



IX Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite

PRESENCIAL | ONLINE

INOVAÇÃO, SUSTENTABILIDADE E OPORTUNIDADES

27 a 30 de Setembro de 2022

Centro de Convenções de Goiânia-GO



ANAIS

ISSN 2594-4177

CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE CBQL

MISSÃO

Promover a qualidade do leite e derivados.

VISÃO

Ser a fonte promotora da qualidade do leite e derivados no Brasil.

FUNÇÃO SOCIAL

Servir de fórum permanente, em fortalecer e motivar o estabelecimento de mecanismos na promoção da qualidade do leite e derivados

PRINCÍPIOS

Rigor científico e responsabilidade social

PROPÓSITOS

Zelo na saúde pela alimentação láctea e sustentabilidade na cadeia produtiva do leite e derivados no Brasil



ANAI DO IX CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE
INOVAÇÃO, SUSTENTABILIDADE E OPORTUNIDADES

Goiânia, Goiás

27 a 30 de setembro de 2022

Organizadores:

Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro (EVZ-UFG)

Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira (EV-UFGM)

Para mais informações entrar em contato com o Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite

Rua Professor Francisco Dranka, 608, Bairro Orleans

81200-404 Curitiba, Paraná

Fone: (41) 2105-1700

Email: cbql@cbql.com.br

Editado por Fernando Nogueira de Souza e Alice Maria Melo do Nascimento.

O conteúdo dos resumos aqui publicados é de responsabilidade exclusiva dos respectivos autores.

É permitida a reprodução parcial dos resumos desta edição desde que citada a fonte

Ficha Catalográfica

CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO
LEITE, 9, 2022, Goiânia, GO. Anais ... Curitiba,
PR: CBQL, 2022. 311p.

Inovação, sustentabilidade e oportunidades.

ISSN 2594-417

Evento organizado e promovido pelo CBQL
Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite (Gestão 2023)

Diretor-Presidente

Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro (EVZ-UFG/GO)

Vice-Presidente

Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira (UFMG/MG)

1º Diretor de Apoio à Gestão

Fernando Nogueira de Souza (FMVZ-USP/SP)

2º Diretor de Apoio à Gestão

Antonio Carlos Souza Lima Júnior (SL Consultoria em Agronegócio/GO)

1º Diretor Tesoureiro

Ozana de Fátima Zacaroni (EVZ-UFG/GO)

2º Diretor Tesoureiro

Alfredo Luiz Correia (Sindileite/GO)

1º Diretor Secretário

Vivian Fischer (UFRGS/RS)

2º Diretor Secretário

Vagner Miranda Portes (EPAGRI/SC)

Conselho Fiscal

José Augusto Horst (APCBRH/PR)

André Thaler Neto (UDESC/SC)

Laerte Dagher Cassoli (ESALQ-USP/SP)

Marcos Veiga dos Santos (FMCZ-USP/SP)

Adriano Henrique do Nascimento Rangel (UFRN/RN)

Alessandro de Sá Guimarães (EMBRAPA GADO DE LEITE - BRASÍLIA/DF)

Comissão Científica

Fernando Nogueira de Souza (FMVZ-USP/SP)

Vagner Miranda Portes (EPAGRI/SC)

Cláudia Freire de Andrade Moraes Penna (EV-UFGM)

Marcelo Resende de Souza (EV-UFGM)

Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira (EV-UFGM)

Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro (EVZ-UFG)

APRESENTAÇÃO

Ao longo das últimas décadas, houve grandes transformações na cadeia produtiva do leite no Brasil e definição dos parâmetros legais para a qualidade do leite no país por meio de vários documentos normativos. Apesar destas transformações, é crucial olharmos para o futuro e inovarmos para promovermos a sustentabilidade desta cadeia produtiva tão importante para o nosso país.

Neste sentido, o IX Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite realizado pelo CBQL com os temas “Sustentabilidade, a Inovação e Oportunidades” discute pautas importantes para o fortalecimento da cadeia produtiva do leite e a produção de um leite seguro. Sem dúvida, esta é uma oportunidade única para a participação e troca de conhecimentos entre todos os distintos elos da cadeia de lácteos.

Os diversos temas abordados no IX Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite serão divididos em 6 painéis: 1) Inovação e Oportunidades; 2) O desafio da sustentabilidade na cadeia de lácteos; 3) Inovações na produção de leite seguro; 4) Inovações analíticas disponíveis no mercado; 5) Leite e Derivados: controle e mercado; e 6) Leite e produtos lácteos: segurança e benefícios para o consumidor.

Portanto, de forma proativa, é fundamental estarmos preparados para os desafios da cadeia produtiva do leite em que o empoderamento pela ciência e pelo conhecimento baseado em evidências é crucial para aumentar a nossa capacidade e nosso repertório de soluções, preparando-nos para o futuro da bovinocultura de leite do Brasil.

A Comissão Científica,
Fernando Nogueira de Souza
Vagner Miranda Portes
Marcelo Resende de Souza
Cláudia Freire de Andrade Morais Penna
Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro

Lista de Revisores Ad Hoc

Revisores	Instituição
Adil Knackfuss Vaz	Sociedade Catarinense de Medicina Veterinária
Adriana Cristina de Oliveira Silva	Universidade Federal Fluminense
Adriana Hausser	Universidade do Estado de Santa Catarina
Adriano H. do Nascimento Rangel	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Alessandro de Sá Guimarães	EMBRAPA - Gado de Leite
Ana Maria Centola Vidal	Universidade de São Paulo
Andrea Troller Pinto	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Ariane Flávia do Nascimento	Instituto Federal de Minas Gerais
Artur Cezar de Carvalho Fernandes	Universidade Federal da Paraíba
Bruna Maria Salotti de Souza	Universidade Federal de Minas Gerais
Bruno Toletto Silva	Ghent University
Carla Gasparotto Chande Vasconcelos	LabVidaVet
Celso José de Moura	Universidade Federal de Goiás
Cristiane Viana Guimarães Ladeira	EPAMIG
Elisa Helena Paz Andrade	Universidade Federal de Minas Gerais
Evelise Oliveira Telles	Universidade de São Paulo
Givanildo Silva	Universidade Federal da Bahia
Guilherme Nunes de Souza	EMBRAPA - Gado de Leite
Marciel França	Universidade do Estado de Santa Catarina
Marcos Veiga dos Santos	Universidade de São Paulo
Mônica Correia Gonçalves	Universidade Federal de Campina Grande
Nathália Cristina Cirone Silva	Universidade de Campinas
Patricia Vilhena Dias de Andrade	Centro Universitário Universus Veritas e Faculdade Arnaldo
Renison Teles Vargas	Instituto Federal de Minas Gerais
Soraia Araújo Diniz	Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri
Valéria Caviccioli	Universidade Federal de Goiás

SUMÁRIO

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS E DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE COM RELAÇÃO A IN 77 NA REGIÃO DE IRATI, PARANÁ	15
BOVINOCULTURA DE LEITE A PASTO NO ASSENTAMENTO SÃO JOSÉ DA BOA MORTE, EM CACHOEIRAS DE MACACU- RJ.....	18
QUALIDADE DO COLOSTRO DE OVELHAS SUPLEMENTADAS COM <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NO TERÇO FINAL DE GESTAÇÃO.....	20
RESULTADOS DE PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE OBSERVADOS EM REBANHOS DA RAÇA JERSEY DO RIO GRANDE DO SUL SUBMETIDOS A CONTROLE LEITEIRO	22
USO DE FARELO DE SOJA PROTEGIDO COM OU SEM SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE PARA VACAS EM LACTAÇÃO PASTEJANDO GRAMINEAS TROPICAIS	24
USO DE FARELO DE SOJA PROTEGIDO COM OU SEM SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE PARA VACAS EM LACTAÇÃO CONFINADAS COM FORRAGEM FRESCA DE AZEVÉM E CONCENTRADO	26
COLISTIN RESISTANCE IN <i>Escherichia coli</i> ISOLATED FROM BOVINE MILK AND FECES	30
SUSCETIBILIDADE DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS ISOLADAS DE SALA DE ORDENHA FRENTE A QUATRO ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA	33
IN VITRO CYTOTOXICITY OF POLYHEXAMETHYLENE BIGUANIDE NANOPARTICLES ON BOVINE MAMMARY EPITHELIAL CELLS	36
APLICATIVO BASEADO EM INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL REDUZ ERRO DE INTERPRETAÇÃO DA CULTURA MICROBIOLÓGICA NA FAZENDA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE.....	38
ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES MICROCLIMÁTICOS, CARACTERÍSTICAS DA CAMA E QUALIDADE DO LEITE EM SISTEMA <i>COMPOST BARN</i>	41
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ASSOCIAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> E <i>Streptococcus agalactiae</i> ISOLADOS DE MASTITE BOVINA.....	43
AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DA PLACA ACCUMAST PLUS® PARA DETECÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR <i>Streptococcus agalactiae</i>	46
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE MORTE PROGRAMADA-1 (PD1) E SEU LIGANTE (PD-L1) EM MACRÓFAGOS DESAFIADOS POR DISTINTOS ISOLADOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> E <i>STAPLYLOCOCCUS CHROMOGENES</i> ASSOCIADOS A VACAS LEITEIRAS	49
AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO SELETIVO DE VACAS SECAS COM SELANTE INTERNO DE TETO EM REBANHO LEITEIRO NO ESTADO DA PARAÍBA	51

AVALIAÇÃO IMUNOMETABÓLICA DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS POR DISTINTOS ISOLADOS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> E <i>STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES</i> ASSOCIADOS A VACAS LEITEIRAS	53
AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AGENTES BACTERIANOS CAUSADORES DE MASTITE EM AMOSTRAS DE LEITE E CAMA EM REBANHO BOVINO LEITEIRO	56
BOVINE-ASSOCIATED STAPHYLOCOCCI AND MAMMALIICOCCI TRIGGER TLYMPHOCYTE PROLIFERATIVE RESPONSE AND CYTOKINE PRODUCTION DIFFERENTLY	59
CAPACIDADE DE DIFERENTES ESPÉCIES ESTAFILOCÓCICAS DE RESISTIR À FAGOCITOSE E PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS DE OVELHAS SANTA INÊS	62
CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Prototheca</i> EM CASOS DE MASTITE CLÍNICA EM VACAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	65
CARACTERIZAÇÃO DE MASTITES SUBCLÍNICAS AVALIANDO SISTEMAS DE PRODUÇÃO E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM REBANHOS DO PARANÁ	68
COMPARAÇÃO DO TESTE <i>CALIFORNIA MASTITIS TEST</i> REALIZADO EM DISTINTOS MOMENTOS DA ORDENHA COMO INDICADOR DE MASTITE SUBCLÍNICA	70
COMPORTAMENTO DE AMOXICILINA E CLAVULANATO EM PH ALCALINO DE LEITE DE VACAS COM MASTITE	73
CONDUTIBILIDADE ELÉTRICA DO LEITE E PRÁTICAS DE MANEJO PARA PREVENÇÃO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM VACAS JERSEY EM SISTEMA DE ORDENHA ROBOTIZADA	76
A OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA BOVINA E SUA INFLUÊNCIA NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DE VACAS LEITEIRAS	79
DIVERSIDADE MOLECULAR, FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ASSOCIADOS A BOVINOS	81
EQUIVALÊNCIA ENTRE METODOLOGIAS DE SUSCEPTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> AOS ANTIMICROBIANOS DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE BOVINA	84
ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA PREVALÊNCIA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM <i>Staphylococcus aureus</i> DE ORIGEM BOVINA	86
SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DE <i>Staphylococcus</i> spp. ISOLADOS NO LEITE DE VACAS DURANTE E APÓS TRATAMENTO NÃO CONVENCIONAL DA MASTITE	88
EXPRESSÃO DE CTLA-4 E PD-1 POR LINFÓCITOS T E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA NO PERÍODO PÓS-PARTO	91
FATORES CLIMÁTICOS E CCS DE VACAS EM SISTEMA <i>FREE STALL</i>	94

IDENTIFICAÇÃO DE <i>Streptococcus agalactiae</i> CAMP-NEGATIVO ISOLADOS DE MASTITE BOVINA NO AGRESTE PARAIBANO.....	96
INFLUÊNCIA DA SUJIDADE NO ÚBERE DE VACAS LEITEIRAS E A OCORRÊNCIA DE CASOS DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA.....	99
INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE COLETA EM ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE LEITE DE CABRA	101
PERÍODO PÓS-PARTO EM VACAS LEITEIRAS: DINÂMICA DA INFECÇÃO E DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA	104
PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E T CD8 ⁺ DE MEMÓRIA EM VACAS LEITEIRAS VACINADAS COM DISTINTOS HISTÓRICOS DE MASTITE POR <i>Staphylococcus aureus</i>	108
RELAÇÃO ENTRE A HIPERQUERATOSE, A OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA E A INFLUÊNCIA NA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM VACAS LEITEIRAS NA BAHIA E MINAS GERAIS	111
RELATO DE CASO: IMPACTOS DA IMPLEMENTAÇÃO DA TERAPIA SELETIVA DE VACA SECA, BASEADA NO CULTIVO MICROBIOLÓGICO, NA SAÚDE DE GLÂNDULA MAMÁRIA DE UM REBANHO COMERCIAL	114
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM <i>Streptococcus agalactiae</i> ISOLADOS DE MASTITE BOVINA	116
SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS RESISTENTES CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA A EXTRATOS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO.....	119
STAPHYLOCOCCUS AUREUS-CURE RELATED ANTIGENS TRIGGER TYPE 3 IMMUNOLOGICAL MEMORY T CELLS.....	121
<i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVOS (SCP) E <i>Staphylococcus</i> COAGULASE NEGATIVOS (SCN) EM VACAS COM MASTITE: CCS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	124
SURTO DE MASTITE EM 2020 E 2021 CAUSADA POR <i>Mycoplasma bovis</i> EM UM REBANHO LEITEIRO NA CIDADE DE BAMBUÍ/ MINAS GERAIS: RELATO DE CASO	126
SURTO DE MASTITE POR <i>Mycoplasma bovis</i> : INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE DE VACAS LEITEIRAS EM MINAS GERAIS.....	129
UMIDADE DA CAMA DE SISTEMAS DE COMPOST BARNs AUMENTA RISCO DE INCIDÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS	132
USO DA TÉCNICA MALDI-TOF NO ESTUDO DAS INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS CAUSADAS POR <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Mammaliicoccus sciuri</i> EM CABRAS DA BACIA LEITEIRA PARAIBANA: Estudo preliminar.....	135

CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE VACAS COM MASTITE CLÍNICA MONITORADAS ELETRONICAMENTE	138
VACINA AUTÓGENA E OS INDICADORES DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA: RESULTADOS PRELIMINARES.....	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE VACAS COM MASTITE CLÍNICA MONITORADAS ELETRONICAMENTE	145
EFEITO DE ÍNDICES TÉRMICOS NA TAXA DE PREENHEZ DE VACAS GIROLANDO DE DIFERENTES GRAUS SANGUÍNEOS	148
HORÁRIO DE ORDENHA, COMPORTAMENTO ALIMENTAR E DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS A PASTO	151
SEASONALITY ON SOMATIC CELL COUNTS OF HOLSTEIN CATTLE IN BRAZILIAN FARMS ..	153
AFLATOXINAS M1: PERCEPÇÃO DE PRODUTORES DE QUEIJO ARTESANAL.....	156
AGENTES ETIOLÓGICOS DE MASTITE SUBCLÍNICA EM VACAS JERSEY DE UM REBANHO NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL	158
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS E RICOTAS INSPECIONADOS PELO SERVIÇO OFICIAL DO ESTADO DE GOIÁS EM 2020 E 2021	161
DIVERSIDADE BACTERIANA PRESENTE NO LEITE CRU COM BAIXA CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	164
EFEITO DO PROJETO DE QUEIJOS FINOS SOBRE A QUALIDADE DO LEITE EM UMA PROPRIEDADE NO OESTE DO PARANÁ.....	167
EVOLUÇÃO DOS COLIFORMES AO LONGO DA MATURAÇÃO DE UM QUEIJO MINAS ARTESANAL DO MUNICÍPIO DE PIUMHI-MG	170
<i>IN VITRO</i> EVALUATION OF PROBIOTIC AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ARTISANAL CHEESE PRODUCED IN THE SERRA GERAL - MINAS GERAIS - BRAZIL	172
INCIDÊNCIA E NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA M1 EM QUEIJOS PRODUZIDOS EM PERNAMBUCO, 2022	175
INCLUSÃO DE <i>Thymus vulgaris</i> L. NA DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO E SEU EFEITO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU.....	177
PASTEURIZATION INFLUENCE ON THE CAPACITY OF EXPRESSION OF DIARRHEA TOXIN PRODUCTION GENES BY <i>Bacillus cereus</i> s.s. IN EXPERIMENTALLY CONTAMINATED MILK .	180

INFLUÊNCIA DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE NA PRODUÇÃO DE IOGURTE ...	182
OCORRÊNCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i> EM QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO EM SERGIPE.....	184
PAPEL DAS MICOTOXINAS NO LEITE E SUAS TOXICIDADES	187
PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE <i>Listeria monocytogenes</i> ISOLADOS DE TANQUES DE EXPANSÃO DE LEITE EM SANTA CATARINA	189
QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO ARTESANAL CABACINHA DO VALE DO JEQUITINHONHA - MINAS GERAIS: UMA REVISÃO	192
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LEITE E DERIVADOS INSPECIONADOS PELO SERVIÇO OFICIAL DO ESTADO DE GOIÁS EM 2020 E 2021	194
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LEITES PASTEURIZADOS COLETADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS.....	197
ANÁLISE DE RESÍDUO DE PENICILINA G, ESTREPTOMICINA E DIHIDROESTREPTOMICINA EM LEITE.....	200
APLICAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE OXITETRACICLINA, SULFADOXINA E TILOSINA EM LEITE	203
AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE KITS COMERCIAIS PARA DETECÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM LEITE BOVINO	206
AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE UHT EM DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO.....	209
AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE OXIDAÇÃO EM LEITE UHT EM DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO.....	212
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE BOVINO	215
IMPACTO DAS CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE NA REDUÇÃO DOS TEORES DE SÓLIDOS NÃO GORDUROSOS NA REGIÃO NORTE DO RIO GRANDE DO SUL	218
INFLUENCE OF SEASON, PHYSIOLOGICAL AND RACIAL VARIABLES AND SOMATIC CELLS COUNT ON MILK PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS IN COWS IN PASTURE SYSTEMS	220
INFLUENCE OF THE HOT AND COLD SEASONS ON PRODUCTION, COMPOSITION, AND PHYSICAL ATTRIBUTES OF MILK IN HERDS WITH PRODUCTION BASED ON PASTURE SYSTEM	223
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO DA SILAGEM DE COLOSTRO BOVINO NA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	226

