nursery in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p.2303-2306, 2015.

ASWATHANARAYAN, J. B.; VITTAL, R. R. Attachment and biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* PSD4 isolated from a dairy processing line. **Food Science And Biotechnology**, v. 23, n. 6, p.1903-1910, 2014.

ATROUNI, A. A.; JOLY-GUILLOU, M.; HAMZE, M.; KEMPF, M. Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

AWOSILE, B. B.; MCCLURE, J. T.; SANCHEZ, J.; VANLEEUEWEN, J.; RODRIGUEZ, J. C. L.; KEEFE, G.; HEIDER, L. C. Short communication: Extended-spectrum cephalosporin-

resistant *Escherichia coli* in colostrum from New Brunswick, Canada, dairy cows harbor bla_{CMY-2} and bla_{TEM} resistance genes. **Journal Of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p.7901-7905, 2017.

BALTHAZAR, C. F.; PIMENTEL, T. C.; FERRÃO, L. L.; ALMADA, C. N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; MOLLAKHALILI, N.; MORTAZAVIAN, A. M.; NASCIMENTO, J. S.; SILVA, M. C.; FREITAS, M. Q.; SANT'ANA, A. S.; GRANATO, D.; CRUZ, A. G. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 16, n. 2, p.247-262, 2017.

BAUR, C.; KREWINKEL, M.; KRANZ, B.; NEUBECK, M.; WENNING, M.; SCHERER, S.; STOECKEL, M.; HINRICHS, J.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 23-29, 2015.

BECTON, DICKINSON AND COMPANY. **Difco™ & BBL™ Manual: Manual of Microbiological Culture Media**. 2 ed. Maryland, Estados Unidos da América, p. 513-514, 2009.

BELTRÁN, M. C.; ROMERO, T.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Evaluation of the Charm maximum residue limit β -lactam and tetracycline test for the detection of antibiotics in ewe and goat milk. **Journal Of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2737-2745, 2013.

BELTRÁN, M. C.; BORRÀS, M.; NAGEL, O.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Validation of Receptor-Binding Assays To Detect Antibiotics in Goat's Milk. **Journal Of Food Protection**, v. 77, n. 2, p. 308-313, 2014.

BEZERRA, T. K. A.; ARCANJO, N. M. O.; ARAUJO, A. R. R.; QUEIROZ, A. L. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; GOMES, A. M. P.; MADRUGA, M. S. Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 76, p.209-215, 2017.

BHAT, S; MULKI, S; RAMAMURTHY, K. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in intensive care unit patients. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 21, n. 8, p. 525-527, 2017.

BION, C.; BECK-HENZELIN, A.; QU, Y.; PIZZOCRI, G.; BOLZONI, G.; BUFFOLI, E. Analysis of 27 antibiotic residues in raw cow's milk and milk-based products - validation of Delvotest® T. **Food Additives & Contaminants**, v. 33, n. 1, p. 54-59, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boas práticas em microbiologia clínica**, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica Nº 01/2013. **Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes**, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 12/2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa De Análise De Resíduos De Medicamentos Veterinários Em Alimentos De Origem Animal**. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta pública nº 542, de 17 de julho de 2018**. 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC / Animal**. 2017. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes> >. Acesso em: 25 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 37, de 31 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 62, de 29 de dezembro de 2011**. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 62, de 26 de agosto de 2003.** Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, 2003.

BRIDIER, A.; SANCHEZ-VIZUETE, P.; GUILBAUD, M.; PIARD, J. C.; NAITALI, M.; BRIANDET, R. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v. 45, p.167-178, 2015.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. **Qualidade Higiênica do Leite.** Embrapa - Cnpq, 1998.

CAIS-SOKOLIŃSKA, D.; WÓJTOWSKI, J.; PIKUL, J.; LASIK-KURDYŚ, M. Analysis of metabolic activity of lactic acid bacteria and yeast in model kefir made from goat's milk and mixtures of goat's milk with mare's milk based on changes in electrical conductivity and impedance. **Mljekarstvo**, p.277-282, 2017.

CALDERA, L.; FRANZETTI, L.; VAN COILLIE, E.; DE VOS, P.; STRAGIER, P.; DE BLOCK, J.; HEYNDRIKX, M. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. **Food Microbiology**, v. 54, p.142-153, abr. 2016.

CAPODIFOGGIO, E.; VIDAL, A. M. C.; LIMA, J. A. S.; BORTOLETTO, F.; D'ABREU, L. F.; GONÇALVES, A. C. S.; VAZ, A. C. N.; BALIEIRO, J. C. C.; NETTO, A. S. Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. **Journal Of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p.5214-5223, 2016.

CAVICCHIOLI, V. Q.; SCATAMBURLO, T.M.; YAMAZI, A. K.; PIERI, F. A.; NERO, L. A. Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. **Journal Of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p.8386-8390, 2015.

CHAMPAGNE, C. P.; CRUZ, A. G.; DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion In Food Science**, v. 22, p.160-166, 2018.

CHEN, L.; ZHANG, Q.; JI, Z.; SHU, G.; CHEN, H. Production and fermentation characteristics of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides of goat milk fermented by a novel wild *Lactobacillus plantarum* 69. **Lwt**, v. 91, p.532-540, 2018.

CHIERICI, M.; PICOZZI, C.; LA SPINA, M. G.; ORSI, C.; VIGENTINI, I.; ZAMBRINI, V.; FOSCHINO, R. Strain Diversity of *Pseudomonas fluorescens* Group with Potential Blue Pigment Phenotype Isolated from Dairy Products. **Journal Of Food Protection**, v. 79, n. 8, p.1430-1435, 2016.

CLSI - Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p.1-28, 2017.

CORRY, J. E. L.; CURTIS, G. D. W.; BAIRD, R. M. Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar. **Handbook Of Culture Media For Food Microbiology**, p.626-628, 2003.

COSTA, M. P.; FRASAO, B. S.; SILVA, A. C.; FREITAS, R. Q.; FRANCO, R. M.; CONTE-JUNIOR, C. A. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. **Journal Of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p.5995-6003, 2015.

COUGHLAN, L. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.1641-1662, 2016.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **Fems Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

DECIMO, M.; SILVETTI, T.; BRASCA, M. Antibiotic Resistance Patterns of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria from Bulk Tank Milk. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 4, p. 944-951, 2016.

DECIMO, M.; MORANDI, S.; SILVETTI, T.; BRASCA, M. Characterization of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria isolated from Italian Bulk Tank Milk. **Journal Of Food Science**, v. 79, n. 10, p.2081-2090, 2014.

DIXON, M.; FLINT, S.; PALMER, J.; LOVE, R.; BIGGS, P.; BEUGER, A. Analysis of culturable and non-culturable bacteria and their potential to form biofilms in a primary treated dairy wastewater system. **Environmental Technology**, v. 39, n. 17, p.2185-2192, 2017.

ELWOOD, P. C.; PICKERING, J. E.; GIVENS, D. I.; GALLACHER, J. E. The Consumption of Milk and Dairy Foods and the Incidence of Vascular Disease and Diabetes: An Overview of the Evidence. **Lipids**, v. 45, n. 10, p.925-939, 2010.

FAO, Food And Agriculture Organization Of The United Nations. **FAOSTAT – Statistic Database**. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; REU, K. D.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRICKX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCHA, S.; MOUSSIEGT S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O. Review of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p.190-212, 2013.

FERNANDES, S. A. A.; MAGNAVITA, A. P.; FERRAO, S. P.; GUALBERTO, S. A.; FALEIRO, A. S.; FIGUEIREDO, A. J.; MATARAZZO, S. V. Daily ingestion of tetracycline residue present in pasteurized milk: a public health problem. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 21, n. 5, p. 3427-3434, 2013.

FERREIRA, A. A.; MARQUES, K. A.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, E. M. F.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L. Influência da atividade enzimática de pseudomonas fluorescens 041 em labneh1. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, v. 385, n. 67, p.17-24, 2012.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-847, 1989.

GAZIN, M.; PAASCH, F.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1140-1146, 2012.

