

Qualidade microbiológica e detecção de resíduos de antibióticos em leite cru refrigerado



ISBN 978-85-8263-500-1

dezembro/2019

Programa de Pós-Graduação em Agroecologia
Instituto Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre

BOLETIM TÉCNICO Nº 2

Qualidade microbiológica e detecção de resíduos de antibióticos em leite cru refrigerado

Alessandra de Fatima Ulisses
Maria da Penha Piccolo
Otacílio José Passos Rangel
Maria Isabel Suhet
Italo Ulisses Daros
Paola Alfonsa Vieira Lo Monaco

Ifes-Campus de Alegre
Alegre, ES
2019

Exemplares digitais deste boletim técnico podem ser obtidos em:
Programa de Pós-Graduação em Agroecologia (PPGA)
Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre
Rodovia ES 482, km 47, Cx. Postal-47, Distrito de Rive, Alegre-ES
Telefone: (28) 3564-1808
www.ppga.alegre.ifes.edu.br

Capa
Os autores

Comissão de Editoração do PPGA:

Otacílio José Passos Rangel, Danielle Inácio Alves, Jeane de Almeida Alves, Jéferson Luiz Ferrari, Monique Moreira Moulin, Pedro Pierro Mendonça

Editoração Eletrônica
Os autores

Revisão de texto	Normalização bibliográfica
<i>Paola A. V. Lo Monaco, Maria da Penha Piccolo, Aparecida de F. Madella de Oliveira e Otacílio J. P. Rangel</i>	<i>Jeane de Almeida Alves</i>

Contato
e-mail: ppga.alegre@ifes.edu.br Tel.: (28) 3564-1808

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Monsenhor José Bellotti – Ifes campus de Alegre

- Q1 Qualidade microbiológica e detecção de resíduos de antibióticos em leite cru refrigerado [recurso eletrônico] / Alessandra de Fátima Ulisses ... [et. al.] -- Alegre: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, 2019.
24 f. il.
Inclui bibliografias.
ISBN: 978-85-8263-500-1
Publicação digitalizada
Formato PDF
1. Microbiologia – Leite. 2. Bactérias estafilocócicas. 3. Agricultura familiar – Alegre (ES). I. Ulisses, Alessandra de Fátima. II. Piccolo, Maria da Penha. III. Rangel, Otacílio José Passos. IV. Suhet, Maria Isabel. V. Daros, Italo Ulisses. VI. Lo Marco, Paola Alfonsa Vieira. VII. Título.

CDD: 576

@2019 Instituto Federal do Espírito Santo
Todos os direitos reservados.
É permitida a reprodução parcial desta obra, desde que citada a fonte.
O conteúdo dos textos é de inteira responsabilidade do autor.

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Coleta das amostras de leite cru refrigerado.....	9
Contagem bacteriana total (CBT) ou contagem de bactérias mesófilas.....	9
Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
Determinação de resíduos de antibióticos.....	11
Análise dos dados.....	12
Resultados e Discussão.....	12
Análises das informações adquiridas no momento da coleta do leite cru refrigerado.....	12
Contagem de bactérias aeróbias mesófilas e <i>Staphylococcus aureus</i> em leite cru refrigerado.....	16
Resíduos de antibióticos.....	19
Conclusões.....	20
Agradecimentos.....	20
Referências.....	20

Qualidade microbiológica e detecção de resíduos de antibióticos em leite cru refrigerado

Alessandra de Fatima Ulisses¹
Maria da Penha Piccolo²
Otacílio José Passos Range³
Maria Isabel Suhet³
Italo Ulisses Daros⁴
Paola Alfonsa Vieira Lo Monaco⁵

Resumo - A atividade leiteira na região sul do estado do Espírito Santo é desenvolvida, em sua grande maioria, por agricultores de base familiar. Tal atividade contribui para a sustentabilidade econômica e social da maioria da população rural ativa, por meio de geração de renda e empregos. Objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica e a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru refrigerado coletadas em nove tanques de refrigeração individuais e coletivos localizados em propriedades rurais pertencentes ao município de Alegre, ES. Realizou-se a contagem de bactérias aeróbias mesófilas ou contagem bacteriana total; de *Staphylococcus aureus* além da detecção de resíduos de antibióticos. Para os valores de contagem bacteriana total, concluiu-se que 44,44% das amostras encontravam-se em conformidade com a legislação vigente. Os valores de *S. aureus* ficaram entre $<10^2$ a $3,6 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e estes resultados não podem ser negligenciados devido a possibilidade de formação de toxinas termorresistentes, além deste microrganismo ser causador de mastite. Em todas as amostras de leite cru refrigerado não foram constatados resíduos de antibióticos. Concluiu-se que 55,55% das amostras de leite cru analisadas apresentam não conformidade em relação aos parâmetros contidos na Instrução Normativa 76/2018 do MAPA. Os resultados indicam a necessidade de mudanças nas práticas de manejo e produção do leite cru, com a adoção de boas práticas higiênico-sanitárias afim de obter leite com qualidade e inocuidade.

Termos para indexação: agricultura familiar, microbiologia do leite, *Staphylococcus aureus*.

¹MSc. pelo Programa de Pós-Graduação em Agroecologia do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre, Caixa Postal 47, CEP: 29500-000, Alegre-ES. E-mail: afulisses@ifes.edu.br

²DSc. Professora da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Campus de Alegre, Caixa Postal 16, CEP: 29500-000, Alegre-ES. Chefe do Departamento de Engenharia de Alimentos. E-mail: penhpiccolo@gmail.com

³DSc. Professor do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre, Caixa Postal 47, CEP: 29500-000, Alegre-ES. E-mail: otaciliorangel@gmail.com; misuhet@ifes.edu.br

⁴Discente do curso técnico em Agropecuária do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre, Caixa Postal 47, CEP: 29500-000, Alegre-ES. E-mail: italo.u.daros@gmail.com

⁵ DSc. Professora do Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Santa Tereza –ES. E-mail: paolalm@ifes.edu.br

Microbiological quality and detection of antibiotic residues in refrigerated raw milk

Abstract – Dairy activity in the southern region of the state of Espírito Santo is mostly developed by family farmers. Such activity contributes to the economic and social sustainability of the majority of the active rural population through income generation and employment. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality and the presence of antibiotic residues in samples of refrigerated raw milk collected in nine individual and collective refrigeration tanks located in rural properties in the city of Alegre, ES. Mesophilic aerobic bacteria count or total bacterial counts were performed; *Staphylococcus aureus* as well as the detection of antibiotic residues. For the total bacterial count values, it was concluded that 44.44% of the samples were in compliance with current legislation. *S. aureus* values ranged from $<10^2$ to 3.6×10^6 CFU mL⁻¹ and these results cannot be neglected due to the possibility of heat-resistant toxin formation, in addition to the fact that this microorganism causes mastitis. In all samples of chilled raw milk, no antibiotic residues were found. It was concluded that 55.55% of the raw milk samples analyzed presented nonconformity in relation to the parameters contained in the MAPA Normative Instruction 76/2018. The results indicate the need for changes in the handling and production practices of raw milk, with the adoption of good hygienic-sanitary practices in order to obtain quality and safe milk.