INTERFERÊNCIA DO PH, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM NO TESTE DE TRIAGEM DE RESÍDUOS DE INIBIDORES MICROBIANOS EM LEITE CRU.....	228
OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS NO LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS PRODUZIDOS NO BRASIL	231
OCORRÊNCIA DE LINA NO LEITE DE VACAS JERSEY DO REBANHO EXPERIMENTAL DO SISPEL, DE 2011 A 2019	233
PROBABILIDADE DE OS SÓLIDOS NÃO GORDUROSOS APRESENTAREM VALORES IGUAIS E/OU ACIMA DE 8,4% DE ACORDO COM A IN 76 NA REGIÃO NORTE DO RIO GRANDE DO SUL	235
IMPACTO DAS ESTAÇÕES DO ANO E TEMPERATURA MÉDIA SOBRE OS TEORES DE SÓLIDOS NÃO GORDUROSOS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU NO NORTE DO RIO GRANDE DO SUL .	238
OHMIC HEATING TREATMENT IN HIGH-PROTEIN VANILLA FLAVORED MILK: PROCESSING PERFORMANCE AND PHYSICAL ASPECTS.....	240
OVERRUN DE SORVETE FUNCIONAL SIMBIÓTICO PRODUZIDO COM LEITELHO E POLPA DE CAGAITA (<i>Eugenia dysenterica</i>).....	242
PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE IOGURTES TIPO GREGO COM DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DE COLOSTRO	245
RESISTÊNCIA À DIGESTÃO SIMULADA DE CULTURA PROBIÓTICA ADICIONADA À BEBIDA LÁCTEA	248
VELOCIDADE DE DERRETIMENTO DE SORVETES FUNCIONAIS PROBIÓTICOS COM E SEM ADIÇÃO DE POLPA DE CAGAITA	250
AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA CLOREXIDINA E DETERGENTES NEUTRO, ÁCIDO E ALCALINO-CLORADO SOB BIOFILME BACTERIANO EM MATERIAL DE SALA DE	254
ORDENHA	254
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE BRASILEIRO: REVISÃO	256
AVALIAÇÃO DA CONFORMIDADE DOS REQUISITOS DE QUALIDADE DO LEITE BUBALINO PRESENTE EM LEGISLAÇÃO ESTADUAL PAULISTA.....	260
DIAGNÓSTICO INICIAL DO NÍVEL DE BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS NAS UPL DO PROGRAMA LEITE SEGURO	263
EFETIVIDADE DA TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA E SUA RELAÇÃO COM	266
MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE	266

EVOLUÇÃO DOS INDICADORES DE QUALIDADE DO LEITE NAS UPL DO PROGRAMA LEITE SEGURO: RESULTADOS INICIAIS	269
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL MATURADO	273
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL MATURADO	276
CLORAÇÃO DA ÁGUA EM PEQUENAS PROPRIEDADES RURAIS PRODUTORAS DE LEITE: UM ESTUDO DE CASO	279
CONNECTIVIDADE DOS PRODUTORES DO PROGRAMA LEITE SEGURO VISANDO ESTRATÉGIAS DE COMUNICAÇÃO.....	281
EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO LEITE NO PERFIL REDOX DO <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	284
IMPACTO SOCIOECONÔMICO DO PROJETO DE QUEIJOS FINOS A PRODUTORES DE LEITE NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ	287
PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL SUBMETIDO A DIFERENTES PERÍODOS DE MATURAÇÃO.....	289
SOLUÇÃO IOT PARA MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE TANQUES DE LEITE	294
DIAGNÓSTICO ESTRUTURADO DO IMPACTO DA COVID-19 NA CADEIA AGROARTESANAL DE QUEIJOS DO RIO GRANDE DO NORTE.....	298
IMPACTO DA ASSISTÊNCIA TÉCNICA E GERENCIAL DO SENAR AR/GO NA QUALIDADE DO LEITE, ESPECIFICAMENTE NA CCS, EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DO MUNICÍPIO DE PONTALINA GO	301
ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM VACAS HOLANDESAS USANDO MODELOS DE REGRESSÃO ALEATÓRIA	305
EFEITO DOS GENÓTIPOS DA BETA-CASEÍNA SOBRE A COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA.....	308
FATORES AMBIENTAIS QUE INFLUENCIAM CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS A MOBILIDADE EM VACAS LEITEIRAS.....	311
FREQUÊNCIA DOS ALELOS DE KAPPA E BETA CASEINA EM BOVINOS DAS RAÇAS ZEBUÍNAS	314
GANHOS GENÉTICOS DAS CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO DE LEITE E SÓLIDOS EM REBANHOS DA RAÇA HOLANDESA NO BRASIL.....	316
GANHOS GENÉTICOS DE SCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM REBANHOS DA RAÇA HOLANDESA NO BRASIL	318

GENETIC CORRELATIONS BETWEEN PREDICT TRANSMITTING ABILITIES FOR BOVINE VIRAL
DIARRHEA VIRUS AND PRODUCTION, REPRODUCTION AND HEALTH TRAITS IN HOLSTEIN
DAIRY CATTLE 320

PARÂMETROS GENÉTICOS PARA PORCENTAGEM DE GORDURA E PROTEÍNA PARA
PRIMIPARAS HOLANDESAS USANDO MODELOS DE REGRESSÃO ALEATÓRIA..... 323

Área Temática 01: NUTRIÇÃO ANIMAL

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS E DE CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE COM RELAÇÃO A IN 77 NA REGIÃO DE IRATI, PARANÁ

Marina Szychta¹, Marcela Calciolari Branquinho¹, Margarete Kimie Falbo², Nátalie Cristine Polo³

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Brasil. ²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Brasil. ³Médica Veterinária responsável técnica do Laticínio São Miguel – Irati, Brasil

INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento completo, com elevada importância social e econômica. Sua qualidade é influenciada pelo manejo dos animais, a alimentação e a sanidade da glândula mamária (Lima et al., 2006).

Os testes empregados para avaliar a qualidade do leite seguem normas regulamentadas por cada país. De maneira geral, são avaliadas características físico-químicas e sensoriais, ausência de micro-organismos patogênicos, conservantes e resíduos antimicrobianos, e definidos parâmetros de contagem padrão em placas (CPP) e contagem de células somáticas (CCS) (Jamás et al., 2018).

A contagem de células somáticas indica a qualidade higiênica do leite e, também a presença de mastite no rebanho, relacionando-se com a composição e rendimento industrial do produto. Já a contagem padrão em placas tem como propósito a avaliação da qualidade microbiológica do leite, também bastante relevante para os laticínios, além de ser importante para a saúde pública, indicando o grau de contaminação deste alimento (David et al., 2020).

Em 2018, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou as instruções normativas 76 e 77, que determinam padrões mínimos para qualidade do leite, entrando em vigor no ano de 2019. A IN 77 estabelece limite máximo aceito para CCS de 500.000 células/ml, e limite aceitável de CPP de 300.000 UFC/ml na média geométrica trimestral (Brasil, 2018).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade do leite de produtores da região de Irati-PR, analisando a média trimestral e o enquadramento dos parâmetros de CCS e CPP às regulamentações estabelecidas pela IN 77.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas cerca de 150 propriedades leiteiras da região de Irati -Pr, entre os meses de agosto a outubro de 2021, que comercializavam o leite para o laticínio da região. As propriedades possuíam o sistema de ordenha balde ao pé, com 2 ordenhas diárias. O manejo de ordenha em todas as propriedades consistia em uso de pré e pós dipping, lavagem dos tetos e teste da caneca de fundo escuro. O **California Mastitis Test (CMT)** era realizado quinzenalmente por 17% dos produtores.

O clima da cidade de Irati é temperado, apresentando verões amenos e invernos rigorosos, sem estação seca. Com relação aos índices pluviométricos, o município apresenta uma variação média, onde as chuvas são mais frequentes de setembro a fevereiro (Andrade et al., 2010).

As propriedades eram divididas em 6 linhas de coleta, com média de 25 produtores por linha. O tamanho dos rebanhos variava de 5 a 20 vacas em lactação, compostos principalmente pela raça holandesa (87%) e, também pela raça jersey (13%). Para determinação destas informações foram enviados questionários a serem respondidos pelos produtores que participaram do estudo.

As linhas de coleta avaliadas foram denominadas como “A, B, C, D, E e F”. Todo mês foi coletado pelo motorista uma amostra individual do leite do tanque de cada produtor. As amostras foram encaminhadas para análise no laboratório PARLEITE, nome empresarial: Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa-

APCBRH, para determinação de CCS e CPP a partir de citometria de fluxo. Posteriormente, a média das propriedades de cada linha foi determinada, assim como a média trimestral para cada parâmetro. Os resultados foram analisados com base nos limites estabelecidos pela IN 77.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados e a média trimestral obtidos.

Tabela 1 - Resultados da contagem de células somáticas e contagem padrão em placas das linhas de coleta analisadas.

		Linha A	Linha B	Linha C	Linha D	Linha E	Linha F
CCS*	Agosto/2021	749	774	793	375	503	515
	Setembro/2021	704	816	803	481	562	642
	Outubro/2021	664	744	756	591	506	694
	Média trimestral	706	778	784	482	523	617
CPP**	Agosto/2021	328	786	486	283	227	444
	Setembro/2021	1024	673	768	696	479	1214
	Outubro/2021	400	508	946	466	744	930
	Média trimestral	582	656	733	482	483	863

*Refere-se a 1000 cel./mL; **refere-se a 1000 UFC/mL.

Os valores médios de CCS apresentaram-se superiores ao limite máximo de 500.000 células/ml estabelecido pela IN77 em todas as linhas analisadas, com exceção da linha D, que apresentou média trimestral dentro do limite aceitável.

Segundo Belli (2015) a CCS do leite do tanque indica a incidência média de mastite no rebanho. Infecções intramamárias clínicas e subclínicas levam ao aumento das células somáticas no leite. A mastite clínica pode ser identificada através do teste da caneca de fundo escuro, enquanto a forma subclínica, caracterizada pela ausência de alterações visíveis no leite, pode ser detectada a campo pelo teste rápido California Mastitis Test (CMT).

Desta forma, ao considerar que somente 17% dos produtores realizavam frequentemente o CMT, pode-se inferir que a possível causa que contribuiu para as elevadas médias de CCS foi a presença de mastite subclínica nos rebanhos estudados.

Já com relação aos valores de CPP, também foi possível visualizar média trimestral superior ao limite permitido pela normativa em vigor em todas as propriedades avaliadas.

Conforme Souza et al. (2017) os principais fatores relacionados aos índices de CPP são, higiene de ordenha, condições de armazenamento e transporte do leite à indústria, formas de manejo do rebanho e contaminação da glândula mamária.

O período de chuvas na região coincidiu com o período de avaliação do estudo. Este fato, associado ao manejo de lavagem dos tetos antes da ordenha e ainda a presença de mastite, possivelmente contribuíram para a alteração microbiológica do leite.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo revelou inconformidade da média trimestral de CCS e CPP do leite da maioria das propriedades avaliadas em relação aos limites estabelecidos pela IN 77. Esta alteração da qualidade do leite pode ser atribuída a falha no manejo de ordenha, sobretudo no período de chuvas, que também contribui para incidência de mastites. Portanto, conhecendo o prejuízo dos níveis elevados de CCS e CPP sobre o rendimento e segurança alimentar do leite, é indispensável a adoção de medidas de manejo corretivas e preventivas, a fim de promover a adequação às legislações vigentes e melhorar a qualidade do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade A. R.; et al. Análise do campo térmico da cidade de Irati/PR: Primeiros experimentos para a definição do clima urbano. **Revista Brasileira de Climatologia**, v.6, 2010.

Belli, C. Z. P. **Qualidade do leite cru refrigerado obtido em unidades produtoras no sudoeste do Paraná.** Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2015.

Souza, V. T.; et al. Pesquisa de células somáticas e bactérias totais em amostras de leite cru e refrigerado proveniente de propriedade situada em Cachoeira de Macacu, RJ. **Higiene Alimentar**, v.31, n.272/273, 2017.

BOVINOCULTURA DE LEITE A PASTO NO ASSENTAMENTO SÃO JOSÉ DA BOA MORTE, EM CACHOEIRAS DE MACACU- RJ

Lorhaine Bernardes de Lima¹, Juliana Tiemi Martins Samesima¹, Wagner Pessanha Tamy², Marco Antonio Sloboda Cortez², Róberson Machado Pimentel²

¹Pós-graduanda, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil. ²Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil

INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite é uma atividade de elevada importância no Brasil, que é o terceiro maior produtor de leite do mundo (FAO, 2020). Essa atividade proporciona alta geração de emprego e renda, especialmente devido a diferentes escalas de produção, tecnologia utilizados.

No estado do Rio de Janeiro, a produção é predominantemente realizada a pasto por pequenos produtores, que alegam falta de assistência técnica e não possuem conhecimentos técnicos importantes para realização adequada da atividade, como a manutenção dos pastos, que pode levar a degradação das pastagens (Townsend et al., 2010). A degradação da pastagem afeta a produtividade e renda dos produtores, pela redução da oferta e qualidade da forragem, que leva a diminuição dos índices zootécnicos (Macedo et al., 2013).

Parte dos pequenos produtores do estado do Rio de Janeiro se encontram em assentamentos rurais. Esses produtores são oriundos, em maioria, de áreas urbanas e exercem atividades urbanas juntamente com a produção agrícola, especialmente em assentamentos localizados na região metropolitana. Um exemplo é o assentamento São José da Boa Morte, criado em 1982, após décadas de conflitos, que ocorriam devido a invasão de colonos as terras da antiga fazenda quando os donos fugiam da região devido aos surtos de febre amarela. E contribuiu com o uso inadequado e não planejado das terras

Com esse estudo objetivou-se avaliar a eficiência da produção de leite e associar os manejos das áreas de pastagens e índices zootécnicos dos rebanhos no assentamento São José da Boa Morte, Rio de Janeiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em outubro de 2021, no assentamento São José da Boa Morte, no município Cachoeiras de Macacu-RJ. O clima da região é tropical úmido, classificado como Am por Köppen e Geiger (1939).

Foi desenvolvido questionário semiestruturado, com perguntas objetivas e discursivas, porém que não permitiam que o assunto seja explorado (Becker, 1997; Whyte, 1955; Malinowski, 1976; Moreira, 2000, citados por Ribeiro et al., 2016). O questionário foi dividido em caracterização social (escolaridade, trabalhadores da propriedade, faixa etária do proprietário e tamanho da propriedade), distribuição das áreas produtivas (tamanho das áreas de pastagem e capineira), tratos culturais (frequência de análise de solo, correção da acidez do solo e adubações), diagnóstico da pastagem (avaliação do nível de degradação da pastagem através da observação do vigor das plantas, aparecimento de invasoras e falhas nas pastagens- metodologia de Dias Filho, (2017)), índices zootécnicos (número do rebanho, número de vacas totais, número de vacas em lactação e produção de leite), estratégias de alimentação e dificuldades na produção de leite.

Os entrevistados foram selecionados de acordo com a localização da propriedade (assentamento São José da Boa Morte), atividade exercida (bovinocultura de leite) e condição produtiva (agricultura familiar). Nessa perspectiva foram selecionados quatro produtores de quatro propriedades diferentes, que participaram de forma espontânea da pesquisa, sendo as entrevistas realizadas *in loco* nas respectivas propriedades. Os entrevistados foram informados que seus nomes não seriam divulgados, para deixá-los

mais à vontade e respeitar as questões sobre ética em pesquisa com seres humanos, em acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde a Resolução CNS 466/2012.

Foi realizada a análise envoltória de dados e os dados foram analisados no programa SIAD v3 ® – Sistema Integrado de Apoio à Decisão. E o *benchmark* foi determinado por meio da metodologia *Data Envelopment Analysis* (DEA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de eficiência estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Eficiências de produção por hectare (Prod/há), produção por vaca em lactação (Prod/vaca/lac), produção por mão de obra (Prod/MO) e global das propriedades (Cachoeiras de Macacu-RJ, 2021).

Propriedades	Prod/há	Prod/vaca/lac	Prod/MO	Global
1	100%	100%	35%	100%
2	41%	56%	85%	100%
3	39%	33%	54%	70%
4	53%	43%	100%	100%

A propriedade 1 foi mais eficiente na produtividade por área de pastagem. Apesar de não possuir uma alta produção (45 L/dia), a esta propriedade possui a menor área de pastagem (2 ha), o que tornou a propriedade mais eficiente quando relacionam essas variáveis. Todavia, as propriedades 2 e 4 possuem as maiores produções, mas as maiores áreas de pastagem, e a propriedade 3 apesar da pequena área possui a menor produção dos sistemas, portanto são menos eficientes nessa avaliação.

A melhor eficiência na produção de leite em relação ao número de vacas em lactação foi obtida pela propriedade. Isso pode estar relacionado com a reserva de alimento, visto que a propriedade 1 possui pequena área de pastagem (2 ha), com forte nível de degradação, e a maior área de capineira entre os entrevistados (1,5 ha).

A propriedade 4 foi mais eficiente em produção por mão de obra.

A baixa eficiência da propriedade 3 pode estar relacionada a baixa mão de obra, e a perda por alagamento de áreas úteis de pastagem e capineira no período chuvoso, quando o rebanho demanda maior oferta de forragem para expressar seu potencial produtivo.

As propriedades 2 e 4 possuem áreas de pastagem com nível de degradação moderada, mas a propriedade 4 nunca realizou calagem ou adubação e sua última análise de solo ocorreu há mais de 10 anos, enquanto a propriedade 2 realiza análise de solo, calagem e adubação anualmente. A similaridade no nível de degradação e divergência nos tratamentos culturais indicam realização inadequada dos tratamentos culturais, visto que foi relatado falta de assistência técnica.

Relacionado a eficiência global da atividade leiteira, as propriedades 1, 2 e 4 são as propriedades mais eficientes, enquanto a propriedade 3 é considerada ineficiente.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que na propriedade onde foram encontrados os maiores problemas de mão de obra e com a degradação de pastagens, os níveis de eficiência foram mais baixos, o que refletiu em uma pior condição de produção de leite.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Fluminense, pelo curso de Especialização em Produção Animal, Higiene e Tecnologia de Produtos de Origem Animal e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que viabilizou a realização deste programa.

QUALIDADE DO COLOSTRO DE OVELHAS SUPLEMENTADAS COM *Bacillus amyloliquefaciens* NO TERÇO FINAL DE GESTAÇÃO

Marina Szychta¹, Marcela Calciolari Branquinho¹, Margarete Kimie Falbo²

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Brasil. ²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Brasil.

INTRODUÇÃO

Probiótico é um suplemento alimentar à base de microrganismos vivos, que quando administrado em quantidades adequadas, atua em cooperativismo com o animal hospedeiro (Gaggia et al., 2010).