GOLINELLI, L. P.; CARVALHO, A. C.; CASAES, R. S.; LOPES, C. S. C.; DELIZA, R.; PASCHOALIN, V. M. F.; SILVA, J. T. Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese. **Journal Of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p.6693-6699, 2014.

GURUNG, M. NAM, H. M; TAMANG, M. D.; CHAE, M. H.; JANG, G. C.; LIM, S. K.. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Acinetobacter from raw bulk tank milk in Korea. **Journal Of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p.1997-2002, 2013.

HAJI, H. B.; FARZANEHKHAH, M.; DOLATYAR, A.; IMANI, M.; FARZAMI, M. R.; RAHBAR, M.; HAJIA, M. A study on prevalence of KPC producing from Klebsiella pneumoniae using Modified Hodge Test and CHROMagar in Iran. **Annals of Biological Research**, v. 3, n. 12, p.5659-5664, 2012.

HASSAN, A.; USMAN, J.; KALEEM, F.; OMAIR, M.; KHALID, A.; IQBAL, M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p.305-311, 2011

HEDAYATI S.; EFTEKHAR, F.; HOSSEINI, S. M. Biofilm Formation by Bacteria Isolated from Intravenous Catheters. **Journal Of Medical Bacteriology**, v. 3, n. 3, p. 26-31, 2014.

HERNÁNDEZ-GÓMEZ, C.; BLANCO, V. M.; MOTOA, G.; CORREA, A.; MAYA, J. J.; CADENA, E.; PERENGUEZ, M.; ROJAS, L.; HERNANDEZ, A.; VALLEJO, M.; VILLEGAS, M. V. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. **Biomédica**, v. 34, p.91-100, 2013.

HINTHONG, W; PUMIPUNTU, N; SANTAJIT, S; KULPEANPRASIT, S; BURANASINSUP, S; SOOKRUNG, N; CHAICUMPA, W; AIUMURAI, P; INDRAWATANNA, N. Detection and drug resistance profile of *Escherichia coli* from subclinical mastitis cows and water supply in dairy farms in Saraburi Province, Thailand. **Peerj**, v. 5, p.343-349, 2017.

HODGKINSON, A. J.; WALLACE, O. A. M.; BOGGS, I.; BROADHURST, M.; PROSSER, C. G. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. **Food Chemistry**, v. 245, p.275-281, 2017.

HU, Z.; MENG, X.; LIU, F. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk. **International Dairy Journal** v. 55, p.72-78, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2016**, v. 44, 2016.

IBRAHIM, D. R.; DODD, C. E. R; STEKEL, D. J; RAMSDEN, S. J; HOBMAN, J.L. Multidrug resistant, extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm. **Fems Microbiology Ecology**, v. 92, n. 4, p.13-19, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4^a ed., 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 668 p.

JÚNIOR, J. C. R.; JUNIOR, P. I. T.; OLIVEIRA, A. L. M.; RIOS, E. A.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Proteolytic and lipolytic potential of *Pseudomonas* spp. from goat and bovine raw milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 8, p.1577-1583, 2018.

KATTER, E. S.; SHERIF, H. W. Rapid Detection of Extended Spectrum B-lactamase (ESBL) Producing Strain of *Escherichia coli* in Urinary Tract Infections Patients in Benha University Hospital, Egypt. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 4, p.443-453, 2014.

KINIK, O., KESENKAS, H., ERGONUL, P. G., AKAN, E., KINIK, Ö., KESENKAŞ, H., AKAN, E. The effect of using pro and prebiotics on the aromatic compounds, textural and sensorial properties of synbiotic goat cheese. **Mljekarstvo**, v. 67, p. 71–85, 2017.

KONDYLI, E.; SVARNAS, C.; SAMELIS, J.; KATSIARI, M. C. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. **Small Ruminant Research**, v. 103, n. 2-3, p.194-199, 2012.

KRÖMKER, V; LEIMBACH, S. Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 52, p.21-29, 2017.

LANDMAN, D.; URBAN, C.; BACKER, M.; KELLY, P.; SHAH, N.; BABU, E.; BRATU, S.; QUALE, J. Susceptibility Profiles, Molecular Epidemiology, and Detection of KPC-Producing *Escherichia coli* isolates from the New York City Vicinity. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p.4604-4607, 2010.

LIMA, P. G.; CABRAL, J. P. L. G.; SILVA, T. M.; ESPER, L. M. R.; GONZALEZ, A. G. M.; FRANCO, R. M. Formação de biofilmes de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga sorotipos O153:H25, O113:H21 e O111:H8 em superfície de aço inoxidável e eficácia de sanitizante. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 2, p. 134-139, 2015.

LIMA, I. S. S.; GARCEZ, B. S.; ALVES, A. A.; AQUINO, F. C.; BORGES, L. S.; CARVALHO, W. F. Fat protected and profile of fatty acids goat milk: a review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 4, p.830-840, 2016.

LIRA, M. C.; GIVISIEZ, P. E. N.; SOUSA, F. G. C.; MAGNANI, M.; SOUZA, E. L.; SPRICIGO, D. E.; GEBREYES, W. A.; OLIVEIRA, C. J. B. Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 9, p. 932-938, 2015.

MACHADO, G. P.; SILVA, R. C.; GUIMARÃES, F. F.; SALINA, A.; LANGONI, H. Detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* in Brazilian mastitic milk goats by multiplex-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p.1358-1364, 2018.

MACHADO, T. D. A. G.; OLIVEIRA M. E. G.; CAMPOS, M. I. F.; ASSIS, P. O. A.; SOUZA, E. L.; MADRUGA, M. S.; PACHECO, M. T. B.; PINTADO, M. M. E.; QUEIROGA, R. C. R. E. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Lwt**, v. 80, p.221-229, 2017.

MAGIORAKOS, A. -P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 18, n. 3, p.268-281, 2012.

MAHLANGU, P.; MAINA, N.; KAGIRA, J. Prevalence, Risk Factors, and Antibiogram of Bacteria Isolated from Milk of Goats with Subclinical Mastitis in Thika East Subcounty, Kenya. **Journal Of Veterinary Medicine**, v. 2018, p.1-8, 2018.

MANHAS, A.; AGGARWAL P.; BALA, M.; GUPTA, S. ESBL Detection: Prevalence & Comparison With New Criteria. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 1, n. 3, p. 209-214, 2012.

MARTIN, N. H.; TRMČIĆ, A.; HSIEH, T.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.1-8, 2016.

MATHUSA, E.C.; CHEN, Y.; ENACHE, E.; HONTZ, L. Non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli in foods. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 1721–1736, 2010.

MENG, L.; LIU, H.; DONG, L.; ZHENG, N.; XING, M.; ZHANG, Y.; ZHAO, S.; WANG, J. Identification and proteolytic activity quantification of Pseudomonas spp. isolated from different raw milks at storage temperatures. **Journal Of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2897-2905, 2018.

MINOTTO, E.; MILAGRE, L. P.; OLIVEIRA, M. T.; VAN DER SAND, S. T. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **Journal of Advanced Scientific Research**, v. 5, n. 2, p. 16-23, 2014.

MOGHA, K. V.; SHAH, N. P.; PRAJAPATI, J. B.; CHAUDHARI, A. R. Biofilm - a threat to dairy industry. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 6, p. 459-466, 2014.

MOGHADAM, M. M.; AMIRI, M.; RIABI, H. R.; RIABI, H. R. Evaluation of Antibiotic Residues in Pasteurized and Raw Milk Distributed in the South of Khorasan-e Razavi Province, Iran. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, v. 10, n. 12, p. 31-35, 2016.

MONTE, D. F. M.; LOPES JÚNIOR, W. D.; OLIVEIRA, C. J. B; MOURA, J. F. P. Indicadores de qualidade microbiológica do leite caprino produzido na Paraíba. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 12, n. 4, p.354-358, 2016.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Frontiers in cell and infection microbiology**, v. 7, n. 8, p.327-345, 2017.

NTULI, V.; NJAGE, P. M.; BUYS, E. M. Characterization of Escherichia coli and other Enterobacteriaceae in producer-distributor bulk milk. **Journal Of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9534-9549, 2016.