Index terms: family farming, milk microbiology, *Staphylococcus aureus*.

Introdução

No Brasil, o leite está entre os seis produtos mais importantes da agropecuária, sendo essencial no suprimento de alimentos, na geração de emprego e renda de agricultores familiares, contribuindo com a diminuição do êxodo rural (EMBRAPA, 2018). Vilela et al. (2017) relatam que a atividade leiteira do Brasil tem apresentado uma nova dinâmica no setor, motivado pelo crescimento da produção nos últimos anos, decorrentes do aumento do rebanho e, principalmente, pelo aumento na produtividade.

Segundo o Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER (2015), o espaço rural no Espírito Santo constitui-se essencialmente de agricultores familiares, tendo o leite e seus derivados como os principais produtos, correspondendo a 72,7% do total de alimentos de origem animal. Almeida Júnior et al. (2012) afirmaram que a atividade leiteira no Espírito Santo, em sua maioria, é proveniente de pequenas propriedades de base familiar, localizadas em regiões com topografia de medianamente ondulada a acidentada, a exceção da região litorânea, onde o relevo apresenta-se de plano a suave ondulado. Os mesmos autores afirmaram ainda que a produção de leite se destaca por proporcionar renda mensal durante todo o ano para os produtores, favorecendo a permanência das famílias no meio rural. O leite, a carne e os seus derivados produzidos no Estado são, majoritariamente, destinados ao abastecimento do mercado consumidor interno e envolvem, juntos, cerca de 32 mil produtores, sendo 18 mil de leite (INCAPER, 2015).

Com o crescimento da cadeia leiteira surge também a preocupação em garantir a segurança dos alimentos e dos seus consumidores. Com isso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) vem elaborando programas e Instruções Normativas (INs) com o objetivo de estabelecer medidas e padrões que visam garantir a qualidade do leite cru refrigerado com foco nas boas práticas agropecuárias e na educação sanitária.

O MAPA publicou, em 30 de novembro de 2018, a IN Nº 76, que estabelece os regulamentos técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Juntamente com a IN Nº 76/2018, foi publicada a IN Nº 77, de 26 de novembro de 2018, onde são definidos critérios e procedimentos para a obtenção de leite de qualidade e seguro ao consumidor, envolvendo o acondicionamento, a conservação, o transporte, a seleção e a recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Além disso, foram definidos critérios para obtenção de leite de qualidade e seguro ao consumidor e que englobam desde a organização da propriedade, as instalações e equipamentos, até a formação e capacitação dos responsáveis pelas tarefas cotidianas, o controle sistemático de mastite, da brucelose e da tuberculose (BRASIL, 2018b).

Mesmo com adoção de várias medidas, o leite ainda apresenta problemas de qualidade, tornando-se veículo carreador de microrganismos deterioradores e patogênicos, adquiridos nas diversas etapas de sua obtenção, da propriedade rural até o beneficiamento na indústria. A qualidade do leite é influenciada pelo estado sanitário do rebanho, manejo dos animais e dos equipamentos durante a ordenha, especialmente no tocante à higienização dos utensílios e equipamentos, do local de ordenha e do manipulador, da temperatura e do tempo que o leite permanece nos tanques de refrigeração até o beneficiamento (MONTEIRO et al., 2011; BOZO, et al., 2013; RAMOS et al., 2014; MENEZES et al., 2015; PINTO et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016; NETA et al., 2016; NETA, et al., 2018; PÍCCOLO et al., 2018), entre outros. A qualidade do leite no seu sentido mais amplo está relacionada ao aspecto higiênico de sua obtenção, manipulação e as suas características físico-químicas e microbiológicas (MACHADO et al., 2002).

Os principais parâmetros utilizados para verificar a qualidade do leite cru refrigerado e sua integridade são o seu perfil microbiológico, físico-químico e resíduos indesejáveis, como os de antibióticos e fraudulentos, sendo esta qualquer prática que adicione ou subtraia substâncias ao leite. Esse conjunto de parâmetros são considerados indicadores de qualidade do leite cru refrigerado (BRASIL, 2018a).

O uso de antibióticos no tratamento da mastite em vacas leiteiras e a utilização de drogas na alimentação animal, como suplemento de dietas, têm contribuído para a presença de resíduos de antimicrobianos no leite (TOALDO et al., 2012). Isso pode apresentar sérias consequências toxicológicas e técnicas, pela possibilidade dos antibióticos causarem reações alérgicas aos consumidores e provocarem o surgimento de resistência bacteriana (ÁVILA; RIGOBELLO; MALUTA, 2011), além de ser também um problema econômico e interferir na atuação das culturas lácticas utilizadas nos processos tecnológicos de fabricação dos produtos lácteos como queijos, iogurtes e outros produtos (BRITO & LARGE, 2005; NUNES & D'ANGELINO, 2007).

Considerando a importância social e econômica da pecuária leiteira para o desenvolvimento da agricultura de base familiar do estado do Espírito Santo, bem como as novas exigências da IN Nº 76, de 26 de novembro de 2018 do MAPA, torna-se de suma importância o diagnóstico da contagem de bactérias aeróbias mesófilas ou contagem bacteriana total (CBT); a contagem de *Staphylococcus aureus* além da verificação de resíduo de antibiótico, como subsídios para programas que visem às adequações necessária ao pleno desenvolvimento e à sustentabilidade da atividade leiteira no estado do Espírito Santo.