O *Bacillus amyloliquefaciens*, bactéria gram-positiva com capacidade de formar endósporos, faz parte de um dos gêneros bacterianos amplamente empregados na suplementação de ruminantes. Atua na melhoria da eficiência na absorção e digestão de nutrientes, aumento da taxa de crescimento e melhoria no estado geral de saúde do animal, devido estímulo do sistema de defesa imune inespecífico (Vazquez-Mendoza et al., 2018).

Em ovinos, o tipo de placenta (sindesmocorial) não permite a passagem de imunoglobulinas circulantes durante a gestação, o que torna fundamental a ingestão de colostro por todo cordeiro recém-nascido. A ingestão adequada de colostro de alta qualidade o mais cedo possível é amplamente reconhecida como fator determinante para a saúde e sobrevivência do neonato (Nunes, 2006).

A composição do colostro ovino varia conforme fatores genéticos e ambientais e, também pode ser alterada pela dieta. A nutrição de ovelhas no terço final da gestação, período em que ocorre maior crescimento fetal e mobilização de nutrientes para formação do colostro, modifica diretamente o desenvolvimento do úbere e altera a produção de colostro, tanto em volume quanto em concentração de imunoglobulinas (Lisboa et al., 2009).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da suplementação com o probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* na dieta pré-parto de ovelhas sobre a concentração de imunoglobulinas do colostro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido na Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná, localizada na região Centro-Sul, na cidade de Guarapuava. Em uma área de 0,32 ha de pastagem de Aveia (*Avena sativa*), foram formados dois piquetes, onde ficaram alocados o grupo teste, com 8 matrizes e o grupo controle, com 6 matrizes. A definição da composição dos grupos foi realizada a partir do diagnóstico por imagem (ultrassonografia) das matrizes, separando-as em grupos com fases gestacionais próximas ou equivalentes.

Ambos os grupos foram mantidos sob pastejo fixo e receberam suplementação a base de milho, na quantidade de 1% do peso vivo por animal/dia. Contudo, ao grupo teste foi adicionado o probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* junto a suplementação.

O probiótico foi adicionado ao milho na dose de 800 gramas por tonelada de alimento, ou seja, uma quantidade de aproximadamente $2,56 \times 10^6$ esporos viáveis por animal (Kritas et al., 2006), fornecido ao cocho uma vez ao dia.

A suplementação teve início no final da gestação, cerca de 75 dias antecedentes ao parto, período em que ocorre o rápido crescimento fetal e tem início a colostrogênese.

Amostras do colostro foram coletadas com intervalo máximo de 24 horas após a parição, com leitura direta em refratômetro de Brix.

As médias do Brix foram comparadas por meio do teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de imunoglobulinas do colostro das ovelhas suplementadas com o probiótico não apresentou variação estatística significativa ($p > 0,05$), conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios da porcentagem de Brix do grupo teste, que recebeu o probiótico, e o grupo controle, que não recebeu suplementação. ns = não significativo no teste de Tukey ($p < 0,05$).

	Teste	Controle Média
Brix (%)	21,9 ns	17,3 ns

O valor de Brix, relacionado à concentração de imunoglobulinas do colostro, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. No entanto, conforme estabelecido por Knottenbelt et al. (2004) o colostro de boa qualidade e com adequada concentração de imunoglobulinas apresenta nível Brix de 20-30%. Desta maneira, ao analisar numericamente as médias Brix, é possível observar que o grupo suplementado produziu colostro bom, com concentração de IgG superior ao limite mínimo de 50 g/L.

Esta melhora na qualidade possivelmente deve-se ao aumento da disponibilidade e mobilização de nutrientes para a composição do colostro, devido à capacidade de otimização do perfil bacteriano intestinal e melhora na imunidade e estado geral de saúde do animal (Vazquez-Mendoza et al., 2018), exercidas pelo *Bacillus amyloliquefaciens* durante o período de colostrogênese das ovelhas.

Segundo Bicudo et al. (2015) a adequada concentração de imunoglobulinas no colostro é essencial e contribui para o sucesso da transferência de imunidade passiva aos neonatos, que quando bem-sucedida, garante a defesa imunológica, assim como a sobrevivência dos cordeiros recém-nascidos durante o período neonatal.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação com o probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* no pré-parto de ovelhas resultou na produção de colostro de boa qualidade e com adequada concentração de imunoglobulinas, condição que contribui para a eficiente transferência de imunidade passiva aos neonatos. Novos estudos utilizando maior número amostral, com diferentes formas de oferta e dose do suplemento são necessários para melhor avaliação da influência do probiótico sobre a qualidade do colostro de ovelhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Knottenbelt, D. C.; et al. Equine Neonatology Medicine and Surgery. **WB Saunders Company**, Ediburg. p. 393-394, 2004.
- Kritas, S. K.; et al. Effect of Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis Supplementation of Ewe's Feed on Sheep Milk Production and Young Lamb Mortality. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, 4 ed., p.170-173, 2006.
- Vazquez-Mendoza, P.; et al. Antimicrobial and bactericidal impacts of Bacillus amyloliquefaciens CECT 5940 on fecal shedding of pathogenic bacteria in dairy calves and adult dogs. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 458–463, 2018.

RESULTADOS DE PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE OBSERVADOS EM REBANHOS DA RAÇA JERSEY DO RIO GRANDE DO SUL SUBMETIDOS A CONTROLE LEITEIRO

Lucas Schaefer Batista¹, Silvana Lüdtke Carrilhos², Helenice Gonzalez Lima³

¹Acadêmico de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. ²Responsável Técnica da Associação de Criadores de Gado Jersey do Rio Grande do Sul ³Professora Associada da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

INTRODUÇÃO

A raça Jersey é reconhecida por características como precocidade, longevidade e produção de um leite de alta qualidade, por conter altas concentrações de sólidos. Essas características fenotípicas são comuns aos animais da raça, todavia, diversos trabalhos de melhoramento vêm sendo realizados buscando aprimorar a capacidade produtiva dos exemplares. Sendo assim, verifica-se a importância de conhecer como estão os padrões de produção e qualidade do leite dos rebanhos, para posterior acompanhamento da sua evolução produtiva.

O Rio Grande do Sul (RS) foi a porta de entrada da raça Jersey no Brasil, hoje contém um rebanho de mais de dezoito mil animais registrados junto à Associação de Criadores de Gado Jersey do Rio Grande do Sul (ACGJRS), entidade filiada à Associação de Criadores de Gado Jersey do Brasil (ACGJB), que por sua vez é a entidade oficial de registros da raça junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil. Alguns desses rebanhos realizam a prova zootécnica de Controle Leiteiro (CL), do Serviço de Controle Leiteiro (SCL) da ACGJRS. Através de dados do SCL é possível a realização de diversos estudos para avaliação de padrões de produção e qualidade do leite dos rebanhos gaúchos da raça Jersey.

O objetivo deste trabalho é apresentar os resultados obtidos em levantamentos observacionais de dados de produção e qualidade do leite dos rebanhos da raça Jersey do Rio Grande do Sul, que realizam CL, entre os anos de 2017 e 2020.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o levantamento utilizaram-se dados individuais dos CL fornecidos pelo SCL da ACGJRS, de todos os animais que o realizaram, durante o período avaliado. Foram considerados apenas animais que pariram no ano correspondente, lactaram, foram secados, e já tiveram os dados validados pela equipe técnica da ACGJRS. Em 2017 foram avaliadas lactações de 241 animais, em 2018 de 182, em 2019 de 75, e 2020, lactações de 40 animais. O número decrescente de lactações avaliadas ao longo do tempo se dá devido a fatores como oscilação no número de animais em que realizam CL, lactações que ainda não haviam sido encerradas, e/ou validadas pela ACGJRS, no momento do levantamento.

Foram levantados, de cada animal submetidos ao CL os seguintes dados: dias em lactação; Idade das vacas ao parto; média individual de produção diária de leite; Produção total de leite na lactação; Concentração (%) média de gordura, proteína total, lactose e sólidos totais ao longo da lactação; E produção total (kg) de gordura, proteína total, lactose e sólidos totais. Para todos os parâmetros apontou-se o menor e o maior valor registrado em cada ano, além da média entre todos os valores individuais registrados nas lactações daquele ano.

No CL os animais com registro genealógico válido são identificados individualmente, mensalmente mensura-se a produção de leite individual de todas as ordenhas, de cada animal, por meio de balança dinamométrica, ou equipamento eletrônico. No mesmo dia da mensuração da produção, coleta-se uma amostra do leite, através da qual obtém-se os resultados da composição bioquímica do mesmo, em

laboratório oficial da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), pelo método infravermelho.

Os dados individuais de identificação dos animais, produção leiteira mensal, com sua respectiva composição são lançados em programa específico do SCL, que calcula os resultados, e produz planilhas para Excel® com os mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do levantamento estão expressos na tabela 1.

Tabela 1 - Padrões de produção e qualidade do leite de rebanhos da raça Jersey registrados e zootecnicamente acompanhados no Rio Grande do Sul.

Ano		Dias de lactação	Idade ao parto (anos)	Leite/dia (kg)	Total de leite Lactação (Kg)	Total de gordura lactação (Kg)	% de gordura	Total de proteína lactação (Kg)	% de proteína	Total de lactose lactação (Kg)	% de lactose	Total de sólidos lactação (Kg)	% de sólidos
2017	Mín.	24	1,8	5,87	303,80	12,33	2,59	10,36	2,78	12,79	3,03	38,28	10,92
	Méd.	258	4,8	16,55	4252,89	181,06	4,24	154,50	3,60	188,25	4,40	566,96	13,25
	Máx.	390	12,2	34,70	10861,10	652,34	6,10	370,55	4,92	494,53	4,74	1627,01	17,45
2018	Mín.	26	1,7	5,53	742,00	26,63	1,91	20,48	2,66	34,03	3,50	91,49	9,95
	Méd.	298	4,9	16,58	4834,82	212,23	4,37	177,21	3,63	214,10	4,41	642,26	13,23
	Máx.	380	11,8	38,80	10072,39	652,96	6,51	383,18	4,43	463,47	5,03	1569,29	15,64
2019	Mín.	78	1,7	10,69	1326,00	41,11	3,10	43,89	3,23	57,95	3,89	155,14	11,69
	Méd.	312	5,0	14,87	4594,88	188,26	4,07	171,24	3,72	207,05	4,50	612,80	13,32
	Máx.	378	10,6	32,84	8769,05	550,80	6,81	334,47	4,14	395,25	4,69	1329,66	17,91
2020	Mín.	212	2,2	10,37	2925,60	127,18	3,03	110,17	3,45	133,81	4,33	417,71	11,81
	Méd.	332	4,9	13,37	4423,21	173,59	3,94	165,69	3,74	201,41	4,55	583,02	13,19
	Máx.	379	10,5	15,90	5337,76	257,53	5,72	201,09	3,96	240,36	4,71	706,55	15,02

A duração média das lactações foi 300 dias, o que é desejável, para que haja um período seco de 60 dias para recuperação da glândula mamária para lactação subsequente. A idade média, ao parto, dos animais em produção, foi de 4,9 anos, havendo animais que pariram com menos de 24 meses, e mais de 12 anos, demonstrando atributos raciais de precocidade e longevidade.

A produção leiteira média, entre os períodos, foi 4528,7kg, 15,3kg/animal/dia, ficando acima aos valores encontrados por RIES, J. E., 2019, para rebanhos do estado, que foi 3.761,5kg/ano. Os valores médios da composição do leite estão dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente no país, para processamento e industrialização.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados, obtidos de forma observacional, verificar-se como se comportaram os padrões de produção e qualidade do leite de animais da raça Jersey distribuídos pelo Rio Grande do Sul entre 2017 e 2020. Este trabalho poderá servir de base para outros estudos que busquem demonstrar quais fatores interferem nos parâmetros produtivos dos animais da raça Jersey, e como o fazem. De mesma forma como gerou-se o registro histórico dos padrões de produção e qualidade do leite de animais da raça Jersey no Rio Grande do Sul, que poderão em tempo futuro, serem utilizados para avaliar a evolução dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. **Instrução Normativa 78, de 30 de novembro de 2018**. Brasília, DOU, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- BRASIL. **Regulamento de Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal**. 2017, Brasília, DOU, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Leite, T. E. *et al*; Eficiência Reprodutiva em Vacas Leiteiras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.3, p.467-472, 2001.
- Oliveira, M. D. S. **Cria e Recria de Bovinos Leiteiros**. Jaboticabal: Funep, 2001.
- Oliveira, M. D. S. **Pecuária Leiteira**. Jaboticabal: Funep, 1998.
- Ries, J. E. **Relatório socioeconômico da cadeia produtiva do leite no Rio Grande do Sul: 2019**. Porto Alegre: Emater/RS-Ascar, 2019.

USO DE FARELO DE SOJA PROTEGIDO COM OU SEM SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE PARA VACAS EM LACTAÇÃO PASTEJANDO GRAMINEAS TROPICAIS

Marciél França¹, Adriana Hauser¹, Izabelly P. Telles¹, Nathallie C. Gonçalves¹, Roberto Kappes¹, Angelica L. Scheid¹, Thiago R. Niero¹, André Thaler Neto¹

¹Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Brasil

INTRODUÇÃO

A suplementação de vacas com somatotropina bovina recombinante (rBST) vem sendo praticada comercialmente desde a década de 1990 em países como o Brasil e EUA. No entanto o uso da rBST, um hormônio, causa uma percepção negativa ao consumidor (Wolf et al., 2016), apesar de décadas de pesquisa atestando sua segurança e efetividade (St-Pierre et al., 2014). Atualmente a suplementação com rBST é proibida em países da Europa e vem sendo usada em menor escala nos EUA, pelo apelo comercial de produtos “rBST-free”.

Estudos in vitro e também com a infusão pós ruminal de alguns aminoácidos ou fontes de proteína como a caseína demonstram que alguns grupos de aminoácidos aumentam a síntese de proteína e principalmente de lactose na glândula mamária (Lapierre et al., 2010). O aumento na síntese de lactose aumenta o volume de leite, pelo seu efeito osmótico. Assim a suplementação de fontes protegidas de proteína com um perfil de aminoácidos adequado pode ser uma ferramenta para o aumento na produção sem que exista a percepção negativa do consumidor sobre a aplicação de hormônios, sendo uma opção caso a rBST seja banida.

Assim, o presente estudo buscou investigar a suplementação de farelo de soja protegido comparado ao farelo de soja convencional, ambos associados ou não a suplementação com rBST, para vacas consumindo pastagem perene tropical e seus efeitos sobre a produção e qualidade do leite.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 36 vacas Jersey, 28 multíparas e 8 primíparas ($21,1 \pm 3,9$ kg/d de leite; $172,0 \pm 71,0$ DEL, $381,6 \pm 39,08$ kg e $3,4 \pm 2,18$ partos), oriundas do rebanho comercial, sem suplementação de rBST anterior ao experimento, foram utilizadas em um esquema fatorial 2X2, com delineamento em blocos casualizados. Os fatores foram o tipo de farelo de soja no concentrado (Farelo de soja convencional – SBM, ou farelo de soja protegido – pSBM – Soypass BR®, Cargill) e a suplementação de somatotropina bovina recombinante (rBST, Lactotropin®, União Química, nas doses de 0 ou 500 mg, subcutânea, a cada 12 dias). As vacas foram blocadas pelo número de dias em lactação (DEL), ordem de parto e produção de leite e sorteadas a um dos quatro grupos experimentais (SBM, pSBM, SBM+rBST e pSBM+rBST). As vacas pastejaram em piquetes mistos de gramíneas perenes tropicais (*Cynodon* sp., *Axonopus* sp.), e receberam concentrado (6 kg/dia) com SBM ou pSBM (33% na matéria natural). Os concentrados foram alimentados duas vezes ao dia, após as ordenhas. A produção de leite foi registrada diariamente, componentes (% de gordura, proteína, lactose e caseína, contagem de células somáticas, nitrogênio ureico e propriedades físico-químicas: pH, acidez titulável e resistência ao teste do álcool) e escore de condição corporal (ECC, escala de 5 pontos) semanalmente, a cada 12 dias foram colhidas amostras de sangue para avaliação do nível de ácidos graxos não esterificados. O peso vivo foi tomado 3 dias antes do experimento e nos 3 dias finais. Os últimos 3 dias antes da alocação do tratamento foram usados como covariável e as 2 semanas após como período de adaptação. Os dados foram submetidos a análise de

variância, utilizando o procedimento MIXED do SAS com medidas repetidas ao longo do tempo. O modelo incluiu os efeitos fixos do bloco, semana, suplementação de ST, tipo de SBM, interações e erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de leite e de leite corrigido pela energia foram maiores quando rBST ou pSBM foram suplementados enquanto a suplementação combinada não resultou em aumento significativo em relação ao uso isolado de uma das tecnologias.

Na composição do leite, o teor de proteína total foi menor para vacas suplementadas com pSBM, assim como o teor de caseína (Tabela 1). O aumento na produção de leite causa diluição dos componentes, e é apontado como causa da queda nos teores, especialmente de proteína e suas frações. O teor de lactose foi maior para vacas suplementadas com rBST, comparado às não suplementadas. Os mecanismos poupadores de glicose e estimulantes da gliconeogênese suportam o aumento da síntese de lactose na glândula mamária causado pela rBST, aumentando o volume de leite, mas por vezes também o teor de lactose (Capuco; Akers, 2011).

A produção diária de componentes foi maior quando rBST ou pSBM foram suplementados, no entanto o uso de ambos não diferiu de quando apenas um deles foi usado para a produção diária de proteína e caseína e tendeu a não diferir para a produção diária de gordura. A produção de lactose foi maior quando rBST ou pSBM foram suplementados. A suplementação com rBST ou pSBM não alterou o escore de células somáticas ou o teor de nitrogênio ureico do leite. Quanto as características físicoquímicas, apenas houve tendência a menor valor de pH para as vacas recebendo pSBM, sem que diferenças tenham ocorrido para a acidez titulável ou resistência ao teste do álcool (Tabela 1).

O peso vivo final foi maior nas vacas suplementadas com rBST (Tabela 1), não havendo diferenças quanto ao escore de condição corporal (ECC) para os tipos de SBM ou a suplementação de rBST. O teor de ácidos graxos não esterificados foi maior para vacas recebendo rBST comparada às não suplementadas, mostrando que as vacas recebendo rBST usaram a oxidação de lipídeos para suportar o aumento de produção (Capuco; Akers, 2011), porém o mesmo não ocorre quando o aumento de produção é causado pelo pSBM.

O aumento na produção de leite e de componentes corrobora com os apresentados por Lapierre et al. (2010) e suportam o uso de farelo de soja protegido como substituto a rBST, sem que a qualidade do leite seja afetada negativamente.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para vacas em pastagens perenes tropicais, com suplementação concentrada moderada, a suplementação de farelo de soja protegido, assim como a suplementação com rBST melhoram o desempenho produtivo, sem provocar redução da qualidade do leite.