OLIVEIRA, D. I.; WILBEY, R. A.; GRANDISON, A. S.; DUARTE, L. C.; ROSEIRO, L. B. Separation of oligosaccharides from caprine milk whey, prior to prebiotic evaluation. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p.102-106, 2012.

OSMAN, K. M.; ZOLNIKOV, T. R.; SAMIR, A.; ORABI, A. Prevalence, pathogenic capability, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of Listeria in goat and sheep milk confirms need of hygienic milking conditions. **Pathogens And Global Health**, v. 108, n. 1, p.21-29, 2013.

PALOMBA, R.; FORMISANO, G.; ARRICHIELLO, A.; AURIEMMA, G.; SARUBBI, F. Development of a laboratory technique for the evaluation of protease enzymes activity in goat and sheep milk. **Food Chemistry**, v. 221, p.1637-1641, 2017.

PARK, Y. W.; JUARÉZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p.88-113, 2007.

PATZER, C. C. W.; SILVA, C. F.; LEWOY, A. M. B.; SANTOS, R. P. Georreferenciamento de bactérias multirresistentes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Journal of Infection Control**, v. 4, n. 3, 2015.

PRABHA, R.; EASOW, J. M.; SWAPNA, M. Phenotypic detection of Extended Spectrum Beta- Lactamase producing uropathogens using DDST, PCT, Chrom agar and E-test – A comparative study. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 4, p.565-577, 2016.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. Identification of *Enterobacteriaceae*. **UK Standards for Microbiology Investigations**, v. 16, n. 4, 2015.

QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G.; BISCONTINI, T. M. B.; MEDEIROS, A. N.; MADRUGA, M. S.; SCHULER, A. R. P. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 430-437, 2007.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **Fems Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M.; BAINES, S. K. Co-culturing of probiotics influences the microbial and physico-chemical properties but not sensory quality of fermented dairy drink made from goats' milk. **Small Ruminant Research**, v. 136, p.104-108, 2016.

ROMERO, T.; BELTRÁN, M. C.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Detection of antibiotics in goat's milk: effect of detergents on the response of microbial inhibitor tests. **Journal Of Dairy Research**, v. 81, n. 3, p. 372-377, 2014.

ROSSI, C.; SERIO, A.; CHAVEZ-LOPEZ, C.; ANNIBALLI, F.; AURICCHIO, B.; GOFFREDO, E.; CENCI-GOGA, B. T.; LISTA, F.; FILLO, S.; PAPARELLA, A. Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. **Food Control**, v. 86, p.241-248, 2018.

SAMRA, Z.; BAHAR, J.; MADAR-SHAPIRO, L.; AZIZ, N.; ISRAEL, S.; BISHARA, J. Evaluation of CHROMagar KPC for Rapid Detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p.3110-3111, 2008.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Research International**, v. 2016, p.1-8, 2016.

SANTOS, J. F.; CRUZ, L. Z.; BRANDÃO, L. G. N. Perfil Lipídico e Resíduos de Antibióticos no Leite Caprino no Município de Senhor do Bonfim –Ba. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 2, n. 2, p. 92-98, 2015.

SARKAR, S. Microbiological Considerations: Pasteurized Milk. **International Journal Of Dairy Science**, v. 10, n. 5, p. 206-218, 2015.

SATO, J.; OHNO, H.; MATSUI, C. Applicability of the ISO Enterobacteriaceae Test for Determining the Suitability of Pasteurized Milk for Shipment. **Japanese Journal Of Food Microbiology**, v. 31, n. 2, p.86-92, 2014.

SCATAMBURLO, T.M.; YAMAZI, A. K.; CAVICCHIOLI, V. Q.; PIERI, F. A.; NERO, L. A. Spoilage potential of Pseudomonas species isolated from goat milk. **Journal Of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 759-764, 2015.

SHERIFF, R.; SHEENA, A. Assessment of Biofilm Production in Clinically Significant Isolates of Staphylococcus epidermidis and Comparison of Qualitative and Quantitative Methods of Biofilm Production in a Tertiary Care Hospital. **International Journal of Scientific Study**, v. 4, n. 6, p. 41-46, 2016.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U.; PROSSER, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2-3, p.110-124, 2010.

SILVA, J. B. P.; MACÊDO, C. S.; OLIVEIRA, S. M. S.; RANGEL, A. H. N.; MURMANN, L. Qualidade microbiológica do leite caprino em propriedades rurais da região de macaíba/rn. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p.67-73, 2017.

SKOČKOVÁ, A.; BOGDANOVIČOVÁ, K.; KOLÁČKOVÁ, I.; KARPÍSKOVÁ, R. Antimicrobial-Resistant and Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing Escherichia coli in Raw Cow's Milk. **Journal Of Food Protection**, v. 78, n. 1, p.72-77, 2015.

STEPHAN, R.; SCHUMACHER, S.; CORTI, S.; KRAUSE, G.; DANUSER, J.; BEUTIN, L. Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Swiss Raw Milk Cheeses Collected at Producer Level. **Journal Of Dairy Science**, v. 91, n. 7, p. 2561-2565, 2008.

STOECKEL, M.; LIDOLT, M.; STRESSLER, T.; FISCHER, L.; WENNING, M.; HINRICHS, J. Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. **International Dairy Journal**, v. 61, p.250-261, 2016.

TABLA, R.; GOMÉZ, A.; SIMANCAS, A.; REBOLLO, J. E. Early blowing in raw goats' milk cheese: gas production capacity of Enterobacteriaceae species present during manufacturing and ripening. **Journal Of Dairy Research**, v. 85, n. 3, p.331-338, 2018.

TAMANG, M. D.; GURUNG, M.; NAM, H. M.; KIM, S. R.; JANG, G. C.; JUNG, S. C.; LIM, S. K. Short communication: Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Acinetobacter* isolates recovered from bulk tank milk. **Journal Of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p.704-709, 2014.

TAYLOR, M. W.; MACGIBBON, A. K. H. Milk Lipids: General Characteristics. **Encyclopedia Of Dairy Sciences**, p.649-654, 2011.

TCHAPCHET, S.; HANSEN, J. The Yin and Yang of host-commensal mutualism. **Gut Microbes**, v. 2, n. 6, p. 347-352, 2011.

TORMO, H.; AGABRIEL, C.; LOPEZ, C.; LEHKAL, D. A. H.; ROQUES, C. Relationship between the Production Conditions of Goat's Milk and the Microbial Profiles of Milk. **International Journal Of Dairy Science**, v. 6, n. 1, p.13-28, 2011.

TRMČIĆ, A.; CHAUHAN, K.; KENT, D. J.; RALYEA, R. D.; MARTIN, N; H.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. **Journal Of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p.6105-6120, 2016.

TROMBETE, F. M.; SANTOS, R. R.; SOUZA, A. L. R. Resíduos de antibióticos en la leche comercializada en Brasil: una revisión de los estudios publicados en los últimos años. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 41, n. 2, p.191-197, 2014.

VERRUCK, S.; DANTAS, A.; PRUDENCIO, E. S. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. **Journal Of Functional Foods**, v. 52, p.243-257, 2019.

VILLAR, H. E.; BASERNI, M. N.; JUGO, M. B. Faecal carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae and carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in community settings. **The Journal Of Infection In Developing Countries**, v. 7, n. 08, p.630-634, 2013.

YAMAZI, A. K.; MOREIRA, T. S.; CAVICCHIOLI, V. Q.; BURIN, R. C. K.; NERO, L. A. Long cold storage influences the microbiological quality of raw goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p.205-210, 2013.

WESCHENFELDER, S.; PAIM, M. P.; GERHARDT, C.; WIEST, J. M. Avaliação da rotulagem nutricional e das características físico-químicas e microbiológicas de diferentes marcas de leite pasteurizado e leite UHT. **Boletim de Indústria Animal**, v. 73, n. 1, p. 32-38, 2016.

WONG, D.; NIELSEN, T. B.; BONOMO, R. A.; PANTAPALANGKOOR, P.; LUNA, B.; SPELLBERG, B. Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 409-447, 2016.

WHO. World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Codex Alimentarius**, 2018.

WHO. World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The International Pharmacopoeia**, 2017.