Material e Métodos

Coleta das amostras de leite cru refrigerado

As amostras de leite cru foram coletadas em 9 tanques de refrigeração, sendo 4 individuais e 5 coletivos, localizados em propriedades rurais do município de Alegre, ES. Foi coletada uma amostra de leite cru em cada tanque de refrigeração. As amostras foram acondicionadas em frascos esterilizados e transportados em caixas isotérmicas com gelo. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes) - Campus de Alegre, ES, no período de março a julho de 2018. A logística do transporte até as propriedades rurais para a coleta das amostras de leite cru foi efetuada com o apoio da Secretária de Agricultura e Meio Ambiente da Prefeitura Municipal de Alegre.

Contagem bacteriana total (CBT) ou contagem de bactérias mesófilas

Com as amostras previamente homogêneas, foram realizadas diluições seriadas (Figura 1), sendo retirado 1 mL de cada amostra e adicionada em frasco contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Deste frasco foi retirado 1 mL para outro com 9 mL de água peptonada, obtendo a diluição 10^{-2} , e assim, sucessivamente, para os demais tubos, até a diluição 10^{-6} para realização das análises microbiológicas.

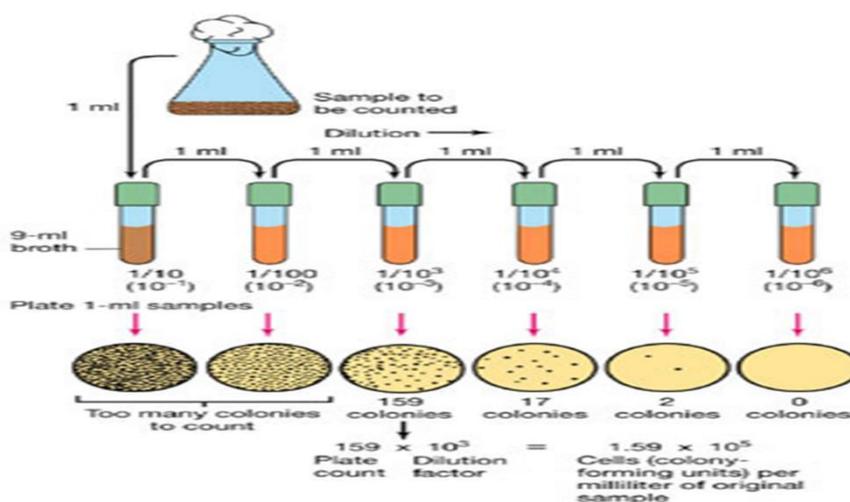


Figura 1 - Contagem de células viáveis e diluição seriada

Fonte: Adaptado de Madigan et al (2003).

Foram realizadas análises de contagem bacteriana total (CBT) por meio das diluições sucessivas em placas de Petri e utilização do Agar Plate Count (PCA) (plaqueamento pour-plate), sendo adicionado em duplicata 1 mL de cada diluição nas placas. As placas foram

incubadas a 35°C por 24 a 48 horas (Figura 2). Foi realizada a contagem e os resultados foram expressos em UFC mL⁻¹, de acordo com metodologia descrita pela American Public Health Association – APHA (2001).

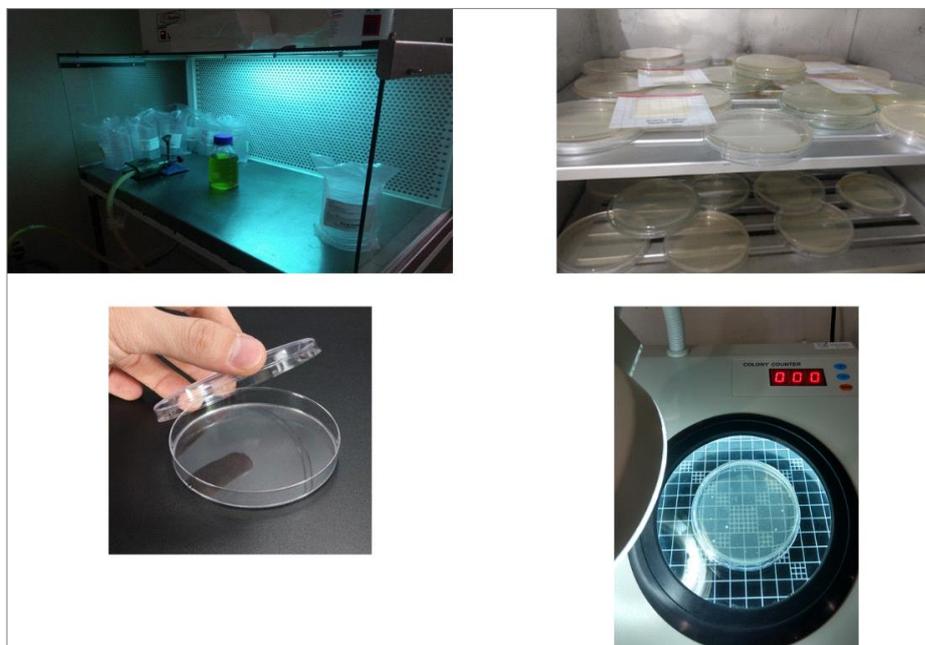


Figura 2 - Contagem de CBT, imagem ilustrativa.

Fonte: Os autores.

Contagem de *Staphylococcus aureus*

Foram realizadas contagem de *Staphylococcus aureus* por meio da utilização de kit rápido Rida®Count Staph (Figura 3). Utilizou-se lâminas de cultivo prontas com adição 1 mL das diluições selecionadas para cada placa contendo o meio de cultura e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 a 48 horas. A seguir realizou-se a contagem das colônias, cujos resultados foram expressos em UFC mL⁻¹, de acordo com metodologia descrita pelo fabricante.



Figura 3 - Contagem de *Staphylococcus aureus*

Fonte: Os autores.

Determinação de resíduos de antibióticos

Utilizou-se o teste Twinsensor^{BT} em todas as amostras. Consiste em um teste imunoenzimático baseado em receptores no formato de tira reativa para detecção rápida e simultânea de antibióticos dos grupos β -lactâmicos e tetraciclinas em amostras de leite. As amostras com concentração de antibiótico superior ao limite de detecção do teste são consideradas como resultado positivo. Adicionou-se 200 μ l de leite no microtubo e misturou-se até obter uma amostra homogênea, seguido de incubação por 3 minutos a 40°C, sendo em seguida submergida a tira reativa por 3 minutos a 40°C para visualização e comparação com as referenciais do manual, de acordo com metodologia descrita pelo fabricante (CAPLAB, 2018) (Figura 4).