AGRADECIMENTOS

A Cargill/Nutron, pelo aporte do Soypass BR® utilizado no experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Capuco, A. V.; AKERS, R. M. Lactation: Galactopoiesis, Effect of Treatment with Bovine Somatotropin. **Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition**, p. 32–37, 2011.
- Lapierre, H. et al. Protein supply, glucose kinetics and milk yield in dairy cows. (Wan, Ed.)4. International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (ISEP). **Anais...**Parma: 2010.
- St-Pierre, N. R. et al. Meta-analysis of the effects of sometribove zinc suspension on the production and health of lactating dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n. 5, p. 550–564, 2014.
- Wolf, C. A. et al. Public and farmer perceptions of dairy cattle welfare in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5892–5903, jul. 2016.

USO DE FARELO DE SOJA PROTEGIDO COM OU SEM SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE PARA VACAS EM LACTAÇÃO CONFINADAS COM FORRAGEM FRESCA DE AZEVÉM E CONCENTRADO

Marciél França¹, Adriana Hauser¹, Angelica L. Scheid¹, Andre Macedo¹, Pedro H. F. Coradassi¹, Laiz Perazolli¹, Rainer Hauser², André Thaler Neto¹

¹Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, Brasil. ²Unidade Central de Educação Faem Faculdade, Itapiranga, Brasil

INTRODUÇÃO

A suplementação de vacas com somatotropina bovina recombinante (rBST) é praticada comercialmente desde a década de 1990 em países como o Brasil e EUA. No entanto o uso da rBST, um hormônio, causa uma percepção negativa ao consumidor (WOLF et al., 2016), apesar de décadas de pesquisa atestando sua segurança e efetividade (St-Pierre et al., 2014). Atualmente a suplementação com rBST é proibida em países da Europa e vem sendo usada em menor escala nos EUA, pelo apelo comercial de produtos “rBST-free”.

O emprego de estratégias para suportar a produção de leite em cenários sem rBST passa a ser uma demanda crescente. Para vacas em pastejo, com uma Estudos in vitro e também com a infusão pós ruminal de alguns aminoácidos ou fontes de proteína como a caseína demonstram que alguns grupos de aminoácidos aumentam a síntese de proteína e principalmente de lactose na glândula mamária (Lapierre et al., 2010). O aumento na síntese de lactose aumenta o volume de leite, pelo seu efeito osmótico. Assim a suplementação de fontes protegidas de proteína com um perfil de aminoácidos adequado pode ser uma ferramenta para o aumento na produção sem que exista a percepção negativa do consumidor sobre a aplicação de hormônios, podendo ser uma opção caso a rBST seja banida.

Assim, o presente estudo buscou investigar a suplementação de farelo de soja protegido comparado ao farelo de soja convencional, ambos associados ou não a suplementação com rBST, para vacas consumindo pastagem de azevém colhida fresca servida no cocho e seus efeitos sobre a produção e qualidade do leite.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento envolveu 16 vacas Holstein e Holstein x Jersey ($25,6 \pm 6,42$ kg/dia de leite, $2,7 \pm 2,3$ partos, 524 ± 61 kg de peso vivo e DEL = 182 ± 88 dias ao início e 205 ± 88 dias na média do experimento) em um esquema fatorial 2X2, com delineamento em blocos casualizados. Os fatores foram o tipo de farelo de soja no concentrado (Farelo de soja convencional – SBM, ou farelo de soja protegido – pSBM – Soypass BR®, Cargill) e a suplementação de somatotropina bovina recombinante (rBST, Lactotropin®, União Química, nas doses de 0 ou 500 mg, subcutânea, a cada 12 dias). As vacas foram distribuídas em blocos conforme o grupamento genético (Holstein ou Holstein x Jersey), ordem de parto e produção de leite, sendo então alocadas a um dos quatro grupos experimentais (SBM, pSBM, SBM+rBST e pSBM+rBST). Foram fornecidos 6 kg/vaca/dia de concentrado, com 33% de SBM ou pSBM na matéria natural. A forragem consistiu de azevém anual (cv. WinterStar 3®), cortada fresca com forrageira Taarup®, e fornecida à vontade. Antes do experimento, as vacas não recebiam suplementação com rBST.

As vacas foram alojadas em sistema Tie-Stall, com cama de serragem e ordenhadas duas vezes ao dia em sala tipo espinha de peixe 2x4. Os concentrados foram alimentados duas vezes ao dia, após as ordenhas. A produção de leite foi registrada diariamente, enquanto componentes e escore de condição corporal (ECC, escala de 5 pontos) semanalmente. O peso vivo foi tomado 3 dias antes do experimento e nos 3 dias finais. Os últimos 3 dias antes da alocação do tratamento foram usados como covariável

e as 2 semanas após como período de adaptação, após isso se seguiram 4 semanas de coletas. Os dados foram submetidos a análise de variância, utilizando o procedimento MIXED do SAS com medidas repetidas ao longo do tempo. O modelo incluiu os efeitos fixos do bloco, semana, suplementação de rBST, tipo de SBM, interações e erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação com rBST aumentou a produção de leite em 3,2 kg/vaca/dia (Tabela 1), e a produção de leite corrigida pela energia em 4 kg/dia. As produções diárias de gordura, proteína e lactose foram maiores para as vacas que receberam rBST. A suplementação de rBST é uma estratégia que permite melhoria no desempenho produtivo em vacas no terço final de lactação (Capuco; Akers, 2011). A fonte de farelo de soja não diferiu na resposta para quaisquer das variáveis do desempenho produtivo, e todos os grupos experimentais tiveram elevado NUL, evidenciando um aporte excessivo de proteína.

A suplementação com rBST ou diferentes tipos de farelo de soja não afetou as características físico-químicas do leite. As vacas suplementadas com rBST e pSBM tiveram menor ECC ao final do experimento (Tabela 1). Apesar da diferença no desempenho produtivo, não houve diferenças em consumo de matéria seca, mostrando que nessa situação as reservas corporais suportaram a maior demanda por nutrientes.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para vacas em terço final de lactação, confinadas com forragem fresca de azevém, com suplementação concentrada moderada, a suplementação de rBST melhora o desempenho produtivo sem provocar redução da qualidade do leite. Nestas condições não há vantagens no uso do farelo de soja protegido em substituição ao farelo de soja convencional.

AGRADECIMENTOS

A Cargill/Nutron, pelo aporte do Soypass BR® utilizado no experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Capuco, A. V.; AKERS, R. M. Lactation: Galactopoiesis, Effect of Treatment with Bovine Somatotropin. **Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition**, p. 32–37, 2011.
- Lapierre, H. et al. Protein supply , glucose kinetics and milk yield in dairy cows. (Wan, Ed.)4. International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (ISEP). **Anais...**Parma: 2010.
- St-Pierre, N. R. et al. Meta-analysis of the effects of sometribove zinc suspension on the production and health of lactating dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n. 5, p. 550–564, 2014.
- Wolf, C. A. et al. Public and farmer perceptions of dairy cattle welfare in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5892–5903, jul. 2016.

Tabela 1. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (EPM) e valor de P para desempenho produtivo e qualidade do leite, peso vivo e escore de condição corporal (ECC) de vacas suplementadas com 6 kg/dia de concentrado contendo farelo de soja (SBM) ou farelo de soja protegido (pSBM) com ou sem somatotropina bovina recombinante (rBST) recebendo forragem de azevém fresco cortado e servido no cocho.

Item	Tipo de SBM			rBST		Tratamento ¹					Valor de P		
	SBM	pSBM	Não	Sim	EPM					Tipo de SBM	rBST	Tipo de SBM x rBST	
					SBM	pSBM	SBM+rBST	pSBM+rBST	EPM				
Leite, kg/d	24,0	24,6	22,7	25,9	0,8511	22,2	23,2	25,7	26,1	12,121	0,582	0,012	0,808
LCE ² , kg/d	27,6	27,2	25,4	29,4	10,697	25,4	25,4	29,7	29,1	15,315	0,832	0,013	0,818
Gordura, %	4,32	4,05	4,05	4,32	0,141	4,16	3,94	4,48	4,16	0,2105	0,214	0,207	0,794
Proteína, %	3,50	3,45	3,43	3,52	0,0322	3,47	3,38	3,53	3,52	0,0486	0,341	0,052	0,408
Lactose, %	4,75	4,73	4,73	4,75	0,0242	4,73	4,72	4,77	4,73	0,0366	0,490	0,481	0,668
Caseína, %	2,59	2,63	2,63	2,60	0,0493	2,64	2,62	2,54	2,65	0,0722	0,555	0,662	0,335
Gordura, kg/d	1,028	0,989	0,924	1,093	0,0452	0,933	0,914	1,122	1,064	0,0651	0,541	0,014	0,758
Proteína, kg/d	0,839	0,834	0,776	0,897	0,0314	0,773	0,779	0,905	0,889	0,0447	0,903	0,011	0,811
Lactose, kg/d	1,137	1,168	1,075	1,230	0,0413	1,051	1,099	12,226	12,366	0,0591	0,593	0,013	0,771
Caseína, kg/d	0,620	0,637	0,595	0,662	0,0261	0,588	0,602	0,651	0,672	0,0376	0,637	0,082	0,932
pH	6,49	6,47	6,50	6,47	0,015	6,50	6,49	6,48	6,46	0,0225	0,458	0,208	0,915
AT ³ , °D	16,08	16,73	16,24	16,58	0,3964	16,07	16,41	16,1	17,06	0,5858	0,251	0,555	0,603
Alcool ⁴	72,9	74,3	73,6	73,5	11,945	71,2	76,1	74,6	72,5	17,817	0,398	0,945	0,078
NUL ⁵ , mg/dL	19,4	20,1	19,9	19,6	0,5696	19,7	20,1	19,1	20,1	0,8335	0,381	0,697	0,742
ECS ⁶	2,997	2,163	2,139	3,022	0,5469	2,682	1,596	3,312	2,731	0,894	0,359	0,304	0,715
Peso Vivo, kg	522,8	527,6	521,7	528,6	56,964	522,0	521,5	523,7	533,6	90,667	0,588	0,480	0,494
ECC ⁷ , escala 1-5	2,806	2,710	2,901	2,615	0,023	2,911	2,890	2,700	2,529	0,0359	0,014	<0,001	0,014
CMS ⁸ , kg/d	21,6	21,9	21,6	21,9	0,397	21,4	21,8	21,8	21,9	0,565	0,701	0,669	0,785

¹SBM= farelo de soja convencional, pSBM= farelo de soja protegido, SBM+rBST= farelo de soja convencional e somatotropina e pSBM+rBST= farelo de soja protegido+ somatotropina. ²Leite corrigido pela energia (TYRRELL; REID, 1965). ³AT= Acidez titulável, medida em graus Dornic (°D). ⁴Maior graduação alcoólica, em graus Gay-Lussac (°GL) que o leite não formou grumos. ⁵Nitrogênio ureico do leite. ⁶Escore de células somáticas, ECS=log2((CCS+1)/100)+3. ⁷Escore de condição corporal. ⁸Consumo de matéria seca.

Área Temática 02: SANIDADE ANIMAL

COLISTIN RESISTANCE IN *Escherichia coli* ISOLATED FROM BOVINE MILK AND FECES

Maysa Serpa Gonçalves¹, Dircéia Aparecida Custódio da Costa¹, Carine Rodrigues Pereira¹, Rafaella da Silva Andrade¹, Anna Cecília Trolesi Reis Borges Costa¹, Geraldo Márcio da Costa¹, Elaine Maria Seles Dorneles¹, Alessandro de Sá Guimarães^{1,2}

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil.

²EMBRAPA-Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil

INTRODUCTION

Antimicrobial resistance is one of the major concerns worldwide. Animal production has been pointed as an important source of resistant strains, since several antimicrobial bases are indiscriminately used to treat and prevent infectious diseases in herds. In dairy industry, bovine mastitis is the most prevalent disease, and it is responsible for the higher use of antimicrobials in dairy farms. Among the bacterial species that can cause this illness is *Escherichia coli* that has a high potential to acquire resistant phenotype, besides having great importance to public health, since it is a zoonotic pathogen.

The aim of this study was (1) assess the susceptibility profile to 12 antimicrobials, and (2) evaluate the presence of plasmid-mediated colistin resistance genes in of *E. coli* isolated from milk acquired from cows with mastitis and from the environment of dairy farms localized in Minas Gerais, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Eighty-eight *E. coli* isolates were used in this study, including 57 strains isolated from milk of cows with mastitis, and 31 from bovine feces. The strains were obtained between 2004 and 2016 from farms localized in Minas Gerais, Brazil, and belong to the Microorganisms Collection from the Laboratório de Bacteriologia (Bacteriology Laboratory), Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Twelve antimicrobial agents (Table 1) were used to assess the susceptibility profile and the minimal inhibitory concentration (MIC) of the isolates, employing the microdilution technique, according to the M100 and VET01S manual of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Strains were considered multidrug resistant (MDR) when they were resistant to three or more antimicrobial groups. A multiplex PCR assay were performed for detection of *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr3* and *mcr-5* genes in all studied strains (Rebelo et al, 2018).

RESULTS AND DISCUSSION

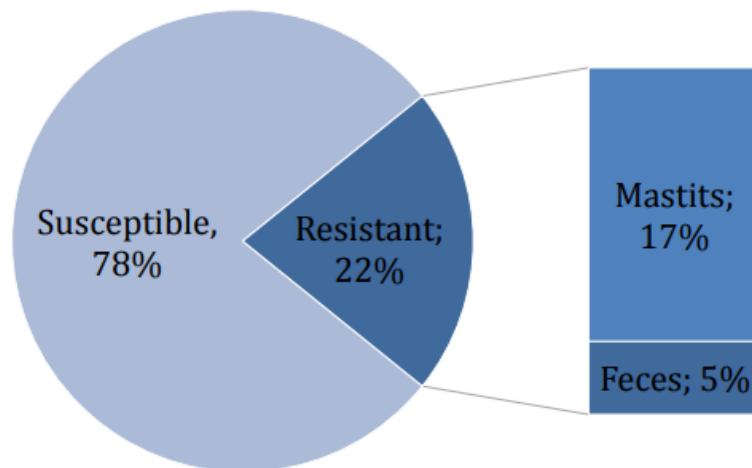
Results showed elevate levels of resistance (Table 1), with fifty-seven isolates [64.77% (57/88)] resistant to at least one antimicrobial tested, and 16 [18.88% (16/88)] multidrug resistant (Figure 1). Cephalosporins, phenicols, sulfonamides and tetracyclines are drugs commonly used in dairy farm routine and these results sustain that continuous exposure to antimicrobial principles generate selective pressure and, consequently, resistant strains. In addition, our results also showed high resistance to colistin, a drug not usually used in bovine treatment in Brazil, however, none of the *mcr* alleles prospected were found. A possible explanation for this result is the resistance mediated by the other alleles, as *mcr-9.1*, that was already reported in Brazil (Daza-Cardona et al., 2021). Nevertheless, other mechanisms associated with colistin resistance have already been reported, as drug efflux pumps and phenotypic alterations in the membrane cell (Godry et al., 2021).

Table 1 - Frequency of resistant *Escherichia coli* isolated from bovine milk and feces to several antimicrobial drugs, Minas Gerais, 2004-2016

Antimicrobial drug	% resistant isolates
Amikacin	0.00%
Ampicillin	7.95%
Cefazolin	12.50%
Cefoxitin	6.82%
Ceftiofur	6.82%
Ciprofloxacin	0.00%
Chloramphenicol	1.14%
Colistin	21.59%
Florfenicol	38.64%
Gentamycin	0.00%
Sulfamethoxazole/ Trimethoprim	18.18%
Tetracycline	17.05%

These mechanisms are more generic and can promote resistance to other antimicrobials principles, as antiseptics, for example (Mc Carlie, Boucher and Bragg, 2020). Furthermore, it is possible to speculate the role of the constant exposure to antiseptic in the milking routine (dipping) as a source of cross resistance to colistin and other antimicrobials, since mastitis isolates showed higher resistance levels than feces isolates (Figure 1). Additionally, the resistance to colistin is a public health concern, once colistin is a drug used as last-resource treatment for multidrug resistant Gram-negative infections in human.

Figure 1 - Colistin resistance in *Escherichia coli* isolated from bovine milk and feces, Minas Gerais, 2004-2016.



CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

E. coli strains isolated from dairy cattle showed great levels of resistance to several drugs, including colistin, which draws attention to indiscriminate use of antimicrobials in animal production and to cross resistance with drugs important for human health.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- Daza-Cardona, E.A. et al. *mcr*-mediated colistin resistance in South America, a One Health approach: a review. **Review and Research in Medical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. e119-e136, 2021.
- Godry, F.A. et al. Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n. 677720, p. 1-19, 2021.

Mc Carlie, S., Boucher C.E., and Bragg, R.R. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 48, n. 100672, p. 1-9, 2020.

SUSCETIBILIDADE DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS ISOLADAS DE SALA DE ORDENHA FRENTE A QUATRO ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA

Pedro Rassier dos Santos¹, Rosana Basso Kraus¹, Silvia Leal Ladeira², Kamila Furtado da Cunha¹, Isadora André Rosa Lopes³, Helenice Gonzalez de Lima⁴, Natasha Deboni Cereser⁴, Patrícia da Silva Nascente¹.

¹Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil. ²Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil. ³Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão. ⁴Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de grande valor econômico, visto que gera renda e emprego para grande parte da população (Matte & Jung, 2017). No Brasil, a pecuária leiteira é considerada uma das atividades mais importantes do setor agropecuário, trazendo grande relevância social e econômica para o país (Lucca & Arend, 2020). Entretanto, no primeiro trimestre de 2022 houve redução da aquisição de leite cru pelos estabelecimentos de 10,3% em relação ao primeiro trimestre do ano anterior e acredita-se que esse impacto esteja relacionado, principalmente, pelos altos custos de produção (IBGE, 2022).

Grande parte do valor econômico que o leite traz aos produtores está relacionado a composição de proteínas, lipídeos, açúcares, sais minerais e vitaminas essenciais para o desenvolvimento humano (Nascimento et al., 2014). Por ser um alimento rico em nutrientes, este pode servir como meio para o desenvolvimento de bactérias provenientes de contaminações, que, durante o processo de ordenha pode ser oriunda de sujidade do úbere, mãos do ordenhador e equipamentos da sala de ordenha, como as teteiras ou devido a mastite, enfermidade multifatorial e de ampla etiologia (Cardoso & Araújo, 2004).