ZHAO, H. X.; ZHAO, J. L.; SHEN, J. Z.; FAN, H. L.; GUAN, H.; AN, X. P.; LI, P. F. Prevalence and Molecular Characterization of Fluoroquinolone Resistance in Escherichia coli Isolates from Dairy Cattle with Endometritis in China. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 2, p.162-169, 2014

ZHANG, W. Q., GE, W. P., YANG, J., XUE, X. C., WU, S. Z., CHEN, Y., & QIN, L. H. Comparative of in vitro antioxidant and cholesterol-lowering activities of fermented goat & cow milk. **Resources Environment and Engineering**, p. 417–424, 2015.

ZHANG, F.; WANG, Z.; LEI, F.; WANG, B.; JIANG, S.; PENG, Q.; ZHANG, J.; SHAO, Y. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. **Journal Of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p.7812-7824, 2017.

ANEXO 1

RESUMO DE TRABALHO ENVIADO PARA APRESENTAÇÃO ORAL À II JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO / VII FÓRUM DE INOVAÇÃO, TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO DO IFRJ

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *PSEUDOMONAS SP*
ISOLADOS DE LEITE CAPRINO CRU

Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Brendon Chaves Araújo (PIVICT/IFRJ), Janaína dos Santos Nascimento.
janaina.nascimento@ifrj.edu.br

Resumo: O Brasil possui um rebanho de caprinos que figura entre os vinte maiores do mundo. O leite de cabra vem se revelando uma opção ao leite de origem bovina, pois a proteína α -s1 caseína, associada à alergenicidade, está presente no leite bovino em cerca de 12 a 15 g/L, enquanto no leite caprino este valor atinge, no máximo, 7 g/L. Com relação ao conteúdo lipídico, o leite de cabra tem glóbulos de gordura menores e maior presença de ácidos graxos de cadeia média e curta, causando um impacto positivo no processo digestivo. O leite de diversos mamíferos em geral, tem um alto valor nutritivo e por isso tende a ser um meio de cultura excelente para micro-organismos deteriorantes e patogênicos e, segundo a literatura, apresenta grande variedade de bactérias Gram-negativas. Neste trabalho, objetivou-se a detecção e a caracterização de espécies do gênero *Pseudomonas* em 12 amostras de leite de cabra de diversas cidades do Estado do Rio de Janeiro. A obtenção dos isolados foi realizada através de plaqueamento das amostras em Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG). Os isolados foram identificados por meio de espectrometria de massas (ionização e dessorção à laser assistida por matriz – MALDI-TOF). A caracterização se deu por meio da avaliação de atividades lipolítica (Ágar leite), proteolítica (Ágar *Spirit Blue* modificado), hemolítica (Ágar sangue) e produtora de biofilme (Ágar vermelho congo). Foram obtidos 42 isolados, sendo identificadas as espécies *P. fulva*, *P. monteilli*, *P. rhodesiae*, *P. putida*, *P. plecoglossicida* e *P. mosselii*. Dos 30 isolados dos quais os testes já foram concluídos, 33% apresentaram atividade proteolítica, 27% apresentaram atividade lipolítica e 20% apresentaram atividade hemolítica. Nenhum isolado apresentou-se como produtor de biofilme. Como continuidade do estudo, pretende-se avaliar os isolados quanto à resistência a diferentes classes de antibióticos, pelo método da difusão em disco, assim como verificar a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e de carbapenemases (KPC). Essa caracterização permitirá uma melhor avaliação do perfil das *Pseudomonas* encontradas no leite caprino cru, que podem tanto afetar sua qualidade quanto causar impactos na saúde dos consumidores.

Palavras-chave: leite; caprino; *Pseudomonas*; qualidade; resistência

ANEXO 2

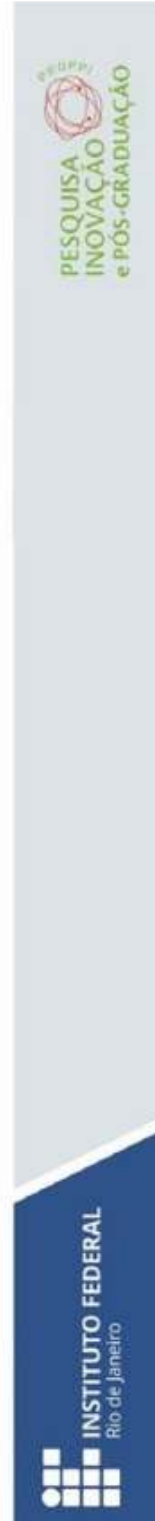
CERTIFICADO DE TRABALHO APRESENTADO NA II JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO / VII FÓRUM DE INOVAÇÃO, TECNOLOGIA E EDUCAÇÃO DO IFRJ



CERTIFICADO

O trabalho intitulado DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PSEUDOMONAS SP ISOLADOS DE LEITE CAPRINO CRU, autoria de GUSTAVO LUIS DE PAIVA ANCIENS RAMOS, BRENDON CHAVES ARAÚJO e JANAÍNA DOS SANTOS NASCIMENTO, foi apresentado por GUSTAVO LUIS DE PAIVA ANCIENS RAMOS, na sessão de comunicação oral da II Jornada da Pós-Graduação (JPG), evento concomitante à XII Jornada Interna de Iniciação Científica e Tecnológica (JIT), e ao VII Fórum de Inovação, Tecnologia e Educação (FÓRUM ITE), realizados no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Nilópolis, nos dias 28 e 29 de agosto de 2018.

Rodney Cesar de Albuquerque
Pró-Reitor de Pesquisa, Inovação e Pós-Graduação



ANEXO 3

ARTIGO TÉCNICO ENVIADO À REVISTA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, COM PUBLICAÇÃO PREVISTA PARA O PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2019

Quais os possíveis riscos no consumo de leite de cabra cru?

Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos^{1,2}, Janaína dos Santos Nascimento^{1*}

¹ Laboratório de Microbiologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

² Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Brasil.

O leite de cabra

Os produtos lácteos caprinos são considerados saudáveis e com características bioquímicas e sensoriais desejáveis, permitindo a produção de uma grande variedade de derivados, principalmente vários tipos de queijo com alto valor de mercado (CAVICCHIOLI *et al.*, 2015).

O leite de cabra vem se revelando uma opção ao leite de origem bovina por razões de alergenicidade, especialmente em crianças. Suas composições centesimais são parecidas numericamente, porém existem diferenças estruturais que afetam as características digestivas. A proteína α_{s1} -caseína, associada à alergenicidade, é presente no leite bovino em cerca de 12 a 15 g/L, enquanto no leite caprino, este valor chega no máximo a 7 g/L. Com relação ao conteúdo lipídico, o leite de cabra tem glóbulos de gordura menores e maior presença de ácidos graxos de cadeia média e curta, causando um impacto positivo no processo digestivo (LAI *et al.*, 2016; HODGKINSON *et al.*, 2017).

O Brasil possui um rebanho de caprinos que figura entre os vinte maiores do mundo, sendo que mais da metade deste consiste de animais leiteiros. Ainda assim, a produção nacional é pouco expressiva, correspondendo a apenas 1,66% da produção mundial (15.262.116 toneladas). Em termos de América do Sul, o Brasil é o maior produtor, correspondendo a 80% do total (314.565 toneladas) (FAO, 2016).

Segundo a Instrução Normativa Nº 37 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta o procedimento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra, este é definido como produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados. Neste regulamento técnico são explicitados os requisitos para o processo de produção, assim como sua higiene, controle e beneficiamento. Apresenta, ainda, os critérios de classificação, designação, composição e aborda pontos relacionados a fraudes, contaminantes, rotulagem e critérios microbiológicos (BRASIL, 2000).