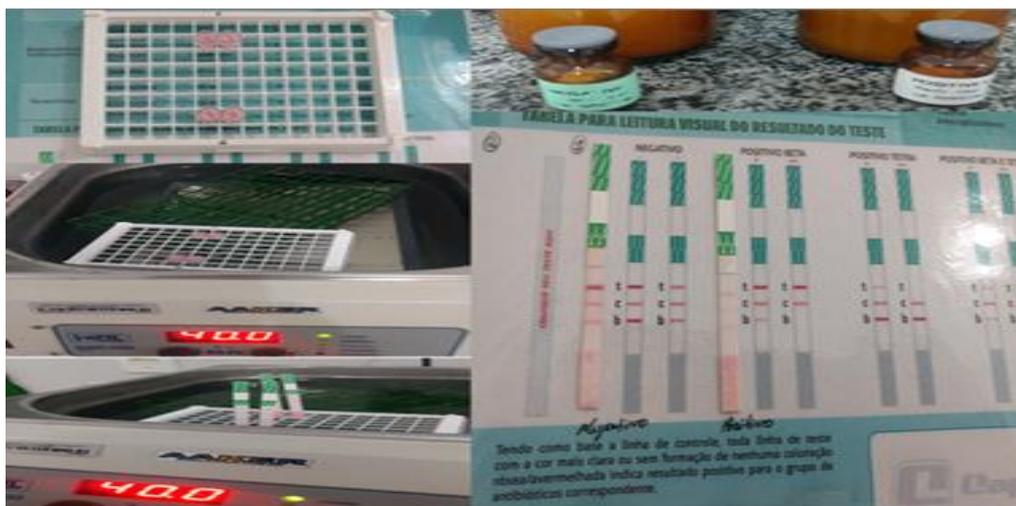


Figura 4 - Teste de antibiótico.

Fonte: Os autores.

Análise dos dados

Os resultados das análises microbiológicas foram apresentados em quadros com as respectivas médias e desvios padrões de cada variável estudada. Os resultados foram comparados aos valores limites estabelecidos pela Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018, do MAPA (BRASIL, 2018a).

Resultados e Discussão

Análises das informações adquiridas no momento da coleta do leite cru refrigerado

A caracterização e informações adquiridas junto aos responsáveis dos tanques de refrigeração no momento das coletas das amostras de leite cru encontram-se na Tabela 1.

Observou-se que 4 (44%) tanques de refrigeração são de uso individual e 5 (56%) de uso coletivo, com no máximo três produtores/tanque coletivo.

Tabela 1- Caracterização e informações obtidas nos locais dos tanques de refrigeração no município de Alegre - ES, comparadas com as boas práticas agropecuárias estabelecidas pela IN77/2018 do MAPA

Padrão IN 77/2018	Tanque de refrigeração individual ou de uso comunitário. Ordenha manual ou mecânica. Temperatura máxima de 4,0°C (quatro graus), em até três horas. Teste do Alizarol na concentração mínima de 72% v/v (setenta e dois por cento volume/volume) diariamente. Água de qualidade (tratada). Limpeza e sanitização com produtos específicos.	
TANQUE DE REFRIGERAÇÃO	Conformidade	Não conformidade
A₁	Coletivo (03 produtores). Ordenha Manual. Água tratada.	Temperatura no momento da coleta 9,3°C. Não realiza o teste do Alizarol. Limpeza do tanque com detergente neutro.
A₂	Individual, Ordenha Mecânica	Temperatura na coleta 4,6°C. Não realiza o teste do Alizarol. Água utilizada não tratada (nascente). Limpeza com detergente neutro
A₃	Individual. Ordenha mecânica Temperatura na coleta 2,0°C	Não realiza o teste do Alizarol. Água utilizada não tratada (nascente). Limpeza com detergente neutro.
A₄	Coletivo (02 produtores). Ordenha Manual	Temperatura na coleta 8,3°C. Não realiza o teste do Alizarol. Água não tratada (nascente). Limpeza com detergente neutro.
A₅	Coletivo (02 produtores). Ordenha Mecânica. Temperatura na coleta 4,0°C	Não realiza o teste do Alizarol. Água não tratada (poço). Limpeza com detergente neutro.
A₆	Individual, Ordenha Mecânica. Água tratada. Temperatura na coleta 4,0°C. Realiza o teste do Alizarol. Limpeza com detergente específicos e sanitização com solução clorada.	
A₇	Individual, Ordenha Mecânica. Temperatura na coleta 4,0°C. Realiza o teste do Alizarol. Água tratada.	Limpeza com detergente neutro.
A₈	Coletivo (03 produtores). Ordenha Manual. Temperatura na coleta 3,8°C. Água tratada. Sanitização com Solução clorada	Não realiza o teste do Alizarol Limpeza com detergente neutro
A₉	Coletivo (02 produtores). Ordenha Manual	Temperatura na coleta 5,5°C. Não realiza o teste do Alizarol. Água não tratada (poço). Limpeza com detergente neutro

Os dados desta pesquisa, em relação aos valores de temperatura do leite nos tanques de refrigeração (Tabela 1), mostram que 44,44% das amostras apresentaram valores acima do permitido no momento da coleta. Constatou-se que haviam tanques desligados, como verificado na amostra A₁, no horário da ordenha. Segundo a IN 76/2018 (BRASIL, 2018a), a temperatura máxima de conservação do leite cru refrigerado em tanques de refrigeração individual e comunitário deve ser de 4°C. O leite cru deve ser mantido refrigerado até seu transporte para a indústria, onde deverá chegar a 7°C. Ramos et al., (2014) ao pesquisarem os fatores que afetam a qualidade do leite cru refrigerado em quatro comunidades de agricultura familiar na região norte do Espírito Santo, concluíram que as temperaturas dos tanques encontravam-se em desacordo com a legislação vigente da época, influenciando a má qualidade do leite cru refrigerado. Os autores concluíram que embora a refrigeração do leite logo após a ordenha seja uma medida obrigatória, isto não garante a qualidade do produto, reforçando a importância das condições higiênico-sanitárias na ordenha e manuseio para reduzir a possibilidade de contaminação inicial.

Nesta pesquisa, com relação ao tipo de ordenha realizada, 5 (56%) amostras coletadas nos tanques de refrigeração eram obtidas por ordenha manual e 4 (44%) por ordenha mecânica. Para Vallin et al., (2009) a adoção de boas práticas de higiene empregadas na ordenha contribuem significativamente para a melhoria da qualidade do leite em quaisquer das condições de tecnificação, seja na ordenha manual ou mecânica. Os autores constataram que a média da CBT encontrada em propriedades com a utilização de ordenha mecânica foi em torno de três vezes maior do que a média encontrada em propriedades com ordenha manual, antes e após as práticas, indicando que o nível tecnológico da ordenha não implica, necessariamente, em leite de melhor qualidade e, dependendo de como é utilizada, a ordenha mecânica pode contribuir em mais fontes de contaminação.