O uso de antibióticos ainda é o procedimento mais utilizado dentro das salas de ordenha para o tratamento da mastite (SHAHEEN et al., 2016). Com isso, torna-se necessário fazer um acompanhamento do perfil etiológico dos micro-organismos encontrados neste local e avaliar a eficácia dos antibióticos. Então, o objetivo do trabalho foi avaliar a suscetibilidade de bactérias isoladas de teteiras em sala de ordenha frente a quatro antibióticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de bactérias utilizadas estavam armazenadas no Laboratório de Microbiologia e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, e foram reativadas em Agar BHI previamente a realização dos experimentos. Foram utilizadas 17 bactérias: *Enterococcus faecalis* (10), *Enterococcus faecium* (4), *Staphylococcus intermedius* (1), *Streptococcus uberis* (1), *Streptococcus dysgalactiae* (1). Todas haviam sido coletadas de teteiras de sala de ordenha com a utilização de swabs.

Para o preparo dos inóculos, cada amostra foi semeada, em agar Brain Heart Infusion (BHI) e colocada em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as colônias foram diluídas em água destilada com aproximadamente 1,5x10⁸ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Quatro antibióticos foram usados para avaliar a suscetibilidade: Rifampicina (RIF) 5µg, Clindamicina (CLI) 2µg, Imipenem (IPM) 10µg e Levofloxacina (LVX) 5µg, conforme documento do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Os inóculos foram colocados em placas de Petri contendo o meio Agar Mueller Hinton. Em seguida, com o auxílio de pinças, os discos de antibiótico foram fixados no meio, nas concentrações previamente descritas. Todas as placas foram incubadas overnight a 37°C. Após esse período, mediu-se o diâmetro da inibição do crescimento bacteriano de halos de cada

antibiótico e determinado se cada bactéria foi suscetível (S), intermediária (I) ou resistente (R) aos antibióticos testados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelo teste de antibiograma estão representados na tabela.

Tabela 1. Perfil de suscetibilidade de bactérias isoladas de teteiras em salas de ordenha frente a quatro antibióticos comumente utilizados para o controle da mastite.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
RIF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R
CLI	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I
IPM	S	R	R	R	R	S	I	S	I	I	I	R	R	R	S	S	S
LVX	S	R	S	R	S	I	R	I	I	S	S	S	S	S	R	S	R

*Rifampicina 5µg (RIF), Clindamicina 2µg (CLI), Imipenem 10µg (IPM), Levofloxacina 5µg (LVX);

***Enterococcus faecalis* (1-10), *Enterococcus faecium* (11-14), *Staphylococcus intermedius* (15), *Streptococcus uberis* (16), *Streptococcus dysgalactiae* (17).

Os antibióticos ao qual as bactérias apresentaram maior resistência foram a clindamicina e rifampicina. Para a clindamicina observamos resistência nas amostras de *E. faecalis* (100%), *E. faecium* (75%), *S. intermedius* (100%) e *S. uberis* (100%), enquanto que para a rifampicina observamos uma amostra de *E. faecalis* suscetível, com 90% de amostras resistentes, além de resistência observada nas amostras de *E. faecium* (100%) *S. uberis* (100%) e *S. dysgalactiae* (100%).

A crescente resistência dos *Enterococcus spp.* isolados de leite e seus derivados aos antimicrobianos têm sido considerada um grande desafio terapêutico nas propriedades leiteiras, pois sabe-se que estes podem promover a disseminação de genes de resistência a antibióticos para outras bactérias, principalmente se estiverem associados a eventos genéticos móveis (Terra et al., 2019).

No nosso estudo, a levofloxacina foi o antibiótico ao qual foi observada maior suscetibilidade, semelhante ao encontrado por de Oliveira et al. (2020) realizado por que testaram a levofloxacina frente a micro-organismos isolados da mastite bovina, e verificaram que 100% dos *Staphylococcus spp.* sensíveis a este antibiótico.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com estes resultados salientamos a importância de testes de suscetibilidade para a escolha adequada do antibiótico a ser utilizado em cada caso, visto que há grande variação entre as bactérias analisadas e os antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De Oliveira, Palloma Vitória Carlos et al. Avaliação da qualidade do leite cru e prevalência de mastite no município de Mossoró-RN. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 64027-64042, 2020.

CLSI, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; M100. **38 Approved Standard —28th Edition**.

Terra, Marcia R. et al. Assessment of vancomycin resistance transfer among enterococci of clinical importance in milk matrix. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 12, p. 925-929, 2019

Área Temática 03: MASTITE

IN VITRO CYTOTOXICITY OF POLYHEXAMETHYLENE BIGUANIDE NANOPARTICLES ON BOVINE MAMMARY EPITHELIAL CELLS

Renata de Freitas Leite¹, Renata Rank Miranda², Breno Luis Nery Garcia¹, Bruna Juliana Moreira Dias², Ricardo Vieira Ventura¹, Valtencir Zucolotto², Liam Good³, Marcos Veiga dos Santos¹

¹School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Pirassununga, Brazil. ²Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo, Sao Carlos, Brazil. ³Royal Veterinary College, University of London, London, United Kingdom

INTRODUCTION

Mastitis is one of the most prevalent diseases in dairy herds, which causes huge economic losses and affects cows' wellbeing worldwide. The inflammatory response of the mammary gland is usually triggered by a bacteria invasion. Teat disinfection before and after milking is a cheap and effective practice to prevent the intramammary infection (IMI). Chlorhexidine, iodine, and chlorine compounds are commonly used for this practice. On the other hand, polyhexamethylene biguanide (PHMB) is a safe and versatile polymer that presents a broad spectrum of antimicrobial activity and inhibits mastitis causing pathogens by in vitro assays.

The usage of nanoparticles (NP) for clinical application has increased especially against infectious diseases. Antimicrobial nanotherapeutic drugs are a groundbreaking strategy to avoid bacterial resistance and biofilm formation; moreover, nanoparticlesbased materials usually present low toxicity for mammalian cells. In order to create a novel strategy for IMI prevention, our research group developed PHMB NP, which presented a higher ATM activity compared to free PHMB, chlorhexidine digluconate (CHG), povidone iodine (PVP-I) and sodium dichloroisocyanurate (NaDCC), against mastitis-causing *Staphylococcus aureus* (Leite *et al.*, 2021). Cytotoxicity assays are extensively used to evaluate the biocompatibility of NP with living cells and is required before in vivo experiments.

Therefore, the objective of the present study was to evaluate the toxicity of PHMB NP and PHMB on bovine mammary epithelial cells (MAC-T) compared to disinfectants commonly used for teat dipping.

MATERIALS AND METHODS

Cytotoxicity of PHMB NP, PHMB, CHG, NaDCC, and PVP-I to MAC-T was evaluated by colorimetric tetrazolium assays (Orellano *et al.*, 2019). MAC-T cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) supplemented with 50 µg/mL gentamicin, 25 µg/mL amphotericin B, and 10% of fetal bovine serum. Cells were standardized at 5×10^4 cells/mL and added to 96-well tissue culture plates. After 24 h of incubation at 37°C, with 5% CO₂, the supernatant of each well was removed, and cells were washed with sterile phosphate-buffered saline solution. Adhered cells were incubated with NP and disinfectants which were serially diluted in DMEM in the following range of concentrations: a) PHMB NP, PHMB and CHG: 16 – 0.12 µg/mL; b) NaDCC: 1,600 – 12.5 µg/mL; and PVP-I: 16,000 – 125 µg/mL. Non-treated cells in DMEM were used as control. After incubation for 24 h and 72 h, supernatant was discarded, and 0.05% Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) was applied into the wells. Plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 1 h. Afterward, the content in which well was removed and dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to dissolve the blue crystals. Optical density (OD) values were measured 570 nm by a microplate reader and results were expressed as a percentage of cell viability compared to the untreated control wells. Analyses were carried out in triplicate for 3 times, and data were evaluated by ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

RESULTS AND DISCUSSION

Bovine mammary epithelial cells were exposed for 24 hours and 72 hours to 8 concentrations of PHMB NP, PHMB, CHG, NaDCC and PVP-I for the evaluation of their viability by MTT assays. PHMB NP, PHMB and CHG were evaluated at the lower (and the same) range of concentrations, since they are biguanide compounds and present a similar chemistry and mode of action. In a comparison among biguanides, higher concentrations of PHMB NP and PHMB were required to affect cells viability compared to untreated control (100%). No significant differences were observed in relation to the cytotoxic effects of PHMB NP and free PHMB on MAC-T cells; for both disinfectants, the concentrations ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ significantly reduced cell viability after 24 hours (PHMB NP: 87.6%; PHMB: 89.79%) and 72 hours (PHMB NP: 72.5%; PHMB: 80.6%) of exposure ($P < 0.01$). One serial concentration differed the results obtained for PHMB NP and PHMB compared to CHG, which significantly decreased ($P < 0.001$) cell viability in concentrations ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$ after 24 hours (88.3%) and 72 hours (58.2%). On the other hand, NaDCC and PVP-I are halogens, and a greater range of concentration was required to evaluate their cytotoxic effects. Briefly, lower concentrations of NaDCC decreased cell viability compared to PVP-I, even if we consider only the concentration of active iodine (10%) in the PVP-I complex. MAC-T cells viability was reduced in concentrations ≥ 50 $\mu\text{g/mL}$ (55.18%; $P < 0.001$), after 24 hours of exposure to NaDCC; moreover, all tested concentrations for this disinfectant (78.8% of viability at 12.5 $\mu\text{g/mL}$) were toxic to cells after 72 hours ($P < 0.01$). Regarding PVP-I, no differences were observed between the results obtained at 24 hours and 72 hours; for both periods of incubation, concentrations $\geq 2,000$ $\mu\text{g/mL}$ reduced cell viability in 46.4% and 49.6%, respectively.

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

Biguanides reduced cell viability in lower concentrations than halogens. Moreover, no differences regarding the safety of PHMB NP and PHMB in MAC-T cells were observed. Although further studies are required before the direct usage of PHMB NP and PHMB on cows, PHMB and PHMB-NP are potential alternatives for the development of a novel teat dipping solution.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- Leite, R. F., et al. Antimicrobial activity of polyhexamethylene biguanide nanoparticles against mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. **JDS Communications**, v. 2, n. 5, p. 262–265, 2021.
- Maillard, J.-Y. 2013. **Mechanisms of bacterial resistance to microbicides**. Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 5th ed. A. P. Fraiese, J.-Y. Maillard, and S. A. Sattar, ed. Wiley-Blackwell.
- Orellano, M. S., et al. Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of the native polymer against bovine mastitis pathogens. **Carbohydrate Polymers**, v. 213, n. November 2018, p. 1–9, 2019.

ACKNOWLEDGEMENTS

Sao Paulo Research Foundation (FAPESP, Sao Paulo, Brazil; process no. 2017/50461-5) and Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC, United Kingdom) for the joint funding of the research and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES; Brasília, Brazil) and FAPESP (process no. 2019/01705-4) for the scholarships.

APLICATIVO BASEADO EM INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL REDUZ ERRO DE INTERPRETAÇÃO DA CULTURA MICROBIOLÓGICA NA FAZENDA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

Breno Luis Nery Garcia¹, Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues Martins², Marcos Veiga dos Santos¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). ²On-Farm/Rumina

INTRODUÇÃO

O uso de sistemas de cultura microbiológica na fazenda (CMF), baseada em meios de cultura cromogênicos, possibilita a identificação dos agentes causadores da mastite em cerca de 24 horas, o que permite tomar decisões sobre o tratamento seletivo da mastite clínica e sobre aplicação de medidas controle de mastite (Granja et al., 2021). Entretanto, a interpretação dos resultados do CMF requer treinamento e experiência do operador, visto que a acurácia diagnóstica de especialistas é substancialmente maior do que a de usuários não treinados (Sipka et al., 2021).

A automação na avaliação da CMF, utilizando inteligência artificial (IA) para analisar imagens de colônias de microrganismos em meios de cultura em tempo real, pode minimizar erros na interpretação dos resultados da CMF. Aplicativos baseados em IA podem apresentar acurácia diagnóstica semelhante à de um especialista na interpretação de resultados a partir de imagens dos meios de cultura (Glasson et al., 2017).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a acurácia diagnóstica de um aplicativo baseado em IA (AppIA) para interpretar resultados de CMF, em comparação ao diagnóstico de um especialista e à interpretação de usuários treinados na fazenda.

MATERIAIS E MÉTODOS

Por meio da metodologia de aprendizado de máquina (aprendizado supervisionado), um classificador automático baseado em modelos de redes neurais convolucionais foi desenvolvido para diagnóstico de agentes causadores de mastite a partir de imagens digitais. Para desenvolvimento do AppIA (OnFarm®, Piracicaba, São Paulo, Brasil), foi utilizado um banco de imagens composto por 1.550 imagens de meios de cultura cromogênico com ao menos uma colônia de agentes causadores de mastite. O banco de imagens foi rotulado antes do processo de treinamento e dividido aleatoriamente em duas partes: imagens de treinamento (n=1.200) imagens de validação (n=350). No treinamento, foi usada a validação cruzada *k-fold*, enquanto na validação verificou-se a capacidade do modelo em identificar corretamente os microrganismos no conjunto de imagens.

Após o desenvolvimento, para avaliar a acurácia do AppIA para identificação dos agentes causadores de mastite em condições de campo, foram utilizadas 212 imagens de meios de cultura cromogênicos, capturadas pelo aplicativo OnFarmApp (OnFarm®, Piracicaba, São Paulo, Brasil). As interpretações dos resultados da CMF foram feitas inicialmente por usuários treinados (UT) nas fazendas, e os resultados foram registrados no OnFarmApp, juntamente às imagens dos meios de cultura. Posteriormente, as imagens foram submetidas à avaliação pelo AppIA e por um especialista (com experiência laboratorial de interpretação de meios de cultivo cromogênicos), que foi considerado como referência para o cálculo dos indicadores de desempenho diagnóstico: coeficiente *Kappa* de Cohen (*K*), sensibilidade (*Se*), especificidade (*Sp*), valor preditivo positivo (PPV) e valor preditivo negativo (VPN).

Os resultados de *Se*; *Sp*; VPP e VPN foram interpretados de acordo com as seguintes categorias: baixo (<0,60); intermediário (0,60-0,80) e alto (>0,80). Já os

resultados de *K* foram classificados por nível de concorância em: quase perfeita (0,811,00); substancial (0,61-0,80); moderada (0,41-0,60); regular (0,21-0,40); leve (0,000,20), e fraca (>0,00).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os resultados de Sp e VPN do ApplA e do UT foram classificados como altos (Tabela 1). Do total de 32 resultados de acurácia diagnóstica (Se; Sp; VPP e VPN), o ApplA apresentou maior número de resultados classificados como altos (n=30/32) do que o UT (n=24/32), e menor número de resultados classificados como baixos (ApplA=0/32; UT=3/32). Ademais, o ApplA apresentou maiores resultados de VPP para patógenos contagiosos (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*), em relação ao UT. Comparando-se as categorias interpretativas dos oito resultados de *K*, o ApplA teve o dobro de resultados de concordância quase perfeita (n=6/8), do que o UT (n=3/8), e menor número de resultados de concordância substancial e moderada (ApplA=2/8; UT=5/8).

Tabela 1 - Acurácia diagnóstica da avaliação visual de usuários treinados em cultura na fazenda e o aplicativo baseado em inteligência artificial, comparado a especialista (referência) a partir da imagem meio de cultura cromogênicos com isolados microbiológicos de mastite clínica (n=212).

	UT ¹					ApplA ³				
	<i>K</i> ³	Se ⁴	Sp ⁵	VPP ⁶	VPN ⁷	<i>K</i>	Se	Sp	VPP	VPN
<i>Strept. agalactiae</i> / <i>dysgalactiae</i>	0,69	0,81	0,94	0,67	0,97	0,81	0,81	0,98	0,85	0,97
<i>Streptococcus uberis</i>	0,69	0,79	0,95	0,68	0,97	0,86	0,88	0,98	0,87	0,98
<i>Enterococcus spp.</i>	0,52	0,50	0,97	0,62	0,96	0,86	0,81	0,99	0,93	0,98
<i>Klebsiella spp./</i> <i>Enterobacter spp.</i>	0,90	0,90	1,00	0,90	1,00	0,95	0,90	1,00	0,86	0,99
<i>Escherichia coli</i>	0,94	0,94	0,99	0,94	0,99	0,91	0,89	0,99	0,94	0,99
<i>Staph. aureus</i>	0,50	0,81	0,91	0,42	0,98	0,78	0,88	0,97	0,74	0,99
<i>Staph. não aureus</i>	0,69	0,72	0,93	0,86	0,86	0,59	0,61	0,94	0,85	0,82
Outros patógenos	0,82	0,88	0,95	0,86	0,95	0,85	0,86	0,97	0,92	0,95

¹Usuário treinados; ²Aplicação baseada em inteligência artificial; ³Coeficiente Kappa deCohen; ⁴Sensibilidade; ⁵Especificidade; ⁶Valor preditivo positivo; ⁷Valor preditivo negativo

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ApplA apresentou desempenho diagnóstico similar ao de um especialista, mas superior ao de um UT para a interpretação visual da identificação dos principais agentes causadores de mastite em triplacas de meio de cultura cromogênico utilizadas para cultura na fazenda. Os resultados obtidos indicam que o uso do ApplA pode minimizar erros na interpretação visual dos resultados de cultura na fazenda, aumentar a acurácia diagnóstica da CMF, o que resulta em uso mais adequado desta ferramenta para decisões de tratamento seletivo e controle da mastite nos rebanhos leiteiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Glasson., et al. Multicenter Evaluation of an Image Analysis Device (APAS): Comparison Between Digital Image and Traditional Plate Reading Using Urine Cultures. **Journal of Clinical Microbiology** logo, v. 54, n. 2 p. 499–504, 2017.

Granja, B. M., et al. Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 8, 2021.

Sipka, A., et al. Short communication : Comparative performance of 3 on-farm culture systems for detection of mastitis pathogens interpreted by trained and untrained observers. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, 2021.

ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES MICROCLIMÁTICOS, CARACTERÍSTICAS DA CAMA E QUALIDADE DO LEITE EM SISTEMA *COMPOST BARN*

Karise Fernanda Nogara¹, Marcos Busanello², Queila Tavares¹, Gustavo Freu³, Juliana de Assis¹, Breno Luiz Nery Garcia³, Marcos Veiga dos Santos³, Maity Zopollatto¹

¹Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. ²Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil

INTRODUÇÃO

A expansão de sistemas de confinamento para vacas leiteiras vem se destacando e ganhando a preferência dos produtores, visando o aumento na produção de leite, otimização de áreas de terras, bem-estar e conforto animal. Neste cenário, o sistema *Compost Barn* (CB) tem se difundindo em regiões de clima subtropical, sendo considerado promissor nestas regiões.

Para o bom funcionamento dos sistemas CB, é essencial a adequada compostagem do material da cama. Quando o processo de compostagem é ótimo (e.g., adequados teores de umidade e temperatura), observa-se melhor condição de higiene das vacas e, conseqüentemente, menor risco de infecções intramamárias (Eckelkamp et al., 2016). Porém, um dos maiores desafios neste tipo de sistema é o controle da umidade da cama.