Riscos microbiológicos e químicos do leite cru

O leite é um alimento com alto valor nutritivo e, por isso, tende a ser um meio de cultura excelente para micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Devido a esse fato, deve ser obtido em rígidas condições de higiene e imediatamente refrigerado, com posterior tratamento térmico (WESCHENFELDER *et al.*, 2016; ALEGBELEYE *et al.*, 2018). A cadeia de produção de lácteos também contribui para a contaminação, pois além da contaminação primária durante a criação do animal, existem pontos críticos durante o processamento,

transporte e armazenamento dos produtos finais (AGRIMONTI *et al.*, 2017). Logo, as condições higiênico-sanitárias no processo de obtenção do leite estão diretamente relacionadas com os parâmetros microbiológicos do produto, e consequentemente com a qualidade do produto final (QUEIROGA *et al.*, 2007).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresenta o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. No grupo de alimentos denominado leite de bovinos e de outros mamíferos e derivados, onde inclui-se o leite de cabra, são indicados os micro-organismos que devem ser pesquisados, assim como seus valores numéricos máximos, para que a qualidade mínima do produto seja garantida. Para leite fluido pasteurizado, a recomendação é que sejam pesquisados coliformes a 45°C e *Salmonella* spp. Já para queijos, a orientação varia de acordo com o tipo e a umidade de cada produto. Em geral, devem ser pesquisados coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Não há parâmetros para o leite cru (BRASIL, 2001), entretanto, o consumo deste alimento é uma prática muito disseminada em várias regiões do Brasil, o que pode constituir um risco para a saúde do consumidor.

A microbiota natural do leite de cabra cru é composta em sua maior parte por bactérias ácido-láticas, como espécies dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*, e por membros da família *Enterobacteriaceae*. A composição microbiológica pode variar de acordo com a estação do ano em que o leite foi coletado, devido às mudanças na alimentação e na saúde do animal, que podem estar relacionadas à temperatura do ambiente (QUIGLEY, *et al.*, 2013). Este alimento, no entanto, é frequentemente relacionado à presença de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos e *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC). Ainda, é ocasionalmente relacionado à presença de *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., e outros micro-organismos dos gêneros *Salmonella* e *Cronobacter*, ressaltando, assim, que o seu consumo *in natura* pode vir a se tornar problema de saúde pública (ÁLVAREZ-SUÁREZ *et al.*, 2015; OSMAN *et al.*, 2013).

A nível nacional, a presença de micro-organismos potencialmente patogênicos no leite caprino cru também tem sido comumente descrita. Um estudo recente avaliou a qualidade microbiológica do leite caprino cru na Paraíba, onde foram obtidas contagens acima do considerado tolerável de mesófilas totais e de coliformes, indicando falhas no processo higiênico de ordenha. Foram detectadas, ainda, contagens significativas de *Staphylococcus aureus* em cerca de 5% das amostras, revelando um potencial problema relacionado à produção de toxinas por estes micro-organismos e uma possível associação com mastite no animal, uma vez que esta bactéria é a mais relacionada à esta infecção. *Salmonella enterica* foi isolada em 1,3% das amostras pesquisadas, revelando a variedade e gravidade dos patógenos encontrados no leite caprino cru (MONTE *et al.*, 2016).

Outros estudos exibem resultados igualmente preocupantes. Em amostras de leite caprino cru obtidas no estudo de São Paulo, detectou-se alta prevalência (cerca de 35%) e diversidade de micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, além de representantes da família das enterobactérias, ambos frequentemente associados a surtos alimentares e considerados, assim, potenciais riscos à saúde humana (MACHADO *et al.*, 2018a). Essa afirmação é fortemente corroborada por Cavicchioli e colaboradores, que realizaram um estudo em Minas Gerais, com leite de cabra cru, onde além de revelar alta contagem de estafilococos coagulase positiva nas amostras analisadas, também comprovou a produção efetiva de enterotoxinas por estes micro-organismos (CAVICCHIOLI *et al.*, 2015).

Em um trabalho realizado no estado do Rio Grande do Norte, além de amostras de leite caprino cru, foi avaliada também a condição higiênico-sanitária dos manipuladores da ordenha, dos utensílios utilizados durante o processo e dos tetos dos animais. Nos manipuladores, foram encontrados estafilococos coagulase negativa em mais de 70% das

amostras, assim como coliformes totais e termotolerantes em cerca de um quarto dos colaboradores avaliados. Estes resultados evidenciam a higiene precária das mãos antes do processo de ordenha, podendo ocorrer contaminação do leite obtido pelo manipulador. Com relação à superfícies de utensílios (baldes e peneiras) utilizados diretamente no processo de ordenha, 91% das amostras analisadas apresentou contagem total de mesófilos acima de $5,0 \times 10$ UFC/cm², indicando deficiência nos processos de sanitização dos utensílios e falha nos processos de controle. Ainda, cerca de 20% destes utensílios e 52% das amostras de leite apresentaram presença de coliformes totais e termotolerantes e estafilococos coagulase positiva e negativa, indicando alta probabilidade contaminação cruzada (SILVA *et al.*, 2017).

De acordo com Martin e colaboradores, no leite cru de bovinos e outros animais, os coliformes são encontrados em cerca de 98% das amostras. Se detectados mais de 10.000 ufc/mL desse grupo, supõe-se que haja uma correlação com práticas inadequadas de higiene, refrigeração ineficiente do produto ou condição de mastite no animal. Por outro lado, no leite pasteurizado, a presença de coliformes indica contaminação pós-pasteurização, relacionada à formação de biofilme, ou falha no processo térmico (MARTIN *et al.*, 2016). Silva e colaboradores confirmam a importância da observação das práticas de higiene, uma vez que verificaram que a contaminação de utensílios utilizados na ordenha de cabras por coliformes e estafilococos pôde ser corrigida em quase totalidade dos casos após a simples implementação de boas práticas no processo de ordenha (SILVA *et al.*, 2017).

Outro problema que merece destaque quando se trata do consumo de leite caprino cru consiste no fato de que em vacas e cabras no período de lactação, é usual o tratamento de mastites e outras infecções com antibióticos. Porém, o uso indiscriminado e muitas vezes sem o acompanhamento de um médico veterinário pode resultar em superdosagem ou em rota de administração inadequada (BELTRÁN *et al.*, 2013). Pode, ainda, ocorrer o uso de substâncias não adequadas para o animal em questão ou o descumprimento do tempo de não retirada do leite após a administração do medicamento, gerando resíduos no leite obtido (BELTRÁN *et al.*, 2014). Embora o risco de se encontrar resíduos de antibióticos em leite pasteurizado também ocorra, muitos consumidores erroneamente acreditam que leite cru e leite orgânico são, necessariamente, sinônimos, ou ainda, que resíduos de antibióticos podem ser encontrados apenas em leite bovino e não em leite caprino.

Um estudo recente demonstrou que 46% de amostras de leite de cabra analisadas na Bahia apresentaram resíduos de antibióticos acima do limite máximo recomendado, a partir do uso de testes rápidos de detecção, sendo que determinadas propriedades apresentaram percentual de até 67% de amostras com resultado positivo. Esse percentual se revelou consideravelmente maior em relação a estudos realizados na década passada, que oscilaram entre 7 e 30% de amostras com resíduos de antibióticos identificados, revelando a gravidade e o avanço deste problema de saúde pública (SANTOS, CRUZ e BRANDÃO, 2015).

A associação do uso de antimicrobianos nos animais com o desenvolvimento de multirresistência pelos micro-organismos têm desencadeado estudos no sentido de buscar alternativas para o tratamento de infecções, especialmente de mastite, com o objetivo de reduzir a administração destes fármacos (KRÖMKER & LEIMBACH, 2017). A prevenção e o controle da mastite caprina ainda são as melhores opções para evitar a utilização de antibióticos e estão relacionadas a aplicação de medidas sanitárias nas propriedades criadoras e às boas práticas de higiene das glândulas mamárias e dos profissionais envolvidos durante a ordenha, além da sanitização adequada dos utensílios utilizados nesse processo (CONTRERAS *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2018b).

Conclusões

No mercado consumidor brasileiro, assim como em outras partes do mundo, é crescente a demanda por produtos lácteos que possuam boa qualidade e que tenham um longo

prazo de validade. Dessa forma, o leite pasteurizado apresenta uma grande vantagem em relação ao leite cru. Entretanto, o consumo de leite cru é comum em várias cidades brasileiras, por motivos culturais e, nos últimos anos, pelo apelo de ser um produto mais saudável.