Em pesquisa realizada por Neta et al., (2015), ao visitarem propriedades rurais do município de Alegre - ES, constatou-se que 97% dos produtores realizavam ordenha manual e 3% ordenha mecânica. Ramos et al., (2014) avaliaram 28 propriedades familiares do município de São Mateus, região norte do estado do Espírito Santo, onde constataram que 100% das propriedades rurais realizavam a ordenha manual.

Neta et al., (2018) avaliaram as conformidades e não conformidades em relação aos locais e às práticas adotadas pelos trabalhadores responsáveis pela recepção e manutenção de leite cru refrigerado em tanques coletivos pertencentes a algumas propriedades rurais e concluíram que as condições das instalações dos locais onde estavam os tanques e a higienização por parte dos responsáveis pela recepção do leite, além de diferenças de temperaturas registradas, foram os itens mais críticos e que mais requeriam melhorias a fim de se adequarem à legislação.

Em relação à realização do teste de alizarol antes do acondicionamento do leite nos tanques de refrigeração, 78% dos usuários dos tanques de refrigeração avaliados na presente pesquisa não o realizavam, tanto em tanques coletivos ou individuais. Segundo a IN 77/2018 (BRASIL, 2018b), o tanque coletivo deve ter um responsável identificado para receber o leite e realizar as atividades de medição ou pesagem, acidez qualitativa por meio do teste de alizarol com concentração mínima de 72ºGL (setenta e dois graus Gay-Lussac) e registro das informações em planilha para cada latão de leite recebido.

Em relação aos produtos utilizados nos processos de limpeza e sanitização dos tanques de refrigeração, constatou-se que 7 (78%) tanques utilizam detergente neutro adquiridos nos supermercados, não sendo utilizadas soluções cloradas para sanitização para redução da carga microbiana ou qualquer outro detergente específico, como o detergente alcalino que se mostra eficaz na remoção de gordura. Segundo Teixeira et al. (2018) a etapa da sanitização objetiva a redução da carga microbiana aderida na superfície interna do tanque, devendo ser realizada por meio da utilização de soluções sanitizantes, sendo os compostos clorados, como hipoclorito de sódio ou de cálcio e dióxido de cloro estabilizado, os mais utilizados.

Com relação aos dados referentes ao tipo de água utilizada para higienização dos tanques de refrigeração e utensílios, constatou-se que tanto nos procedimentos na área da ordenha quanto na higienização dos equipamentos (como o tanque de refrigeração), em 5 (56%) tanques a origem da água era de nascente ou poço, não tratadas. Conforme Neta et al., (2015) 94% das propriedades rurais visitadas do município de Alegre - ES não realizam nenhum tipo de tratamento da água utilizada nas etapas de obtenção do leite cru, sendo as mesmas oriundas de nascentes, poços e córregos. A disponibilidade e a qualidade da água são extremamente importantes. Nas propriedades rurais não abastecidas com água tratada, deve-se realizar o tratamento da água com solução clorada antes de sua utilização na sala de ordenha e higienização dos equipamentos (TEIXEIRA et al., 2018).

Segundo ALMEIDA (2016), 87% das propriedades município de Cacoal - RO não utilizavam água clorada na higienização dos utensílios e procedimentos de ordenha, assim como 40% nem possuem água encanada na estrutura dos currais. No mesmo trabalho foi relatado que quanto a infraestrutura dos currais, 53% apresentam piso de terra e 20% não apresentam cobertura. Apenas 27% utilizam detergentes específicos na higienização dos utensílios usados na ordenha e somente 12% na higienização dos latões, afirmando os autores que estes fatores resultam em baixa qualidade higiênico-sanitária nos processos de obtenção do leite cru nas propriedades de agricultores familiares do município.

No Brasil, estudos têm mostrado que as principais fontes de contaminação do leite por mesófilos aeróbios são as superfícies dos equipamentos e utensílios de ordenha, a água

residual dos latões e tanques de expansão, além dos tetos mal higienizados (LANGONI, 2000; NETA et al., 2015; NETA et al., 2016; PÍCCOLO et al., 2018; LAMPUGNANI et al., 2018).

Contagem de bactérias aeróbias mesófilas e *Staphylococcus aureus* em leite cru refrigerado

Os resultados referentes aos valores médios para contagem de bactérias aeróbias mesófilas (CBT) e *Staphylococcus aureus* em amostras de leite cru coletadas em 9 tanques de refrigeração, localizados em pequenas propriedades pertencentes ao município de Alegre - ES, estão apresentados na Tabela 2.

No decorrer de alguns anos no Brasil, por meio do MAPA, estabeleceu-se critérios de padronização do leite bovino produzido e oferecido para consumo no país por meio de Portarias como a IN/51 de 2002, IN/62 de 2011, IN/07, IN/31 de 2018 e a IN 76 de 2018 (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011; BRASIL, 2016; BRASIL, 2018a; BRASIL, 2018b).

Na realização do presente estudo, os valores máximos permitidos para CBT para o leite cru refrigerado é de 300.000 UFC mL⁻¹, de acordo com a atual IN Nº 76/2018, publicada em 30 de novembro de 2018. De acordo com a Tabela 2, observar-se que as amostras codificadas como A₁, A₂, A₃, A₄ e A₅ (55,55% das amostras coletadas) ficaram acima do padrão permitido para CBT, estando em desacordo com a legislação vigente. As amostras A₂ e A₃ eram armazenadas em tanque individual, com ordenha mecânica, utilizando-se água não tratada em várias etapas, além da higienização dos tanques realizada somente com detergentes neutros não específicos, de acordo com informações obtidas no dia da coleta das amostras. O número elevado de microrganismos encontrado nas amostras de leite cru contribui para a qualidade microbiológica inadequada do leite. Entre os fatores determinantes desses resultados destacam-se: a) negligências em relação à higiene no momento da ordenha; b) armazenamento nos tanques de refrigeração em temperaturas inadequadas e; c) acondicionamento em latões.