Diante disso, este estudo teve o objetivo de avaliar a influência de fatores microclimáticos sobre a cama, e o efeito das características da cama sobre a qualidade e composição do leite de fazendas leiteiras do estado do Paraná que utilizam o sistema CB para confinamento das vacas.

MATERIAL E MÉTODOS

De setembro/2021 a fevereiro/2022 oito rebanhos leiteiros, com sistema CB na região dos Campos Gerais do Paraná, foram monitorados. Foram realizadas visitas mensais para mensurar a temperatura da cama, e para isso, a área de cama foi dividida em nove quadrantes, nos quais foi mensurada a temperatura na camada superficial, a 10, 20 e 30 cm de profundidade. Em cada ponto de avaliação da cama foram coletadas sub amostras. As sub amostras dos nove pontos foram homogeneizadas para obter amostras representativas de toda a área de cama, e então foram utilizadas para análises de: umidade da cama, pH, relação carbono:nitrogênio e contagem de microrganismos. As variáveis ambientais [temperatura e umidade relativa do ar (UR)] foram registradas com uso de *dataloggers* instalados nos galpões. Variáveis de composição e qualidade do leite [gordura, proteína, ureia, contagem de células somáticas (CCS) e contagem padrão em placas (CPP)] foram registradas ao longo de todo o período experimental, os quais foram disponibilizados mensalmente pelo laticínio. Análises de correlação canônica (ACC) foram realizadas para identificar relações entre grupos de variáveis estudadas (V1 – variáveis respostas e W1 – variáveis preditoras). Para isso, seis grupos de análise foram construídos: a) composição e qualidade do leite vs características físico-químicas (FQ) da cama; b) composição e qualidade do leite vs contagem de microrganismos da cama; c) composição e qualidade do leite vs variáveis ambientais; d) FQ da cama vs contagem de microrganismos da cama, e) FQ da cama vs variáveis ambientais; e f) contagem de microrganismos da cama vs variáveis ambientais. A ACC foi estimada buscando determinar a magnitude das relações entre os indicadores do estudo. Os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS (SAS Institute, 2012) e diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nosso estudo os únicos grupos de variáveis que tiveram associação canônica significativa foram Leite^β vs Cama[€] ($P = 0,0004$) e Cama^β vs Ambiente[€] ($P = 0,0222$; Tabela 1).

As variáveis da cama que mais tiveram influência (via carga canônica – CC) sobre o grupo de composição e qualidade do leite foram: umidade (CC de 0,53), a temperatura a 30 cm de profundidade (-0,50) e pH (-0,57). As variáveis de composição e qualidade do leite mais afetadas foram a CCS (0,48) e ureia (0,58). Em relação às variáveis relacionadas ao microclima, a temperatura e a UR tiveram efeito (-0,50 e 0,99, respectivamente) sobre a temperatura superficial e o pH da cama (-0,69 e 0,71, respectivamente).

Tabela 1 – Correlações canônicas entre variáveis ambientais, de cama e de qualidade e composição do leite.

Indicadores	(R_c^2)	Proporção	Valor de P
Leite ^β x Cama [€]	0,68	0,63	0,0004
Leite ^β x Contagem de microrganismos [€]	0,26	0,55	0,2606
Leite ^β x Ambiente [€]	0,30	0,77	0,1055
Cama ^β x Contagem de microrganismos [€]	0,29	0,55	0,4779
Cama ^β x Ambiente [€]	0,45	0,77	0,0222
Contagem de microrganismos ^β x Ambiente [€]	0,11	0,82	0,6788

€ Variáveis independentes; β variáveis dependentes; (R_c^2) – correlação canônica

Nota: Leite: Contagem de células somáticas (CCS), Contagem padrão em placas (CPP), gordura, proteína, ureia; Cama: umidade, temperatura superficial, temperatura a 30 cm de profundidade, pH, C, N, C:N; Contagem de microrganismos: *Staphylococcus* spp.; *Streptococcus* spp.; Enterobactérias; Contagem bacteriana total; Ambiente: temperatura e umidade relativa (UR) do ar.

Através da ACC, foi possível observar que o microclima teve efeito sobre as variáveis de cama em cerca de 77%. A temperatura ambiente afeta o desempenho do sistema CB e atua como um preditor da temperatura e umidade da cama (ECKELKAMP et al., 2016). A umidade é vista como um dos principais fatores de risco associado à ocorrência de mastite clínica em vacas alojadas em CB, e também pode aumentar a CCS.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As características FQ da cama de CB afetam a composição e a qualidade do leite em cerca de 63%, o que indica a importância do bom manejo de cama neste sistema, visando controlar a umidade (40-60%) para reduzir riscos em relação à sanidade da glândula mamária. Variações ambientais afetam a qualidade da cama em 77%, principalmente pela ação da UR do ar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ECKELKAMP, E. A et al. Sand bedded freestall and compost bedded pack effects on cow hygiene, locomotion, and mastitis indicators. **Livestock Science**, v. 190, p. 48–57, 2016. DOI: 10.1016/j.livsci.2016.06.004.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ASSOCIAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS CONTRA *Staphylococcus aureus* E *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

Gian Carlos Nascimento¹, Brenda Veridiane Dias², Melina Laura Moretti Pinheiro³, Rafael Bastos Teixeira⁴, Maria Aparecida V. P. Brito⁵, Ana Cardoso C. F. F. de Paula⁴

¹DeLaval, Jaguariuna, São Paulo, Brasil. ²Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais Brasil. ³Capebe, Boa Esperança, Minas Gerais, Brasil. ⁴Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia, Bambuí, Minas Gerais, Brasil. ⁵Embrapa Gado de Leite, Juíz de Fora, Brasil

INTRODUÇÃO

O surgimento de resistência antimicrobiana aos antibióticos comumente usados exigiu o desenvolvimento de novos produtos antimicrobianos que garantissem a eficácia do tratamento (Leite et al., 2019). Em adição a essa necessidade, um crescente interesse pelas plantas medicinais como agentes de novas moléculas bioativas contra bactérias foi relatado (Ribeiro et al., 2005).

A bioatividade das plantas medicinais é inerente a um grupo de compostos chamados metabólitos secundários. Estes são sintetizados a partir de reações catabólicas, anabólicas e da biotransformação a partir dos aminoácidos, carboidratos e lipídios produzidos pela planta e são diversos os extratos brutos que contém metabólitos com atividade antimicrobiana, e que podem, assim, inibir o crescimento bacteriano.

O *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, conhecido popularmente como barbatimão, se destaca por ser uma das plantas mais utilizadas nos tratamentos medicinais, o *Baccharis crispa* Spreng conhecido pelo nome de carqueja, é popularmente usado como anti-séptico e como antioxidante (Del Vitto et al., 2002), por sua vez, a *Azadirachta indica*, conhecida pelo nome Neem já teve diversos benefícios comprovados, como inseticida, fungicida, controladora de nematódeos, além de comprovada atividade antibacteriana contra algumas espécies (Abdullah; Subramanian, 2008).

Considerando o potencial dessas plantas medicinais e visando obter a maior atividade antimicrobiana possível, objetivamos com este trabalho avaliar a atividade de associações do extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (ESa), de *Baccharis crispa* (EBc) e do óleo de *Azadirachta indica* (OAi) frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina.

MATERIAIS E MÉTODOS

As plantas de barbatimão e carqueja foram coletadas em Bambuí-MG, e depositas no Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. O OAi foi adquirido da empresa Globo Agronegócios e Participações Ltda, que o extraiu das sementes por maceração a frio.

O ESa foi obtido por maceração estática de 428,57g de MS da casca moída em um litro de etanol, por 8 dias. O EBc foi preparado com a parte aérea da planta e foi obtido por decocção por 15min de 25g de MS moída para cada litro de água destilada. Os extratos foram filtrados em papel a vácuo e secos utilizando rotoevaporador e liofilizador.

As estirpes de *S. aureus* e *S. agalactiae* isolados de mastite bovina fazem parte da coleção da Embrapa Gado de Leite (local dos testes microbiológicos). A atividade antimicrobiana das associações foi realizada em triplicata em cavidades cortadas em ágar. Para *S. agalactiae* acrescentou-se 5% de soro equino desfibrinado ao ágar *Mueller Hinton*.

Em cada placa de Petri foram cortadas dez cavidades, uma destinada ao controle negativo, (DMSO e Tween 80) e outra ao controle positivo (Oxacilina 50µg/mL). Em cada cavidade foram inoculados 50µL das diferentes associações (1 a 5 - 6,5 mg/mL EBc e

doses crescentes de 2 mg/mL OAi, iniciando em 7,5 mg/mL; 6 a 11 - 4,5 e 8,5 mg/mL EBc, e 9,5 mg/mL de Oai nas associações 6 e 7, 7,5 mg/mL de Oai na 8 e 9 e 11,5 mg/mL na 10 e 11; ESa foi sempre fixado em 25 mg/mL – Tabela 1). As placas foram incubadas a 35 °C *overnight* e avaliadas pela medida do halo de inibição. A análise estatística foi realizada com o software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a eficácia das associações frente a *S. aureus*, foram mais eficientes as associações 11, 7 e 8, frente a *S. agalactiae* a mais eficiente foi a associação 11, seguida da 7. Algumas associações mostraram uma especificidade ao serem mais eficientes contra *S. agalactiae*. As associações 2, 3, 4, 7 e 9 não demonstraram essa característica (Tabela 1). Em um estudo dessa equipe *S. agalactiae* se mostrou mais resistente a ação dos extratos testados individualmente, sendo necessária uma concentração maior de extratos para inibir seu crescimento (dados ainda não publicados). Nesse sentido, evidenciamos um efeito sinérgico satisfatório dos extratos e do óleo utilizados, pois houve uma potencialização do efeito antimicrobiano após a associação. Outro ponto interessante é que todas as associações diferiram do controle negativo, ou seja, todas elas demonstraram uma determinada eficácia, mesmo nenhuma se igualando ao controle positivo.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana das associações dos extratos de *Stryphnodendron adstringens*, *Baccharis crispa* e do óleo de *Azadiractha indica*, representada pelo tamanho do halo de inibição de crescimento (mm) frente a *S. aureus* e *S. agalactiae* isolados de mastite bovina.

Tamanho do halo (mm) em relação as

Associações (mg/mL) ¹	estirpes bacterianas ²	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>
1 (25 ESa + 6,5 EBc + 7,5 OAi)	10,0 ^B	12,3 ^A
2 (25 ESa + 6,5 EBc + 9,5 OAi)	11,3	12,0
3 (25 ESa + 6,5 EBc + 11,5 OAi)	11,0	11,3
4 (25 ESa + 6,5 EBc + 13,5 OAi)	10,6	11,6
5 (25 ESa + 6,5 EBc + 15,5 OAi)	10,0 ^B	12,3 ^A
6 (25 ESa + 4,5 EBc + 9,5 OAi)	10,3 ^B	12,6 ^A
7 (25 ESa + 8,5 EBc + 9,5 OAi)	13,0 ^b	13,3 ^c
8 (25 ESa + 4,5 EBc + 7,5 OAi)	7,3 ^{Bd}	12,3 ^A
9 (25 ESa + 8,5 EBc + 7,5 OAi)	11,6 ^c	11,6
10 (25 ESa + 4,5 EBc + 11,5 OAi)	10,3 ^B	12,6 ^A
11 (25 ESa + 8,5 EBc + 11,5 OAi)	12,6 ^{Bb}	14,6 ^{Ab}
Controle Positivo (Oxacilina 50 µg/mL)	34,3 ^{Aa}	26,3 ^{Ba}
Controle Negativo (DMSO+Tween 80)	0,0 ^e	0,0 ^d

¹Médias seguidas de letras maiúsculas nas colunas diferem entre si pelo teste Tukey 5% (P<0,05).

²Médias seguidas de letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey 5% (P<0,05).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Comparando o efeito de inibição do crescimento bacteriano entre as associações contendo ESa associado ao EBc e ao OAi, conclui-se que os extratos possuem um efeito sinérgico relacionado com concentrações específicas de cada extrato e óleo testados. O OAi foi o componente que mais influenciou o efeito sinérgico bacteriostático contra as estirpes de *S. aureus* e *S. agalactiae* isoladas de mastite bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullah, F., Subramanian, P. The feeding response of *Epilachna indica* (Coleoptera: Coccinellidae Epilachninae) Towards Extracts of *Azadirachta indica*. **Journal of Entomology**, v.5, p.77-90, 2008.

Del Vitto, L. A., et al. Introducción a la Herboristería. **Serie Técnica Herbario UNSL**, p.10-61, 2002.

Leite, J. A., et al. Lytic bacteriophages as a potential alternative to control *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.54, p.1-9, 2019.

Ribeiro, A. Q., et al. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 65-70, 2005.

AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DIAGNÓSTICA DA PLACA ACCUMAST PLUS® PARA DETECÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR *Streptococcus agalactiae*

Fausto Ribeiro Fonseca¹, Lara Cristina Bastos Juliano¹, Miriam de Andrade Pereira², José Carlos de Figueiredo Pantoja¹

¹Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.

²Centro Universitário Vale do Rio Verde, Três Corações, Brasil

INTRODUÇÃO

Dentre os microrganismos causadores de mastite contagiosa, *Streptococcus agalactiae* ainda é um dos principais limitantes para a melhoria da qualidade do leite em países em desenvolvimento, devido à alta contagiosidade (Leelahapongsathon et al., 2016; Mesquita et al., 2019), e consequente impacto negativo na produção e qualidade de leite (Holmoy et al., 2019).

A *blitz terapia* é a estratégia de manejo mais eficaz para a erradicação de *S. agalactiae*, na qual todas as vacas infectadas são tratadas simultaneamente com antimicrobianos. Nessa estratégia, a forma mais comum para se diagnosticar infecções intramamárias por *S. agalactiae* é a cultura do leite realizada em laboratórios comerciais, para triagem periódica do rebanho e avaliação da cura bacteriológica após o tratamento com antimicrobianos (Keefe, 1997).

No entanto, devido à necessidade de envio ao laboratório e tempo de diagnóstico, o longo período para obtenção dos resultados (ao redor de 8 dias) torna-se um problema, devido ao risco de reinfecção nos lotes de animais submetidos ao tratamento. A adoção de novos métodos rápidos e acurados, tais quais a cultura do leite em meios cromogênicos realizada na fazenda, poderia contribuir para a diminuição do tempo de diagnóstico (18-24 horas) e aumento da eficácia dos programas de erradicação.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a acurácia diagnóstica da placa AccuMast Plus® (FERA Diagnostics and Biologicals, College Station, EUA) para detecção de mastite subclínica causada por *S. agalactiae*, a partir de amostras de leite de quartos mamários e compostas.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado entre agosto e dezembro de 2021, em cinco rebanhos em Minas Gerais, com histórico de mastite por *S. agalactiae*. Os rebanhos foram visitados uma única vez, nas quais amostras (15 mL) foram colhidas assepticamente de todos os quartos mamários de todas as vacas (N=118) elegíveis em lactação. As amostras foram mantidas refrigeradas até o cultivo, em até 4 horas após a colheita.

Seguindo instruções do fabricante, o quadrante da placa específico para *S. agalactiae* foi dividido em duas partes iguais, nas quais amostras de leite foram inoculadas com um *swab* estéril. As placas foram incubadas a 35-36°C durante 18-24 horas. Ademais, amostras compostas foram preparadas no laboratório pela mistura de 1 mL de leite de todos os quartos de uma vaca em um tudo estéril. As amostras compostas foram cultivadas na placa AccuMast Plus® como descrito anteriormente.

Para análise da acurácia diagnóstica, foram adotados dois pontos de corte: P1 (recomendado pelo fabricante): crescimento de ≥ 1 colônia azul e P2 (ponto de corte alternativo): crescimento de ≥ 1 colônia azul, branca ou lilás. Todas as placas foram lidas por dois autores do estudo.

Foi considerado padrão ouro o isolamento de *S. agalactiae* em placas de ágar sangue, confirmado com análise proteômica (MALDI-TOF MS). As amostras de leite de

quarto foram semeadas simultaneamente ao cultivo nas placas AccuMast Plus[®], em placas de ágar sangue (um quadrante por amostra), com swabs estéreis. As placas foram incubadas por 35-36°C durante 24 e 48 horas. Os isolados caracterizados como cocos Gram-positivos, catalase-negativos, foram encaminhados para confirmação diagnóstica por MALDI-TOF MS ao laboratório Qualileite (FMVZ, USP, Pirassununga, SP).

Foram estimadas a sensibilidade (SE), especificidade (ES), falso-negativos (FN), falso-positivos (FP), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). O coeficiente Kappa foi utilizado para estimar a concordância entre os observadores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base no padrão ouro, a prevalência encontrada de *S. agalactiae* nas amostras de quarto mamário foi de 18,44% (83/450). A concordância entre os observadores foi alta (Kappa =0,97), evidenciando a facilidade na leitura da placa cromogênica.

Com base no ponto de corte P1, os parâmetros de acurácia da placa AccuMast Plus[®], utilizando-se amostras de quarto, foram: SE=65,06% (54/83), ES=98,09% (360/367), VPP=88,52% (54/61) e VPN=92,54% (360/389). Para as amostras compostas, os parâmetros foram: SE=62,50% (25/40), ES=98,72% (77/78), VPP=96,15% (25/26) e VPN=83,70 (77/92).

Com base no ponto de corte P2, os parâmetros de acurácia da placa AccuMast Plus[®], utilizando-se amostras de quarto, foram: SE=74,70% (62/83), ES=98,09% (360/367), VPP=89,86% (62/69) e VPN=94,49% (360/381). Para as amostras compostas, os parâmetros foram: SE=80,00% (32/40), ES=98,72% (77/78), VPP=96,97% (32/33) e VPN=90,59% (77/85).

A sensibilidade observada em amostras de quarto e compostas resultou em 34,94% a 37,50% de resultados falso-negativos, respectivamente (P1) e 25,30% a 20,00%, respectivamente (P2), o que pode ser um fator limitante em programas de erradicação de *S. agalactiae*, devido à manutenção de animais infectados e não detectados pela cultura nas placas AccuMast Plus[®]. Estratégias como culturas seriadas ou aumento da área de cultivo na placa poderiam ser testadas em estudos futuros para aumento da acurácia diagnóstica.