Um fato preocupante, que deve ser considerado, consiste na comercialização de leite sem inspeção governamental, principalmente em cidades pequenas, onde grande parte da produção é proveniente de pequenos produtores, e que, na maioria das vezes, acaba sendo sua principal fonte de renda. Além disso, problemas na ordenha ou no armazenamento do leite de cabra cru contribuem para aumentar a contaminação microbiológica do produto, especialmente, em pequenas propriedades. Nesses casos, uma política de conscientização e treinamento com os produtores poderia auxiliar no processo de garantia da qualidade do leite.

Devido ao importante e crescente papel que o setor de produtos lácteos caprinos desempenha na economia nacional e devido aos riscos microbiológicos e químicos que o consumo de leite de cabra cru pode ocasionar, faz-se necessária uma maior fiscalização da comercialização do leite por parte dos órgãos regulamentadores para melhor zelar pela saúde dos consumidores, mas sem causar prejuízo aos pequenos produtores.

Referências

AGRIMONTI, C.; BOTARI, B.; SARDARO, M. L. S.; MARMIROLI, N. Application of real-time PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 53, n. 7, p. 1157-1226, 2017

ALEGBELEYE, O. O., GUIMARÃES, J. T., CRUZ, A. G., & SANT'ANA, A. S. (2018). Hazards of a 'healthy'trend? An appraisal of the risks of raw milk consumption and the potential of novel treatment technologies to serve as alternatives to pasteurization. *Trends in Food Science & Technology*.82: 148-166, 2018.

ÁLVAREZ-SUÁREZ, M.; ANDRÉS, O.; GARCÍA-LOPEZ, M.; SANTOS, J. A. Microbiological Examination of Bulk Tank Goat's Milk in the Castilla y León Region in Northern Spain. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 12, p.2227-2232, 2015.

BELTRÁN, M. C.; BORRÁS, M.; NAGEL, O.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Validation of Receptor-Binding Assays To Detect Antibiotics in Goat's Milk. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 2, p. 308-313, 2014.

BELTRÁN, M. C.; ROMERO, T.; ALTHAUS, R. L.; MOLINA, M. P. Evaluation of the Charm maximum residue limit β -lactam and tetracycline test for the detection of antibiotics in ewe and goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2737-2745, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 12/2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 37, de 31 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra, 2000.

CAVICCHIOLI, V. Q.; SCATAMBURLO, T.M.; YAMAZI, A. K.; PIERI, F. A.; NERO, L. A. Occurrence of Salmonella, Listeria monocytogenes, and enterotoxigenic Staphylococcus in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. **Journal Of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p.8386-8390, 2015

CONTRERAS, A., SIERRA, D., SÁNCHEZ, A., CORRALES, J. C., MARCO, J. C., PAAPE, M. J., & GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, p.145-153, 2007.

FAO, Food And Agriculture Organization Of The United Nations. **FAOSTAT – Statistic Database**. 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 07 jan. 2018.

HODGKINSON, A. J.; WALLACE, O. A. M.; BOGGS, I.; BROADHURST, M.; PROSSER, C. G. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. **Food Chemistry**, v. 245, p.275-281, 2017.

KRÖMKER, V.; LEIMBACH, S. Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 52, p.21-29, 2017.

LAI, C. Y., FATIMAH, A. B., MAHYUDIN, N. A., SAARI, N., & ZAMAN, M. Z. Physico-chemical and microbiological qualities of locally produced raw goat milk. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 2, p. 739-750, 2016.

MACHADO, G. P.; SILVA, R. C.; GUIMARÃES, F. F.; SALINA, A.; LANGONI, H. Detection of Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae and Escherichia coli in Brazilian mastitic milk goats by multiplex-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p.1358-1364, 2018a.

MACHADO, G. P., GUIMARÃES, F. F., MENOZZI, B. D., SALINA, A., POSSEBON, F. S., & LANGONI, H. Occurrence, pathogens and risk factors for subclinical mastitis in dairy goats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1665-1670, 2018b.

MARTIN, N. H.; TRMĉIĆ, A.; HSIEH, T.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.1-8, 2016.

MONTE, D. F. M.; LOPES JÚNIOR, W. D.; OLIVEIRA, C. J. B; MOURA, J. F. P. Indicadores de qualidade microbiológica do leite caprino produzido na Paraíba. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 12, n. 4, p.354-358, 2016.

OSMAN, K. M.; ZOLNIKOV, T. R.; SAMIR, A.; ORABI, A. Prevalence, pathogenic capability, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of *Listeria* in goat and sheep milk confirms need of hygienic milking conditions. **Pathogens And Global Health**, v. 108, n. 1, p.21-29, 2013.

QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G.; BISCONTINI, T. M. B.; MEDEIROS, A. N.; MADRUGA, M. S.; SCHULER, A. R. P. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 430-437, 2007.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. **Fems Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664-698, 2013.

SANTOS, J. F.; CRUZ, L. Z.; BRANDÃO, L. G. N. Perfil Lipídico e Resíduos de Antibióticos no Leite Caprino no Município de Senhor do Bonfim –Ba. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**. v. 2, n. 2, p.92-98, 2015.

SILVA, J. B. P.; MACÊDO, C. S.; OLIVEIRA, S. M. S.; RANGEL, A. H. N.; MURMANN, L. Qualidade microbiológica do leite caprino em propriedades rurais da região de macaíba/m. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p.67-73, 2017.

WESCHENFELDER, S.; PAIM, M. P.; GERHARDT, C.; WIEST, J. M. Avaliação da rotulagem nutricional e das características físico-químicas e microbiológicas de diferentes marcas de leite pasteurizado e leite UHT. **Boletim de Indústria Animal**, v. 73, n. 1, p. 32-38, 2016.

ANEXO 4

ARTIGO TÉCNICO ENVIADO AO SITE MILK POINT, COM PUBLICAÇÃO PREVISTA PARA O PRIMEIRO TRIMESTRE DE 2019

Leite de cabra: aspectos funcionais e benefícios para a saúde

Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos^{1,2}, Janaína dos Santos Nascimento^{1*}

¹ Laboratório de Microbiologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

² Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Brasil.

Para a civilização ocidental, a criação de cabras desempenhou importante papel como fator de sobrevivência no início dos assentamentos, inclusive no Brasil, com os primeiros colonos portugueses trazendo caprinos no início da colonização e deixando no país uma importante fonte de leite, carne e pele, principalmente em áreas de climas mais inóspitos (CORDEIRO & CORDEIRO, 2011).

A composição média do leite de cabra é de 87% de água, 4% de lipídeos, 4% de lactose, 3,5% de proteínas e 1% de cinzas, com pH em torno de 6,5 (PARK, *et al.*, 2007). Tem níveis satisfatórios de minerais como cálcio, cobre, manganês, zinco e selênio, e de vitaminas como vitamina A, niacina e riboflavina (LIMA *et al.*, 2016).

Com relação ao conteúdo lipídico, o leite de cabra tem majoritariamente triacilgliceróis em sua composição (98%), com traços de fosfolipídeos, colesterol e ácidos graxos livres. Ainda, o leite caprino apresenta glóbulos de gordura menores e maior presença de ácidos graxos de cadeia média e curta, causando um impacto positivo no processo digestivo, que também é justificado pela composição dos ácidos graxos. Os ácidos cáprico, caprílico e capróico representam em torno de 15% dos ácidos graxos no leite de cabra, enquanto no leite bovino representam 7%, fato este também associado ao odor característico do leite caprino (TAYLOR & MACGIBBON, 2011).

O conteúdo proteico do leite de cabra, assim como no leite de vaca, é dividido em caseínas e proteínas do soro do leite (*whey proteins*). A maior parte das proteínas do leite bovino é composta pela α_{s1} -caseína, enquanto no leite caprino, as proteínas majoritárias são β -caseína e α_{s2} -caseína. A diferença do conteúdo proteico entre os ruminantes abordados se dá

em razão do polimorfismo genético e sua alta frequência em caprinos, especialmente com relação à α_{s1} -caseína (VERRUCK, DANTAS & PRUDENCIO, 2019).