Tabela 2 - Valores médios e desvios padrões para contagem de bactérias aeróbias mesófilas (CBT), *Staphylococcus aureus* (Staphy) e detecção de resíduo de antibiótico em amostras de leite cru coletadas em nove tanques de refrigeração pertencentes ao município de Alegre - ES

Amostras de leite coletadas em tanques de refrigeração	Bactérias aeróbias mesófilas (CBT) (UFC mL ⁻¹)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Staphy) (UFC mL ⁻¹)	Resíduo de antibiótico
A ₁	3,9x10 ⁵ ± 2,83*	6,0x10 ³ ± 0,00	Ausente
A ₂	5,2x10 ⁶ ± 7,07*	1,2x10 ⁶ ± 0,00	Ausente
A ₃	1,1x10 ⁶ ± 7,07*	6,0x10 ⁴ ± 0,00	Ausente
A ₄	3,0x10 ⁷ ± 0,00*	3,6x10 ⁶ ± 0,00	Ausente
A ₅	1,3x10 ⁷ ± 2,83*	1,0x10 ⁵ ± 0,00	Ausente
A ₆	2,0x10 ⁴ ± 1,41	<10 ² ± 0,00	Ausente
A ₇	6,6x10 ⁴ ± 2,83	1,2x10 ³ ± 0,00	Ausente
A ₈	3,0x10 ⁵ ± 1,41	6,3x10 ³ ± 0,00	Ausente
A ₉	7,0x10 ⁴ ± 1,41	7,3x10 ³ ± 0,00	Ausente

Fonte: Os autores.

* Não conformidades de acordo com a Instrução Normativa Nº 76/2018 (BRASIL, 2018a).

Para a contagem de bactérias mesófilas aeróbias em leite cru refrigerado, verificou-se que 5 amostras (55,55% das amostras coletadas) apresentaram uma contagem total acima de 300.000 UFC mL⁻¹. Nestas amostras necessita-se de uma maior atenção e preocupação com as práticas de manejo empregadas, uma vez que torna-se mais difícil e trabalhoso diminuir essa carga microbiana. Na amostra A₁ constatou-se uma CTB de 390.000 UFC mL⁻¹, estando também em desacordo com a IN Nº 76/ 2018. Nesse caso, porém, é possível com menos ações diminuir a carga microbiana. As amostras que apresentaram CBT inferior a 100.000 UFC mL⁻¹ foram as A₆ e A₇ (tanques individuais) e as A₈ e A₉ (tanques coletivos). Assim, apenas 44% das amostras coletadas e analisadas estavam em conformidade com a IN 76/2018 do MAPA.

Em trabalho realizado por Neta et al. (2016), os dados vêm a corroborar com os encontrados neste trabalho. Ao avaliarem amostras de leite cru refrigerado coletadas em tanques no município de Alegre - ES, os autores constataram contagens superiores ao limite de 6,0x10⁵ UFC mL⁻¹ estabelecido pelo MAPA na época (BRASIL, 2011). Os autores concluíram que a altas contagens de bactérias mesófilas encontradas nas amostras de leite eram provenientes de falhas observadas nos procedimentos empregados na higienização; das condições inapropriadas de produção e, dos locais de instalação dos tanques de refrigeração. Além disso, todos os tanques de refrigeração eram do tipo coletivo e, neste caso, verificou-se maior risco de contaminação, considerando a mistura de leite proveniente de diversas propriedades rurais e com diferentes manejos.

Bozo et al. (2013) ao avaliarem a qualidade do leite cru refrigerado obtido de cinco propriedades leiteiras no estado do Paraná obtiveram valores médios de CBT de $1,36 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Os autores verificaram que após a implantação de boas práticas de ordenha, adoção de recomendações quanto ao tratamento de mastite e a manutenção e higienização dos equipamentos de ordenha houve uma redução média de 93,4% na CBT, com consequente aumento da renda mensal dos produtores.

Segundo França et al. (2015), para as análises de CBT as amostras de leite ordenhadas mecanicamente apresentaram maior contaminação por bactérias ($5.215.000$ UFC mL⁻¹) em comparação com a ordenha manual ($3.948.000$ UFC mL⁻¹), estando em desacordo com a legislação vigente na época, que não diferenciava valores de CBT por tipo de ordenha realizado.

No Brasil, estudos têm mostrado que as principais fontes de contaminação do leite por mesófilos aeróbios são as superfícies dos equipamentos e utensílios de ordenha, a água residual dos latões e tanques de expansão, além dos tetos mal higienizados (BOZO et al., 2015; NETA et al., 2015; NETA et al., 2016; PÍCCOLO et al., 2018; LAMPUGNANI et al., 2018). Outro aspecto importante relacionado a alta contagem bacteriana no leite cru refrigerado é a qualidade da água que é utilizada na propriedade rural, tanto nos procedimentos de ordenha e no que se refere a higienização, pois a má qualidade da água e higienização inadequada podem contribuir como fonte de contaminação, devido a carga bacteriana presente, principalmente de patógenos ambientais, ocasionando, consequentemente, a elevação da CBT (TEIXEIRA et al., 2018).

No âmbito internacional e nacional, os valores de CBT no leite bovino é um critério também utilizado pelas indústrias, produtores e entidades governamentais como indicador da qualidade e da produção higiênica do leite. No município de Alegre, ES são necessários esforços por parte de todos os envolvidos na cadeia produtiva para que possam se adequar às condições de produção, de forma a garantir a inocuidade e qualidade do leite e derivados.

Neste trabalho, os valores encontrados para *S. aureus* ficaram entre $<10^2$ a $3,6 \times 10^6$ (Tabela 1). Os resultados revelam que apenas 22,22% das amostras (A₂ e A₄) apresentaram contagens superiores a 10^5 UFC g⁻¹. De acordo com Santana (2006), o diagnóstico de intoxicação alimentar por estafilococos de uma forma geral é confirmado pela identificação de contagens superiores a 10^5 UFC g⁻¹ de *S. aureus*, a partir de alimentos contaminados com a bactérias ou com sua enterotoxina. A alta contaminação por *Staphylococcus* spp. em leite cru coletado de tanques refrigeradores pode ser uma das causas que explica a frequência de surtos de intoxicação estafilocócica, sugerindo uma ineficiente refrigeração do leite

imediatamente após a ordenha e um elevado número de animais com mastite (LAMAITA et al., 2005; ASSIS et al., 2017).