É importante notar que foi observada grande variabilidade na SE da placa entre as fazendas estudadas. A SE mínima observada foi de 7,14% no P1 e 50,00% no P2 (Fazenda E) e a SE máxima observada foi de 85,71% em ambos P1 e P2, na fazenda A. Esses achados sugerem a investigação da hipótese de que diferenças genéticas entre cepas de *S. agalactiae* (e.g., diferenças em sorotipos) podem influenciar a probabilidade de crescimento ou produção da cor esperada no meio seletivo.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura de leite na placa AccuMast Plus[®] pode ser uma ferramenta utilizada em programas de erradicação de *S. agalactiae*. No entanto, a sensibilidade observada, assim como a proporção de resultados falso-negativos, indica que pode haver risco de não identificação (e conseqüente permanência do rebanho) de quartos mamários ou vacas infectadas com *S. agalactiae*. Alternativas como o uso de culturas seriadas ou cultivo em maior área do meio seletivo podem ser estudadas futuramente para melhoria da acurácia diagnóstica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Holmøy, I. H., et al. A cohort study of the effect of *Streptococcus agalactiae* on milk yield and somatic cell count in Norwegian dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, n.9, p.8385-8399, 2019.
- Keefe, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, v.38, n.7, p.429, 1997.

Leelahapongsathon, K., et al. Comparison of transmission dynamics between *Streptococcus uberis* and *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.2, p.1418-1426, 2016.

Mesquita, A. A., et al. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.39, p.308-316, 2019.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE MORTE PROGRAMADA-1 (PD1) E SEU LIGANTE (PD-L1) EM MACRÓFAGOS DESAFIADOS POR DISTINTOS ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES* ASSOCIADOS A VACAS LEITEIRAS

Sarah Veríssimo¹, José Ferronato², Ana Oliveira², Alice Della Libera², Sarne De Vlieghe³, Fernando Souza^{2,3}, Mônica Cerqueira¹

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

²Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ³M-team and Mastitis and Milk Quality Research Unit, Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um dos microrganismos mais importantes, devido à sua patogenicidade, mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, persistência no ambiente da vaca, colonização da pele e mucosas e baixa eficácia de cura com os tratamentos (Rainard et al., 2018). A glândula mamária, mesmo saudável, é suscetível à infecção, sugerindo que isolados de *S. aureus* estão bem adaptados a este nicho e podem causar infecções intramamárias persistentes. *Staphylococcus chromogenes* é o *Staphylococcus* não-*aureus* (SNA) mais frequentemente isolado de amostras de leite coletadas assepticamente e geralmente está associado a infecções intramamárias persistentes.

Nesse contexto, sabe-se que esses patógenos interferem na ação de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas, impedindo a sinalização necessária para a ativação da resposta imune adaptativa (Wang, Roderiquez e Norcross, 2012). Estudos recentes têm demonstrado a ação de moléculas co-supressoras, também conhecidas como *immunocheckpoints*, dentre as quais se destacam o receptor de morte celular programada (PD-1) e seus respectivos ligantes, como o PD-L1. A ativação de PD-1/PD-L1 afeta negativamente a função dos linfócitos T e seu desempenho contra infecções e lesões teciduais, devido à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Hartley et al. (2018) observaram que macrófagos com alta expressão de PD-L1 tiveram maior capacidade de proliferar, sobreviver e ativar após tratamento com anticorpo anti-PD-L1.

O objetivo deste estudo foi avaliar a indução da expressão de PD-1 e PD-L1 após infecção experimental com dois isolados diferentes de *Staphylococcus aureus* e dois isolados diferentes de *Staphylococcus chromogenes*.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, utilizamos dois isolados de *Staphylococcus aureus* isolados de swab nasal (SN) e de uma infecção intramamária subclínica persistente (IIM). Além disso, usamos dois *Staphylococcus chromogenes* originados do ápice do teto de novilha (TA) e de uma IIM persistente. Macrófagos murinos da linhagem 264.7 foram utilizados para infecção *in vitro* com cada uma das cepas de estafilococos. No presente estudo, foi utilizada a multiplicidade de infecção (MOI) de 1, 5 e 10, e dois tempos de incubação (3 e 6 horas) em sextuplicata. A viabilidade celular foi definida por dupla marcação com Anexina-V conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e 7-aminoactinomicina (7-AAD). Para avaliar a expressão de PD-1 e seu ligante PD-L1, foi empregado anticorpos monoclonais: *Rat Anti-Mouse* CD274 conjugado com ficoeritrina (PE; PDL1) e *Rat anti-Mouse* CD279 conjugado com alofocianina (APC; PD-1) e analisados por citometria de fluxo. O software *Flow Jo Tree Star* foi usado para analisar os dados.

Um controle sem coloração e amostras com coloração única também foram preparados como controles de compensação, além da estratégia *fluorescence menos one* (FMO). Os resultados foram avaliados pelos testes de homocedasticidade e normalidade. Medianas foram comparadas por análise de variância. As comparações foram feitas em dois níveis: nível I) efeito do tempo e efeito das bactérias e nível II) interação do efeito das bactérias e tempo, pelo programa InfoStat (Córdoba, Argentina).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, a infecção experimental pelos distintos isolados de estafilococos levou maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 que o controle (basal), sendo a maior porcentagem e intensidade de expressão observada na infecção pelos dois isolados de *S. aureus*, seguindo por *S. chromogenes* isolado de IM, e *S. chromogenes* isolados do ápice do teto ($P < 0,0001$). Curiosamente, a maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 foi observado logo no início da infecção (3 h) em relação a 6 h após a infecção ($P = 0,0003$). No início da infecção (3 h), maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 foram observadas nas infecções por *S. aureus* IM e *S. chromogenes* IM ($P < 0,0001$). Já com 6h de infecção, maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-1 foi observada na infecção por *S. aureus* SN ($P < 0,0001$). A expressão de PD-1 em macrófagos foi dose-dependente ($P < 0,0001$). Apenas *S. aureus* IM induziu maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1 em relação ao controle (basal) ($P < 0,0001$). Interessantemente, a maior porcentagem de macrófagos que expressam PD-L1 foi observado no início da infecção (3 h), e a expressão de PD-L1 foi dose-dependente ($P = 0,0003$). Portanto, o presente estudo demonstra o importante papel destes *immunocheckpoints* no mecanismo de evasão do sistema imune, no caso em macrófagos, pelos isolados de estafilococos que causam infecção intramamária persistente.

A viabilidade dos macrófagos foi maior na infecção por *S. aureus* IM e *S. chromogenes* IM ($P < 0,0001$). Foi observado maior viabilidade dos macrófagos nas infecções de 3 h que 6 h ($P < 0,0001$). A maior porcentagem de macrófagos viáveis foi com o menor MOI (MOI = 1; $P < 0,0001$).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstra claramente que os *immunocheckpoints* PD-1 e seu ligante (PD-L1) são importante estratégias de evasão do sistema imune, predispondo à persistência da infecção, com potencial inibição da resposta de macrófagos e potencialmente de células T que apresentam em conjunto papel fundamental na defesa da glândula mamária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hartley, G. P., et al. "Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation. **Cancer Immunology Research**, v. 6, n. 10, 2018.
- Rainard, P., et al. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p. 149–165, 2018.
- Wang, J., et al. Control of Adaptive Immune Responses by *Staphylococcus aureus* through IL-10, PD-L1 and TLR2. **Scientific Reports**, v. 2, n. 1, 2012.

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO SELETIVO DE VACAS SECAS COM SELANTE INTERNO DE TETO EM REBANHO LEITEIRO NO ESTADO DA PARAÍBA

Raphael Ordonho^{1,2}, Pedro Araújo¹, Hudson Correia¹, Clebson Sales¹, Márcia Guedes¹, Ewerton Lima^{1,2}, Fernando de Souza^{1,2,3}, Artur Fernandes^{1,2}.

¹Núcleo aplicado à Produção e Sanidade da Glândula Mamária, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil. ³Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite é uma das principais causas de prejuízos econômicos para os produtores leiteiros, pois diminui a produtividade, afeta a qualidade dos derivados lácteos e, em alguns casos, resulta no descarte de animais.

O momento crítico para a realização de tratamentos para essa enfermidade é no momento de secar as vacas, pois se trata de uma época propícia a novas infecções, podendo levar a ocorrência de casos de mastite no pós-parto. A fim de evitar a infecção, é comum a realização do tratamento de vaca seca, com o objetivo de reduzir a incidência de mastite no pós-parto. Contudo, não impede a apresentação da infecção após o parto, seja pela pouca concentração de antimicrobiano nos tetos, ou mesmo pela não formação do tampão de queratina no canal do teto.

Nesse contexto, o uso indiscriminado de antimicrobianos vem se tornando cada vez mais uma problemática, visto que induz o surgimento de resistência bacteriana. Logo, é importante a busca por soluções alternativas para reduzir a frequência do uso destes medicamentos, sendo uma delas o emprego do tratamento seletivo de vaca seca, por meio do uso de selante interno de teto, que forma uma espécie de tampão no teto, não permitindo a entrada de microrganismos no período seco, principalmente em vacas com baixo risco de infecção.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar a eficácia do uso de selante interno na prevenção de novas infecções intramamárias durante o período seco e pós-parto e um rebanho leiteiro no estado da Paraíba.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em uma propriedade leiteira com sistema semi-extensivo de criação, ordenha mecânica, com duas ordenhas diárias, rotina de higienização pré e pós ordenha com o uso de soluções pré-dipping e pós-dipping e diagnóstico de mastite por meio do teste da caneca telada diariamente e CMT mensalmente. Foram inicialmente utilizadas 20 vacas girolando em boas condições de saúde, não submetidas a tratamentos com antimicrobiano nos últimos 30 dias prévios ao experimento, com idade e número de lactações variadas, monitoradas quanto ao histórico de mastite clínica e subclínica durante a lactação para direcioná-las aos diferentes grupos experimentais. Todos os quartos foram submetidos ao teste da caneca de fundo escuro telada, CMT, análises microbiológicas e contagem de células somáticas individualmente. Os quartos mamários foram subdivididos em duas categorias considerando análise microbiológica e CCS: negativos na cultura microbiológica e CCS < 200.000 cel./mL, compondo o Grupo I e positivos com crescimento bacteriano na cultura e/ou alta CCS compondo o Grupo II. Na secagem, os animais passaram pelo método de secagem abrupta, de modo que neste dia, as vacas foram submetidas à ordenha mecânica, seguida da ordenha manual a fim de atingir o esgotamento completo do quarto mamário, após isto, realizou-se a aplicação de solução pré-dipping, secagem dos tetos com papel e assepsia do esfíncter do teto com algodão embebido em álcool a 70%. De acordo com as análises de duas culturas negativas acompanhadas de baixa CCS, foram selecionados os tetos para o tratamento I (TI):

Selante interno de tetos à base de subnitrato de bismuto em um total de 4g, e tratamento II (TII): Aplicação de antimicrobiano formulado para aplicação intramamária em vacas secas. Cada quarto mamário foi considerado individualmente para a escolha dos tratamentos. Por fim, foi considerada a frequência de mastite no pós-parto nos grupos avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram analisadas amostras de leite de 79 tetos, das quais 53% (42/79) apresentaram CCS acima de 200 mil células/mL. Contudo, foram efetivamente monitorados desde a pré-secagem até o pós-parto 52 tetos, dentre os quais 46,15% (24/52) foram alocados no Grupo I e 53,84% (28/52) no Grupo II. Neste universo amostral, seis tetos do Grupo II apresentaram mastite no pós parto, enquanto não houve casos nos tetos do Grupo I.

Os resultados acima sugerem que o selante interno apresenta eficácia na prevenção de infecções intramamárias no período seco e pós-parto, impedindo a entrada de patógenos causadores da mastite. Porém, é fundamental uma avaliação prévia dos animais no início do período seco, monitoramento periódico e controle dos casos de mastite contagiosa e ambiental, para se estabelecer o tratamento seletivo de vaca seca, visto que tetos em que não há infecções pré-estabelecidas e onde não são observados parâmetros que sugiram risco como a CCS < 200 mil células/mL e cultura negativa, apenas o uso do selante seria eficaz, enquanto que em tetos infectados, o uso de antimicrobianos seria necessário para evitar a ocorrência de mastite no pós-parto.

Carneiro Filha et al., (2006) foram precursores na avaliação da eficácia do selante e constataram que não houve diferença notável entre o uso de selante interno, antibioticoterapia e associação dos dois protocolos para tratar vacas, assim como não teve diferença entre os protocolos para taxa de cura dos tetos em animais que possuíam infecções pré-existentes. Contudo, é importante levar em consideração a situação sanitária do rebanho e também individual dos animais para que não ocorra o uso indiscriminado de antimicrobianos em casos não indicados.

O selante além de diminuir o uso indiscriminado dos antimicrobianos também impacta no aspecto econômico, pois o custo total do tratamento do rebanho tem queda devido ao preço do selante ser menor que os antimicrobianos, bem como, reduz a incidência de bactérias resistentes, já que o menor uso dessa medicação acarreta numa seleção de microbiota mais branda. No presente estudo dos 52 tetos efetivamente avaliados é possível perceber que 88,5% (46/52) poderiam não ter sido submetidos a antibioticoterapia de forma desnecessária.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do selante interno no tratamento seletivo de vaca seca demonstrou considerável capacidade de controlar e inibir casos de mastite. Porém, vale salientar que o uso desta alternativa ainda não é viável para todos os produtores, visto que a necessidade das análises microbiológicas e da CCS individual podem gerar resistência na adesão dos produtores ao uso do selante interno. Adicionalmente, foi visto que para a técnica ser exequível, faz-se necessário controlar inicialmente os casos de mastite, sobretudo a contagiosa, e da CCS no rebanho, para que o mesmo esteja apto a implementação desta alternativa de tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Carneiro Filha, D. M. V. **Efeito do uso de um selante interno de tetos na profilaxia de novas infecções intramamárias durante o período seco e no pós-parto.** 65 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2006.

AVALIAÇÃO IMUNOMETABÓLICA DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS POR DISTINTOS ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *STAPHYLOCOCCUS CHROMOGENES* ASSOCIADOS A VACAS LEITEIRAS

Sarah Veríssimo¹, José Ferronato², Ana Oliveira², Alice Della Libera², Sarne De Vlieghe³, Fernando Souza^{2,3}, Mônica Cerqueira¹

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. ²Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ³M-team and Mastitis and Milk Quality Research Unit, Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é o patógeno mais importante da mastite, devido à sua patogenicidade, mecanismos de evasão e por ser um patógeno multi-hospedeiro, dificultando seu controle e erradicação (Richardson et al., 2018). *Staphylococcus chromogenes* é o *Staphylococcus* não-*aureus* (SNA) mais frequentemente isolado de amostras de leite bovino coletadas assepticamente, o que pode levar a infecções persistentes (Supré et al., 2011).

Em razão disso, é necessário melhorar a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que regulam a defesa inata e adaptativa do hospedeiro contra os patógenos da mastite (Bagnoli et al., 2018). Sabe-se que a glândula mamária saudável possui distintas populações leucocitárias presentes, entre estas, destacam-se os macrófagos, que representam a população leucocitária predominante no leite de glândulas mamárias sadias (Souza et al., 2020). Portanto, essas células são as primeiras a combater patógenos invasores, desempenhando papel crucial na imunidade inata e adaptativa do úbere.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação do imunometabolismo por diferentes isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus chromogenes* associados a vacas leiteiras numa infecção experimental macrófago-bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, utilizamos dois isolados de *Staphylococcus aureus*, um isolado de swab nasal (SN) e um de infecção intramamária subclínica persistente (IIM). Além disso, usamos dois *Staphylococcus chromogenes*, um originado do ápice do teto de novilha (TA) e outro de IIM persistente. Macrófagos murinos da linhagem 264.7 foram utilizados para infecção *in vitro* com cada uma das cepas de estafilococos. A infecção *in vitro* por 90 e 180 min utilizando a multiplicidade de infecção (MOI) de 1 (1 bactéria por célula). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para determinação da concentração de óxido nítrico (NO). A dosagem de óxido nítrico (NO) foi determinada pela reação de Griess. As expressões dos genes: interleucina 1 β (*IL-1 β*), interleucina 18 (*IL-18*), arginase 1 (*Arg1*), Domínio Pirin da Família NLR contendo 3 (*NLRP3*), óxido nítrico sintase 2 (*Nos2*), BCL2 associado X, regulador de apoptose (*Bax* e *Bcl2*) foram avaliadas por qPCR. A quantificação relativa da expressão de RNA mensageiro foi determinada usando a comparação do ciclo *Threshold* do gene alvo com o gene β -actina, como controle interno.

Antes de iniciar as análises foi verificado a normalidade e homocedasticidade das variáveis, utilizando os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk respectivamente. Medianas foram comparadas por análise de variância. as variáveis foram comparadas pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis para os resultados de qPCR, e para os resultados de óxido nítrico foi utilizado o teste de Friedman, todos a um nível de significância (α) de 0,05. As

comparações foram feitas em dois níveis, sendo o nível 1, efeito tempo e efeito bactéria isoladamente, e o nível 2, interação do efeito bactéria e tempo. O programa estatístico usado foi o *InfoStat* (Córdoba, Argentina).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo, a expressão de *iNOS* não diferiu entre os isolados ($P = 0,08$). No entanto, maior expressão relativa do gene *iNOS* foi encontrada após 180 min de infecção ($P < 0,0001$). Apesar do comportamento semelhante entre os distintos isolados de estafilococos logo no início da infecção (90 min), após 180 min ficou evidente a maior expressão relativa do gene *iNOS* na infecção por estafilococos isolados de infecções intramamárias persistente ($P < 0,0001$). Os isolados de *S. chromogenes* levaram à robusta produção de NO, seguido por *S. aureus* SN. *Staphylococcus aureus* IIM levou à menor produção de NO, porém discretamente maior que o controle basal ($P < 0,0001$). Além disso, a produção de NO foi maior em 180 min ($P < 0,0001$). *Staphylococcus aureus* SN foi o único isolado que levou à maior expressão relativa do gene arginase ($P = 0,0006$).

S. aureus SN foi o que levou à maior expressão relativa do gene *NLRP3* por macrófagos dentre os estafilococos ($P < 0,0001$), e a expressão relativa do gene *NLRP3* foi maior logo no início da infecção ($P = 0,0001$). *Staphylococcus aureus* IM foi o único isolado de estafilococos que levou à menor expressão relativa do gene *NLRP3* por macrófagos após 180 min de infecção quando comparado com 90 min ($P < 0,0001$), demonstrando a possibilidade de evasão deste isolado. A expressão relativa do gene *IL-1 β* por macrófagos foi menor na infecção experimental por *S. chromogenes* IM ($P < 0,0001$). Além disto, a expressão relativa do gene *IL-1 β* por macrófagos foi maior aos 180 min de infecção do que em 90 min ($P < 0,0001$).

A expressão do gene *Bax* em macrófagos foi maior na infecção por *S. aureus* do que *S. chromogenes* ($P < 0,0001$). Ainda, a expressão de *Bax* foi maior após 180 min ($P < 0,0001$). A expressão do gene *Bcl2* foi maior por *S. aureus* SN do que por *S. chromogenes* TA ($P = 0,03$). Somado a isso, a expressão do gene *Bcl2* foi maior após 180 min ($P < 0,0001$).