O leite de cabra vem se revelando uma opção ao leite de origem bovina por razões de alergenicidade, especialmente em crianças. A proteína α_{s1} -caseína, associada a processos alérgicos, é presente no leite bovino em cerca de 12 a 15 g/L, enquanto no leite caprino, este valor chega a, no máximo, 7 g/L. A alergia ao leite de vaca atinge cerca de 6% de crianças brasileiras, e a substituição por leite caprino demonstra resultados satisfatórios em até 40% dos casos. (HODGKINSON *et al.*, 2017).

A β -lactoglobulina do leite de cabra apresenta diferenças com relação ao leite de vaca, gerando peptídeos bioativos durante o processo de digestão e durante o processamento do alimento. Estes peptídeos exercem papéis biológicos específicos, como atividades anti-hipertensivas, antimicrobianas, antioxidantes e imunomoduladoras (BALTHAZAR *et al.*, 2017).

Além da lactose, outros tipos de carboidratos presentes no leite de cabra são oligossacarídeos, glicopeptídeos e glicoproteínas. Os oligossacarídeos do leite caprino exibem uma série de efeitos benéficos à saúde humana, como propriedades antigênicas e efeitos anti-inflamatórios na região intestinal. Ainda, os ácidos linoleicos conjugados presentes no leite, definidos como uma família de isômeros do ácido linoleico, tem importância comprovada na inibição do câncer e aterosclerose e melhora das funções imunológicas (ELWOOD *et al.*, 2010). Com relação ao conteúdo mineral, sabe-se que além do leite caprino ter maiores níveis de cálcio, fósforo, magnésio, ferro e cobre comparativamente ao leite de vaca, suas biodisponibilidades são aumentadas. O conteúdo de vitamina A também se mostra mais elevado em relação ao leite de vaca, pois as cabras são capazes de converter carotenos em vitamina A (VERRUCK, DANTAS & PRUDENCIO, 2019).

Os produtos lácteos caprinos são considerados saudáveis e com características bioquímicas e sensoriais desejáveis, permitindo a produção de uma grande variedade de derivados, principalmente vários tipos de queijo com alto valor de mercado (CAVICCHIOLI *et al.*, 2015). O leite de cabra pode ser utilizado como matéria prima na produção de diversos produtos, como queijos, sorvetes, manteigas, produtos condensados e doces. Estes produtos desempenham importante papel especialmente na dieta de crianças e idosos devido aos seus benefícios relativos aos produtos lácteos bovinos, tornando o leite caprino uma excelente matriz para o desenvolvimento de produtos funcionais, incluindo probióticos e prebióticos (VERRUCK, DANTAS & PRUDENCIO, 2019). O uso do leite como matriz para elaboração

de probióticos é relacionado à sua composição, mais favorável ao desenvolvimento de bifidobactérias e bactérias ácido lácticas (CHAMPAGNE; CRUZ; DAGA, 2018).

Um prebiótico é definido como um substrato que é utilizado seletivamente por um micro-organismo do hospedeiro, gerando efeitos benéficos à saúde. São em sua maioria carboidratos e presentes em maior quantidade no leite de cabra, comparativamente ao leite de outros ruminantes. Um estudo demonstrou que frações do soro do leite caprino, coletado após produção de queijo e ricas em oligossacarídeos, apresentaram funcionalidade e promoção da saúde intestinal, indicando que estes oligossacarídeos concentrados poderiam ser aplicados no desenvolvimento de produtos funcionais derivados de leite de cabra (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Já os probióticos são definidos como micro-organismos viáveis que proporcionam efeitos benéficos à saúde quando presentes em quantidades adequadas no hospedeiro, sendo os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* os mais utilizados em produtos lácteos (CHAMPAGNE, CRUZ & DAGA, 2018). Muitos estudos demonstraram a viabilidade de probióticos em leite de cabra durante o tempo de armazenamento, como leites fermentados, bebidas lácteas fermentadas, iogurte, kefir, queijo coalho, ricota e sorvete (CHEN *et al.*, 2018; RANADHEERA *et al.*, 2016; CAIS-SOKOLIŃSKA *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2017).

Uma recente pesquisa avaliou as atividades redutora de colesterol e antioxidante em leites caprino e bovino fermentados com probióticos, e estas se apresentaram em maiores níveis nas bebidas de origem caprina, sendo justificado por diferenças estruturais e maior atividade proteolítica na estrutura primária do leite caprino (ZHANG *et al.*, 2015).

A combinação de um ou mais prebióticos com um ou mais probióticos origina um produto simbiótico. Na literatura, existem registros de produção de diversos produtos simbióticos originados a partir do leite de cabra, sendo em sua maioria diversos tipos de queijos e iogurte (KINIK *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2015).

A utilização do leite caprino como matriz para o desenvolvimento de produtos funcionais pode ser ainda muito explorada, visando seu excelente valor nutricional e propriedades funcionais comparativamente superiores ao leite bovino, gerando produtos derivados inovadores e de alto valor agregado.

Referências

BALTHAZAR, C. F.; PIMENTEL, T. C.; FERRÃO, L. L.; ALMADA, C. N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; MOLLAKHALILI, N.; MORTAZAVIAN, A. M.; NASCIMENTO, J. S.; SILVA, M. C.; FREITAS, M. Q.; SANT'ANA, A. S.; GRANATO, D.; CRUZ, A. G. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 16, n. 2, p.247-262, 2017.

BEZERRA, T. K. A.; ARCANJO, N. M. O.; ARAUJO, A. R. R.; QUEIROZ, A. L. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; GOMES, A. M. P.; MADRUGA, M. S. Volatile profile in goat coalho cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 76, p.209-215, 2017.

CAIS-SOKOLIŃSKA, D.; WÓJTOWSKI, J.; PIKUL, J.; LASIK-KURDYŚ, M. Analysis of metabolic activity of lactic acid bacteria and yeast in model kefir made from goat's milk and mixtures of goat's milk with mare's milk based on changes in electrical conductivity and impedance. **Mljekarstvo**, p.277-282, 2017.

CAVICCHIOLI, V. Q.; SCATAMBURLO, T.M.; YAMAZI, A. K.; PIERI, F. A.; NERO, L. A. Occurrence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and enterotoxigenic *Staphylococcus* in goat milk from small and medium-sized farms located in Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p.8386-8390, 2015.

CHAMPAGNE, C. P.; CRUZ, A. G.; DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p.160-166, 2018.

CHEN, L.; ZHANG, Q.; JI, Z.; SHU, G.; CHEN, H. Production and fermentation characteristics of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides of goat milk fermented by a novel wild *Lactobacillus plantarum* 69. **Lwt**, v. 91, p.532-540, 2018.

CORDEIRO, P. R. C.; CORDEIRO, A. G. P. C. Agronegócio do leite de cabra no Brasil e no exterior. **Simpósio internacional de bovinocultura leiteira**, Viçosa, MG, UFV, p. 1-1, 2011.

COSTA, M. P.; FRASAO, B. S.; SILVA, A. C.; FREITAS, R. Q.; FRANCO, R. M.; CONTE-JUNIOR, C. A. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. **Journal Of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p.5995-6003, 2015.

ELWOOD, P. C.; PICKERING, J. E.; GIVENS, D. I.; GALLACHER, J. E. The Consumption of Milk and Dairy Foods and the Incidence of Vascular Disease and Diabetes: An Overview of the Evidence. **Lipids**, v. 45, n. 10, p.925-939, 2010.

HODGKINSON, A. J.; WALLACE, O. A. M.; BOGGS, I.; BROADHURST, M.; PROSSER, C. G. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. **Food Chemistry**, v. 245, p.275-281, 2017.

KINIK, O., KESENKAS, H., ERGONUL, P. G., AKAN, E., KINIK, Ö., KESENKAŞ, H., AKAN, E. The effect of using pro and prebiotics on the aromatic compounds, textural and sensorial properties of synbiotic goat cheese. **Mljekarstvo**, v. 67, p. 71–85, 2017.

LIMA, I. S. S.; GARCEZ, B. S.; ALVES, A. A.; AQUINO, F. C.; BORGES, L. S.; CARVALHO, W. F. Fat protected and profile of fatty acids goat milk: a review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 4, p.830-840, 2016.