Em propriedades rurais do estado de Minas Gerais, Lamaita et al. (2005) detectaram *Staphylococcus* spp. com contagens que variaram de $1,0 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ em 100% das 80 amostras de leite cru de tanques de refrigeração, a 4°C, e estocado por 48 horas. *Staphylococcus* spp. foram encontrados por Tebaldi et al. (2008) em 10 das 16 amostras de leite cru de tanques de refrigeração de diferentes comunidades provenientes do município de Boa Esperança-MG. Os autores atribuíram o resultado à manipulação inadequada e más condições higiênico-sanitárias.

Arcuri et al. (2006) salientaram que a presença de bactérias patogênicas no leite cru é uma preocupação de saúde pública, sendo um risco potencial para quem o consome diretamente ou na forma de derivados. Ângelo et al. (2014), ao pesquisarem *Staphylococcus coagulase* positiva em leite cru armazenado em tanques refrigeradores, observaram valores superiores a 10^3 UFC mL⁻¹, sendo que três dos sete tanques apresentaram contagens acima de 10^5 UFC mL⁻¹.

Neta et al. (2016), ao avaliarem amostras de leite cru refrigerado no município de Alegre - ES, encontraram valores de $2,9 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ para *Staphylococcus* spp. Piccolo et al. (2018) analisaram amostras de leite cru coletado em nove tanques de refrigeração também no município de Alegre - ES e constataram contagens médias de $4,83 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ para *Staphylococcus aureus*, além de outros grupos microbianos e altas contagens de células somáticas (acima de 2 milhões) em algumas amostras. Os autores concluíram que apesar de não haver padrão estabelecido para esse microrganismo em leite cru, sabe-se que sua presença está associada a falhas nos procedimentos de higienização e que os valores encontrados comprometem a qualidade do leite cru, além de se tornar veículo carreador de bactérias deletérias, pois este microrganismo é causador de mastite. Constatou-se a necessidade de esforços por parte de todos os envolvidos na cadeia produtiva para que possam se adequar às condições de produção de forma a garantir a inocuidade leite e produtos adequados a população.

Resíduos de antibióticos

Em todas as amostras de leite cru refrigerado não foram constatados resíduos de antibióticos (Tabela 1), pela metodologia adotada no presente trabalho, ou seja, teste Twinsensor BT, baseado em receptores no formato de tira reativa para detecção rápida e simultânea de antibióticos beta-lactâmicos e tetraciclina em amostras de leite.

Conforme o Dürr (2012), o leite sem a presença de resíduos de antimicrobianos indica uma boa prevenção de doenças e um bom controle do descarte de leite contaminado no momento da ordenha. Neta et al. (2016), ao avaliarem amostras de leite cru refrigerado no município de Alegre - ES em relação a presença ou não de antibióticos, constataram ausência de resíduos da classe β -lactâmicos e tetraciclina em todas as amostras, apesar da qualidade microbiológica inadequada do leite cru refrigerado produzido na região. Aguiar et al. (2016) analisaram amostras de leite provenientes de 15 tanques de refrigeração de propriedades rurais no município de Alegre - ES, no período de agosto a dezembro de 2015, utilizando o teste eclipse 50®, e contataram que 26,7% foram positivas e 73,3% negativas.

Conclusões

Valores elevados de CBT e de *S. aureus* encontrados nas amostras de leite cru refrigerado não contribuem para obtenção de um produto com qualidade. É necessária a adoção de programas contínuos em educação higiênico-sanitária, além da implementação das boas práticas agropecuárias junto aos produtores, visando a melhoria da qualidade do leite armazenado nos tanques de refrigeração individuais e coletivos. Tudo isso contribuiria para a sustentabilidade do setor, para o valor agregado dos produtos lácteos e para a saúde da população do município de Alegre, ES.

Agradecimentos

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Espírito Santo - Campus de Alegre, ES.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia (PPGA/Ifes - Campus Alegre) por possibilitar a realização desta pesquisa.

À Prefeitura Municipal de Alegre pela colaboração e apoio logístico nas coletas das amostras de leite cru refrigerado nas propriedades rurais do município.

Referências

AGUIAR, G. S.; ULISSES, A. F.; GOMES, L. R.; ROCHA, L. I. R.; SUHET, M. I. Avaliação da presença de antibiótico em leite cru refrigerado. **Revista UNIVAP**, São José dos Campos-SP-Brasil, ISSN 2237-1753. v. 22, n. 40, Edição Especial 2016. Disponível em: <<https://revista.univap.br/index.php/revistaunivap/article/view/952/1361>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

ALMEIDA, A.C.; SANTOS, C.A.; MENEZES, I.R.; TEIXEIRA, L.M.; COSTA, J.P.R.; SOUZA, R.M. Perfil sanitário de unidades agrícolas familiares produtores de leite cru e adequação à legislação vigente. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.17, n.3, p. 303-315, jul./set. 2016.

ALMEIDA JÚNIOR, G. A.; STRADIOTTI JÚNIOR, D.; DA SILVA, E. C. G.; ANDRADE, M. A. N.; ALMEIDA, M. I. V.; CÓSER, A. C. Avanços tecnológicos na bovinocultura de leite [recurso eletrônico] – Alegre, ES: **CAUFES**, 2012. 233 p. Disponível em: <<http://www.zootecnia.alegre.ufes.br/sites/zootecnia.alegre.ufes.br/files/field/file/Livro%20Bovinocultura%20de%20Leite%20em%20recurso%20eletr%C3%B4nico%20%20e-book.pdf>>. Acesso em: 01 out. 2018.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. APHA: Washington, 2001. 676 p.

ÂNGELO, F. F.; BARBOSA, A. O.; ARAÚJO, T. F. *Staphylococcus* coagulase positivo isolado de leite cru de tanques comunitários. **Revista Científica de Medicina Veterinária**-ISSN:1679-7353. n.22, 2014.

Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/QcXncJpwKv59yRL_2014-2-8-9-48-21.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2018.

ARCURI, E.F; BRITO, V.P; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

ASSIS, A. A.; FAÉ, C. B.; DONATELE, D. M.; BARIONI, G.; CLIPES, R. C.; ALMEIDA, Í. C.; DENADAI, L. B.; Sarmento, L. P.; ALMEIDA, S. L. H.; GUERSON, Y. B. Prevalência e etiologia da mastite bovina em municípios da região do Caparaó/ES. **Revista Acadêmica Ciências Animal**, v.15(Supl.2), p.285-286. 2017.

ÁVILA, F. A.; RIGOBELLO, E. C.; MALUTA, R. P. **Antibióticos, quimioterápicos e probióticos**. Jaboticabal: FUNEP, 2011. cap. 20, p. 83.