MACHADO, T. D. A. G.; OLIVEIRA M. E. G.; CAMPOS, M. I. F.; ASSIS, P. O. A.; SOUZA, E. L.; MADRUGA, M. S.; PACHECO, M. T. B.; PINTADO, M. M. E.;

OLIVEIRA, D. I.; WILBEY, R. A.; GRANDISON, A. S.; DUARTE, L. C.; ROSEIRO, L. B. Separation of oligosaccharides from caprine milk whey, prior to prebiotic evaluation. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p.102-106, 2012.

PARK, Y. W.; JUARÉZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p.88-113, 2007.

QUEIROGA, R. C. R. E. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Lwt**, v. 80, p.221-229, 2017.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M.; BAINES, S. K. Co-culturing of probiotics influences the microbial and physico-chemical properties but not sensory quality of fermented dairy drink made from goats' milk. **Small Ruminant Research**, v. 136, p.104-108, 2016.

TAYLOR, M. W.; MACGIBBON, A. K. H. Milk Lipids: General Characteristics. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p.649-654, 2011.

VERRUCK, S.; DANTAS, A.; PRUDENCIO, E. S. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p.243-257, 2019.

ZHANG, W. Q., GE, W. P., YANG, J., XUE, X. C., WU, S. Z., CHEN, Y., & QIN, L. H. Comparative of in vitro antioxidant and cholesterol-lowering activities of fermented goat & cow milk. **Resources Environment and Engineering**, p. 417–424, 2015.

ANEXO 5

RESUMO DE TRABALHO ENVIADO PARA APRESENTAÇÃO AO IV CONGRESSO NACIONAL DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO (CONAN – MAIO/2019).

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *ACINETOBACTER* SP. ISOLADOS DE LEITE CAPRINO CRU

Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos, Brendon Chaves Araújo, Carlos Henrique da Silva Cruz,
Janaína dos Santos Nascimento.
janaina.nascimento@ifrj.edu.br

Resumo: O leite de cabra vem se revelando uma opção ao leite de origem bovina, por questões de menor alergenicidade (menor fração de α -s1 caseína) e melhor digestibilidade (glóbulos de gordura menores e maior presença de ácidos graxos de cadeia média e curta). O leite de diversos mamíferos em geral, tem um alto valor nutritivo e por isso tende a ser um meio de cultura excelente para microorganismos deteriorantes e patogênicos e apresenta grande variedade de bactérias Gram-negativas. O gênero *Acinetobacter* é associado à alta taxa de mortalidade em infecções hospitalares e à expressão de multirresistência, e, embora ainda pouco relatado em alimentos, algumas de suas espécies são boas competidoras na microbiota de matrizes alimentares, devido à vários fatores como capacidade de formação de biofilme e sobrevivência por longos períodos em superfícies. Neste trabalho, objetivou-se a detecção e a caracterização de espécies do gênero *Acinetobacter* em 21 amostras de leite de cabra cru comercializados informalmente em diversas cidades do Estado do Rio de Janeiro. A obtenção dos isolados foi realizada através de plaqueamento das amostras em Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG), que foram, posteriormente, identificados por meio de espectrometria de massas (ionização e dessorção à laser assistida por matriz – MALDI-TOF). A caracterização se deu por meio da avaliação de atividades lipolítica (Ágar leite), proteolítica (Ágar *Spirit Blue* modificado), hemolítica (Ágar sangue) e produtora de biofilme (Ágar vermelho congo). Ainda, realizou-se teste de susceptibilidade a antimicrobianos por meio do teste de difusão em disco, e verificou-se a ocorrência de fenótipos produtores de enzimas degradadoras de antibióticos, ESBL e KPC, por inoculação em meios de cultura cromogênicos. Dentre a população microbiana do leite de cabra cru, majoritariamente composta por *Pseudomonas* sp. e membros da família *Enterobacteriaceae*, foram obtidos 10 isolados de *Acinetobacter* sp., sendo identificadas as espécies *A. guillaouiae* (6), *A. ursingii* (3) e *A. bereziniae* (1). Estes isolados foram provenientes exclusivamente de 4 amostras. Nenhum isolado mostrou-se produtor de biofilme, enquanto 1 (10%) apresentou atividade hemolítica e 6 (60%) apresentaram atividades lipolítica e proteolítica. Dois isolados, *A. ursingii* e *A. guillaouiae*, apresentaram resistência a apenas um antimicrobiano (imipinem e piperaciclina + tazobactam, respectivamente). Um isolado de *A. guillaouiae* apresentou resistência a dois antibióticos de classes diferentes, os mesmos citados anteriormente. Os dez isolados se apresentaram como fenótipos produtores de ESBL, enquanto oito como produtores de KPC. Estes resultados apontam como o gênero em questão exerce importante papel também na área de alimentos, especialmente em lácteos, além de exibir a gravidade do problema de comércio informal de leite cru.

Palavras-chave: leite caprino cru; *Acinetobacter*; qualidade; resistência

ANEXO 6

RESUMO DE ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA *SMALL RUMINANT RESEARCH*

Pseudomonas sp. in uninspected raw goat milk in Rio de Janeiro, Brazil

Gustavo Luis de Paiva Anciens Ramos^{1,2} and Janaína dos Santos Nascimento^{1*}

¹ Laboratório de Microbiologia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brazil. CEP 20270-021

² Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Brazil. CEP: 24241-000

* corresponding author: janaina.nascimento@ifrj.edu.br

Abstract

Although quite controversial from the point of view of food safety, a considerable number of people of different ages and incomes consume raw goat milk. Even refrigerated after milking, raw goat's milk may still be susceptible to the action of psychrotrophic microorganisms. *Pseudomonas* species are common psychrotrophic spoilage bacteria associated to raw or pasteurized milk, and are able to secrete thermostable enzymes, such as protease and lipase. In the study, *Pseudomonas* sp. from 21 refrigerated raw goat milk samples freely commercialized without any type of inspection, by small producers and markets from different geographic regions of State of Rio de Janeiro, Brazil, were characterized for production of these enzymes and for other relevant factors, as antimicrobial resistance profile, hemolytic activity and qualitative biofilm production. A total of 136 isolates were identified, most of them belonging to species *P. putida*, *P. koreensis*, *P. monteilii* and *P. fluorescens*. Twenty-one isolates presented only proteolytic activity, 21 presented only lipolytic activity, being that 17 isolates expressed both phenotypes. It was detected that 91.4% of *Pseudomonas* isolates were susceptible to all the antibiotic tested,

9.6% were resistant and none exhibited a MDR phenotype. None of the raw goat milk samples presented antibiotic residues detectable by the technique used, which may justify the very low frequency of resistant bacteria. Although *Pseudomonas* is not considered a typical food-related pathogen, its presence and its associated virulence factors indicate that regulatory measures including the determination of microbiological standards for raw goat's milk and greater control of the commercialization of this product are necessary.

Keywords: Refrigerated raw goat milk, *Pseudomonas* spp., antibiotic susceptibility, proteolytic and lipolytic activity, biofilm production, antibiotic resistance.

ANEXO 7

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO À REVISTA *SMALL RUMINANT RESEARCH*

De: "RUMIN" <oesserver@eesmail.elsevier.com>
 Enviado: 2019/01/29 21:17:40
 Para: jessaina.nascimento@fjf.edu.br
 Assunto: Thank you for your submission to Small Ruminant Research

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Nascimento,

Thank you for sending your manuscript *Pseudomonas* sp. in uninspected raw goat's milk in Rio de Janeiro, Brazil for consideration to Small Ruminant Research. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for Small Ruminant Research to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can viewed here: http://journalinsights.elsevier.com/journals/0921-4488/review_speed

SMALL RUMINANT RESEARCH

[Home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) | [Contact Us](#) | [Help](#) | [Alert to Editor: CrossCheck temporarily not fully available ...](#)

User name: [pubsubserver@fjfmail.com](#)
 Switch To: [Go home](#) | [Go to: 10.1016/j.srr.2019.01.001](#)

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Admin Link		Pseudomonas sp. in uninspected raw goat's milk in Rio de Janeiro, Brazil	29 Jan 2019	30 Jan 2019	Submitted to Journal

Display: 10 | [icaute acc. ooga:](#)

Version: 2019.1