BOZO, G. A.; ALEGRO, L. C. A.; SILVA, L. C.; SANTANA, E. H. W.; OKANO, W.; SILVA, L. C. C. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 589-594, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 7, de 03 de maio de 2016. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, 04 mai. 2016. Secção 1, p.11.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 nov. 2018a. Secção 1, p.9.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 77, de 26 de novembro de 2018. Estabelece os critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 nov. 2018b. Secção 1, p.10.

BRITO, M. A. P.; LANGE, C. **Resíduos de antibióticos no leite**. Embrapa Gado de Leite. 1ª edição, 2005. Juiz de Fora, MG. (Comunicado Técnico, 44). Disponível em: <<http://people.ufpr.br/~freitasjaf/artigos/antibioticos.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

CAPLAB. **Teste de resíduos de antibióticos em leite cru**. Disponível em: < <http://www.cap-lab.com.br/> >. Acesso em: 20 abr. 2018.

DÜRR, J. W. **Como produzir leite de qualidade**, 4. ed. Brasília: SENAR,44 p. 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. 2018. Disponível em: <<ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/181654/1/Anuario-Leite-2018.pdf>>. Acesso em: 01 out. 2018.

FRANÇA, A. I. M.; SILVA, M. A. P.; BARROS, J. C.; SILVA, M. R.; NEVES, R. B. S.; NASCIMENTO, L. E. C.; NICOLAU, E. S. Qualidade do leite cru refrigerado granelizado coletado no sudoeste goiano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 70, n. 6, p. 316-325, nov/dez, 2015.

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - INCAPER, 2015. Disponível em: <<https://incaper.es.gov.br/pecuaria>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

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

LAMPUGNANI, C.; PERIN, A.P.; ZIECH, R.E.; JÚNIOR, O.A.C.; MONTANHINI, M.T.M.; BERSOT, L.S. Qualidade do leite cru refrigerado e características da produção leiteira na mesorregião oeste paranaense. Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 73, n. 1, p. 19-26, jan./mar. 2018.

MACHADO, R.M.G.; FREIRE, V.H.; SILVA, P.C.; FIGUERÊDO, D.V.; FERREIRA, P.E. Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios. **Projeto Minas Ambiente**, Belo Horizonte, 224p., 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice – Hall, 2003.

MARTINS, M. L.; CARVALHAES, J. F.; SANTOS, L. J.; MENDES, N. S.; MARTINS, E. M. M.; FURTADO, G. I. P. Qualidade do leite cru dos tanques de expansão individuais e coletivos de um laticínio do município de Rio Pomba, MG – Um estudo de caso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 24-32, 2013.

MENEZES, I. R.; ALMEIDA, A.C.; MORÃO, R.P.; REIS, S.V.R.; SANTOS, C.A.; LOPES, I.L.N. Qualidade microbiológica do leite cru produzido no Norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência e Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 58-63, 2015.

MONTEIRO, A. A.; PIRES, A. C. S.; ARAÚJO, E. A. **Tecnologia de produção de derivados do leite**. Viçosa: UFV, 2011.

NETA, F.C.N.; CARNEIRO, J.C.S.; PÍCCOLO, M.P.; JUNQUEIRA, M.S.; FRACALLOSSI, C.P.; ROSÁRIO, D.K. Diagnóstico de práticas adotadas pelos responsáveis do local de recepção e manutenção do leite cru refrigerado em tanques coletivos. In: IX Simpósio Brasileiro de Agropecuária Sustentável - VI Congresso Internacional de Agropecuária Sustentável, Viçosa, MG. 2018. **Anais...** Viçosa, MG, set. 2018. p.23-27.

NETA, F. C.N.; JUNQUEIRA, M.S.; CARNEIRO, J.C.S.; RAMOS, M.P.P.; ABDALLAH, F.R.; FRACALLOSSI, C.P. Condições de produção de leite em propriedades familiares localizada no município de Alegre - ES, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 24-32, 2013.

NETA, F. C.N.; JUNQUEIRA, M.S.; CARNEIRO, J.C.S.; RAMOS, M.P.P.; PINTO, C.L.O.; ROSÁRIO, D.K.A. Avaliação da qualidade de leite cru armazenado em tanques de refrigeração no município de Alegre, Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.70, n.3, p.117-131. maio/jun. 2015.

NUNES, M. T.; D'ANGELINO, J. L. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Revista Higiene Alimentar**. v. 21, p. 57-61, mar. 2007.

PÍCCOLO, M.P.; SANTOS, Y.I.C.; MACHADO, T.M.F.; DONATELE, D.M.; JÚNIOR, G.A.A. Parâmetros de qualidade de leite cru refrigerado obtido de propriedades de base familiar. In: IX Simpósio Brasileiro de Agropecuária Sustentável - VI Congresso Internacional de Agropecuária Sustentável, **Anais...** Viçosa, MG, set. 2018. p.23-27.

RAMOS, M.P.P.; PINTO, C.L.O.; CARVALHO, S.L.; CANGUSSÚ, L.V.; FREITAS, R.A.; LACERDA, J.S.J. Qualidade microbiológica e fatores que influenciam a produção de leite obtido de propriedades familiares no norte do Estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.4, n.1, p.1-15, jul. 2014.

SANTANA, E. H. W. de; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M. de; MORAES, L. B. de; TAMANINI, R.; SIL, W. P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 639-646, out./dez. 2006.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.3, p. 753-760, jul./set. 2008.

TEIXEIRA, S. R.; MENDONÇA, L. C.; DUTRA, A. S.; MONTEIRO, R. P. **Manual de manutenção da qualidade do leite cru refrigerado armazenado em tanques coletivos para produtores, técnicos, transportadores e coletadores de amostras de leite**. Embrapa Gado de Leite: Juiz de Fora, 25 p. 2018. (Documentos, 213).

TOALDO, I. M.; GAMBA, G. Z.; PICININ, L. A.; RUBENSAM, G.; HOFF, R.; BORDIGNON-LUIZ, M. Multiclass analysis of antibacterial residues in milk using RP-liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection and tandem mass spectrometer confirmation. **TALANTA**, v. 99, p. 616–624, 2012.

VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; SILVA, L. C. C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 181-188, jan./mar. 2009.

VILELA, D.; RESENDE, J. C.; LEITE, J. B.; ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista Política Agrícola**, Ano XXVI – Nº 1 – jan./fev./mar. 2017.