Pode-se observar que os macrófagos foram polarizados, devido à alta expressão de *iNOS* e expressam positiva de arginase. A indução de arginase foi maior que a de *iNOS*, dificultando a resolução da infecção, nos isolados de *S. aureus*. *S. chromogenes* TA demonstrou capacidade de degradação de NO ao longo da infecção, sugerindo um potencial profilático deste isolado em desordens inflamatórias. No desafio com os diferentes isolados foi observado a ativação do inflamassoma, mas nenhum destes levou a expressão do mRNA da IL-18, sugerindo que o cromossomo não foi estimulado.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, o presente estudo enfatiza a complexidade da relação patógeno-hospedeiro, e que a indução da resposta inflamatória na infecção experimental de macrófagos é cepa dependente, e mecanismos de evasão, seja pela inibição da produção de NO ou do inflamassoma, da resposta dos macrófagos pode ser um importante passo para o estabelecimento da infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bagnoli, F., et al. *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*, ed. 1, **Springer**, 2018.
- Souza, F.N., et al. Immune response in nonspecific mastitis: What can it tell us? **Journal of Dairy Science**, v.103, n. 6, p. 5376-5386. 2020.
- Richardson, E., et al. Gene exchange drives the ecological success a multi-host bacterial pathogen. **Nature Ecology & Evolution**, v. 2, n. 9, p. 1468-1478, 2018.

Supré, K., et al. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.2329-2340, 2011.

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AGENTES BACTERIANOS CAUSADORES DE MASTITE EM AMOSTRAS DE LEITE E CAMA EM REBANHO BOVINO LEITEIRO

Silvio Luís Marsiglio Minarelli¹, Elis Lorenzetti¹, Kamilla Bleil do Carmo², Laura Dametto Endele²

¹Universidade Estadual de Londrina. ²Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia.

INTRODUÇÃO

Em 2020, o rebanho bovino brasileiro contava com 187,55 milhões de cabeças, e no mesmo ano produziu 24,95 bilhões de toneladas de leite. Entretanto, a produção leiteira encara o desafio causado pela mastite, que gera grandes prejuízos econômicos diretos e indiretos. A mastite possui caráter multietiológico e multifatorial e caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária causando alterações físico-químicas no leite.

A mastite ocasionada por micro-organismos pode ser classificada em ambiental e infecciosa, sendo os agentes etiológicos *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Mycoplasma* spp., e *Corynebacterium bovis* mais prevalentes nos casos de mastite infecciosa e *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, fungos, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* mais prevalentes nos casos de mastite ambiental.

A prevenção e o controle da mastite são de extrema importância para obtenção de leite com qualidade e devem ser baseados em medidas preventivas, tais como: limpeza e desinfecção de instalações, fômites e tetos (*pré* e *pós-dipping*), além da identificação de animais infectados e de micro-organismos causadores da doença.

Este relato de caso descreve a avaliação microbiológica de amostras de leite e de cama de um rebanho bovino leiteiro, a fim de verificar se os casos subclínicos e/ou clínicos de mastite nestes animais têm relação com a microbiota da cama.

MATERIAL E MÉTODOS

O rebanho avaliado continha 23 vacas em lactação que eram submetidas a duas ordenhas diárias (com *pré* e *pós-dipping*) e com produção média de 25 litros de leite vaca/dia. As vacas permaneciam em barracão com 20 camas de serragem (*free stall*), sendo que a reposição da cama era realizada quinzenalmente e a limpeza do barracão diariamente.

A contagem de células somáticas (CCS) era realizada mensalmente e as amostras que apresentaram contagem superior à 200.000 células/ml eram colhidas após o *pré-dipping*. A amostra era composta por um *pool* de leite dos quatro quartos mamários. Este *pool* foi semeado por estrias de esgotamento em ágar sangue bovino 5% e ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas em condições de aerobiose. Posteriormente, as vacas cujas amostras de leite apresentaram crescimento microbiano foram submetidas ao *California Mastitis Test* e os quartos mamários que apresentaram alteração foram submetidos a uma coleta individual e, estas amostras, foram cultivadas nas condições citadas acima.

Amostras de cama foram coletadas uma vez por mês durante quatro meses utilizando a metodologia de amostragem sistemática (uma a cada cinco camas) em diferentes pontos e profundidades, totalizando quatro amostras por coleta, compondo um *pool* por mês. Para compor o *pool* foi utilizado 2,5g de cada amostra totalizando 10g, este era adicionado em 90ml de água peptonada a 0,1% e homogeneizado por um minuto. Após dois minutos de repouso uma alíquota de 100 µL do sobrenadante era retirado para realizar diluições seriadas na base 10 (10^{-1} a 10^{-6}). Uma alíquota de 100µL de cada diluição era semeada pelo método de *spread plate* em placas de ágar sangue bovino 5% e ágar MacConkey e incubadas nas mesmas condições que as amostras de

leite. Para caracterização dos micro-organismos foram utilizadas as placas que apresentavam de 30 a 300 unidades formadora de colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 39 amostras, quatro amostras de cama de serragem e 35 amostras de leite (23 coletadas a partir da CCS e 12 a partir do crescimento microbiológico). Com relação às 35 amostras de leite, em 14 (40%) foram isoladas *Staphylococcus* spp., em 4 (11,43%) *Staphylococcus* spp. hemolíticos coagulase negativa, em 1 (2,86%) *Staphylococcus aureus*, em 1 (2,86%) *Micrococcus* spp. e em 1 (2,86%) *Streptococcus* spp., sendo que 14 (40%) amostras não apresentaram crescimento. Quanto à análise das amostras de cama, após cultura e isolamento bacteriano, todas as amostras apresentaram crescimento de bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.

A mastite causada por *Staphylococcus* spp. é comumente relatada em rebanhos bovinos leiteiros no Brasil. Käfer e colaboradores (2020) descreveram prevalência de 60% (9/15) deste agente etiológico em um rebanho bovino leiteiro proveniente do estado do Rio Grande do Sul, apontando uma prevalência de *Staphylococcus* spp superior a encontrado neste estudo.

Almeida e colaboradores (2021) conduziram um estudo em Santa Catarina, com um rebanho bovino leiteiro que apresentava quadros clínicos e subclínicos de mastite, onde foi verificada prevalência de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. (11/26; 42,31%), *Streptococcus* spp. (5/26; 19,23%), *Escherichia coli* (3/26; 11,54%), *Enterobacter* sp. (3/26; 11,54%), *Corynebacterium* sp. (2/26; 7,69%), *Bacillus* sp. (1/26; 3,85%) e levedura (1/26; 3,85%). Ainda neste estudo, dentro do gênero *Staphylococcus* foram identificados *Staphylococcus chromogenes* (4/11), *Staphylococcus aureus* (3/11), *Staphylococcus* coagulase negativa (3/11) e *Staphylococcus haemolyticus* (1/11), e quanto ao gênero *Streptococcus* foi encontrado *Streptococcus agalactiae* (3/5), *Streptococcus uberis* (1/5) e *Streptococcus bovis* (1/5).

Zimmerman e Araujo (2017) analisaram 44 amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica provenientes do estado do Paraná e dentre as amostras houve crescimento de 53 padrões de colônia, com predomínio de *Staphylococcus* spp. (43,40%; 23/53), seguido de *Streptococcus* spp. (24,53%; 13/53) e, em menores proporções de *Enterococcus* spp. (9,43%; 5/53), *Bacillus* spp. (7,55%; 4/53), *Corynebacterium* spp. (7,55%; 4/53), *Escherichia coli* (3,77%; 2/53), *Yersinia* spp. (1,89%; 1/53) e *Klebsiella* spp. (1,89%; 1/53).

Estudos prévios conduzidos por Almeida e colaboradores (2021) e Zimmerman, Araujo (2017) evidenciaram maior diversidade de agentes etiológicos, bem como uma maior frequência de ocorrência dos mesmos.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente relato de caso demonstra que, na propriedade onde foi realizado o estudo, os micro-organismos presentes na cama de serragem das vacas não são os mesmos agentes etiológicos identificados nos casos de mastite. Portanto, não houve interação, o que demonstra que o manejo sanitário (limpeza diária) e a reposição quinzenal de serragem na cama têm sido eficientes para reduzir o risco de infecção dos animais pelos agentes etiológicos presentes na mesma.

REFERÊNCIAS

- Almeida, M.; Piaia, N.; Baldo, W.G.; Favero, J.F. **Principais agentes causadores de mastite clínica e subclínica em vacas leiteiras da região oeste de Santa Catarina.** Pubvet, v.15, n.11, p.180, 2021.
- Käfer, A.; Bettencourt, A. F.; Dias Da Rosa, F.; Scherer, N. P.; Martins, A. A.; Segabinazzi, L.R. **Identificação dos agentes causadores de mastite em uma**

propriedade familiar especializada em produção de leite. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v.10, n.2, mar., 2020.

Zimmermann, K.F.; Araujo, M.E. M. **Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos.** Revista de Campo Digital, v.12, n.1, 2017.

BOVINE-ASSOCIATED STAPHYLOCOCCI AND MAMMALIICOCCI TRIGGER TLYMPHOCYTE PROLIFERATIVE RESPONSE AND CYTOKINE PRODUCTION DIFFERENTLY

José Augusto Ferronato¹, Fernando Souza¹, Kamila Santos¹, Marcos Bryan Heinemann², Eduardo Ramos-Sanchez³, Bruno Toledo-Silva⁴, Sarne De Vlieghe⁴, Alice Della Libera¹

¹Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil. ³Laboratório de Sorologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, Brasil. ⁴M-team *and* Mastitis and Milk Quality Research Unit, Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgium

INTRODUCTION

Staphylococcus and *Mammaliococcus* (formerly *Staphylococcus*; Madhaiyan et al., 2020) species are part of the skin microbiota of mammals and have been isolated from various body sites of dairy cows and from the dairy environment. They are also the most common cause of bovine intramammary infection (IMI). Bovine non-*aureus* staphylococci and *Mammaliococci* (NASM) are a heterogeneous group of bacteria that cover a broad range of ecological habitats, varying from primarily the environment of dairy cows (e.g., *Mammaliococcus fleurettii*) to the cows' udders (e.g., *Staphylococcus chromogenes*) (Piessens et al., 2011).

There is a gap in our understanding on how distinct *Staphylococcal* and *Mammaliococcal* species and strains orchestrate the host immune response, and even the potentially parity-related responses, in the clearance of mastitis pathogens. T- and B-lymphocytes play a central role in cellular and humoral immunity of the mammary gland, as they are capable of either eliminating pathogens through direct cytotoxicity, production of antibodies and cytokines, activation of macrophages or the recruitment of neutrophils. For instance, lymphocytes produce cytokines such as interleukin (IL)-17A and interferon- γ (IFN- γ) that are critical mediators of the defense of the bovine mammary gland (Rainard et al., 2020).

Thus, we investigated (1) the *in vitro* blood-derived B- and T-lymphocyte proliferative responses and (2) the production of IL-17A and interferon- γ (IFN- γ) by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by distinct *Staphylococcal* and *Mammaliococcal* strains in nulliparous, primiparous and multiparous dairy cows.

MATERIALS AND METHODS

We used two distinct strains of *S. aureus*, the first isolated from a persistent subclinical IMI and the other isolated from a nose. We also included two dissimilar *S. chromogenes* strains originated from a persistent IMI (IM) and from teat apex (TA), and one strain of *Mammaliococcus fleurettii* (MF) isolated from sawdust on a dairy farm. Peripheral blood samples were from 18 clinically healthy Holstein. These animals were divided as follows: six nulliparous, six mid-lactating primiparous and six mid-lactating multiparous. For lymphocyte proliferation, the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll-Paque™ Plus® following the manufacturer's instructions. Peripheral blood mononuclear cells (2×10^5 cells per well) were cultured in triplicate for 72 h at 37 °C in a 5% CO₂ incubator in the presence of different potential mitogens: (1) Concanavalin A type IV-S (Con-A, cat. n. C0412-5MG, Sigma-Aldrich, St.

Louis, USA; 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (2) Phytohemagglutinin M-form (PHA-M, cat. n.10576015, GIBCO - Life Technologies, Grand Island, USA) with (3) the five heat-killed Staphylococcal and Mammaliicoccal strains (MOI = 10) or (4) without stimuli (baseline).

After 72 h, the supernatant was collected and stored at - 80 °C for further processing for measurement of cytokines (i.e.: IFN- γ and IL-17-A). After incubation of PBMCs, the subpopulations of lymphocytes CD3, CD4 and CD8, and CD21 was analyzed by flow cytometry, and data was analyzed with FlowJo software. IL-17A and IFN- γ quantification from the supernatant was performed using commercial bovine ELISA kits. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9.4. First, the outcome variables were tested for normality of the distribution. Outcome variables that were not normally distributed were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by the StudentNewman-Keuls test. The interaction terms between parity and the stimuli were never significant. $P \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

In the study, PHA-M behaved as a specific mitogen for T lymphocytes (CD3⁺), in contrast to Con-A. The T-lymphocyte (CD3⁺), T CD4⁺ and T CD8⁺ stimulated with ConA, PHA-M and *S. aureus* isolated from a persistent IMI was higher than the baseline control. Furthermore, a tendency toward an overall higher proliferative response of Tlymphocytes (CD3⁺) in primiparous cows than multiparous cows ($P = 0.06$) was observed. In addition, the T CD4⁺ and T CD8⁺ proliferative response was higher in primiparous cows than multiparous ($P = 0.03$ and $P = 0.05$, respectively) dairy cows. Multiparous cows had a higher B-lymphoproliferative response than primiparous ($P < 0.0001$) and nulliparous ($P = 0.007$) ones. Furthermore, nulliparous dairy cows had a higher B-lymphocyte proliferation than primiparous ($P < 0.0001$) cows.

The IL-17A production by lymphocytes was higher under *S. aureus* originating from a persistent IMI and *S. chromogenes* IM compared with the unstimulated control. Higher levels of IL-17A were also found in multiparous than in primiparous ($P = 0.016$) and nulliparous ($P = 0.0007$) cows, over all stimuli. The IFN- γ production by lymphocytes was higher than unstimulated control when stimulated with *S. aureus* originating from an IMI and *S. chromogenes* IM. Also, higher levels of IFN- γ were found in multiparous cows than primiparous ($P = 0.004$) and nulliparous ($P = 0.002$) ones, over all stimuli.

It is conceivable that the ancient co-evolution of hundreds of microorganisms and the host immune system will lead to the development of sophisticated immune controls that can distinguish between pathogenic bacteria and beneficial commensal microorganisms (Littman et al., 2011). In this scenario, it is widely accepted that commensal bacteria build up mechanisms to maintain tolerance towards commensal organisms, which in turn suppress T-lymphocyte proliferation (Dowling et al., 2018). In this context, there is growing evidence that a core bovine mammary gland microbiome exists, in which staphylococci emerge as a protagonist (Porcellato et al., 2020). Furthermore, apart from the four other NASM strains, the *S. chromogenes* IM strain induced a substantial production of IL-17A and IFN- γ , comparable to the *S. aureus*.

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

A notable differential in blood T-lymphocyte proliferation between a pathogenic *S. aureus* strain and so-called "commensal" *S. aureus* strain and well-studied NASM strains was revealed. Our findings also support the concept that one *S. chromogens* strain induces a protective host defense mechanisms in the bovine mammary gland. Beyond that, parity has a significant impact on T- and B-lymphocyte proliferation in addition to the production of critical cytokines. Finally, we demonstrated that, in contrast

to Con-A, which is widely used, PHA-M is more appropriate for use as a selective bovine T-lymphocyte mitogen.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- Dowling, M.R., et al. Regulatory T Cells Suppress Effector T Cell Proliferation by Limiting Division Destiny. **Frontiers in Immunology**, v. 9:2461. 2018.
- Littman, D.R., Pamer, E.G. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. **Cell Host & Microbe**. 10(4):311-23. 2011.
- Piessens, V., et al. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus species* from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of Dairy Science**, v. 94:2933-2934. 2011.
- Porcellato, D., et al. A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. **Scientific Reports**. 10(1):21608. 2020.
- Rainard, P., et al. Type 3 immunity: a perspective for the defense of the mammary gland against infections. **Veterinary Research**, v, 51(1):129. 2020.

CAPACIDADE DE DIFERENTES ESPÉCIES ESTAFILOCÓCICAS DE RESISTIR À FAGOCITOSE E PRODUÇÃO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS DE OVELHAS SANTA INÊS

Michele Flávia Sousa Marques¹, Guilherme Santana de Moura¹, Kamila Reis Santos², José Augusto Ferronato², Alice Maria Melville Paiva Della Libera², Ronaldo Gomes Gargano², Rinaldo Aparecido Mota¹, Fernando Nogueira de Souza^{2,3}

¹Laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil. ²Veterinary Clinical Immunology Research Group, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. ³Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Brasil

INTRODUÇÃO

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNL) correspondem às células do sistema imune com importante capacidade fagocítica na defesa do organismo animal contra a invasão por patógeno. Deste grupo, os neutrófilos se destacam pela capacidade de identificar e eliminar microrganismos invasores de maneira rápida e eficaz, capazes de modular a resposta imunológica e desencadear cascatas inflamatórias (Loote *et al.*, 2017).

Embora seja claro o conhecimento de que os PMNL formem a primeira linha de defesa celular do hospedeiro contra patógenos causadores da mastite (Paape *et al.*, 2003), pouco se sabe sobre as variações entre as distintas espécies e estirpes de estafilococos, especialmente os estafilococos não-aureus e mammaliococos (NASM), em sua capacidade de resistir e evadir os PMNL em ovinos.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* compreendem a principal causa de mastite ovina. Dentre as espécies, *S. aureus* é um patógeno com perfil predominantemente contagioso e está associado a forma mais grave de mastite (mastite gangrenosa), representando risco de perda da glândula mamária e à vida da matriz. Por outro lado, o grupo diversificado de estafilococos não-aureus e *Mammaliococcus* spp. (NASM) é o mais comumente isolado de amostras de ovelhas (Vasileiou *et al.*, 2019).

Objetivamos avaliar a capacidade de distintas espécies de estafilococos associados a ovinos de resistir à fagocitose e inibir a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio por PMNL sanguíneos de ovelhas da raça Santa Inês primíparas e múltíparas.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos 24 amostras de sangue periférico de 12 ovelhas da raça Santa Inês (6 primíparas e 6 múltíparas). Clinicamente sadias na coleta. As amostras foram coletadas em um tubo a vácuo com heparina e em outro sem anticoagulante (4 mL cada) para obtenção do soro para a pré-opsonização bacteriana.

Utilizamos 25 isolados bacterianos correspondendo a sete espécies de *Staphylococcus*, de diferentes nichos (Mastite subclínica-MS, clínica-MC, Pele de teto-P e Tonsila de borrego-T): 5 *S. aureus* (1 MS, 2 MC, 1P, 1T), 3 *Staphylococcus chromogenes* (1MS, 1MC, 1P), 1 *Staphylococcus devriesi* (MS), 4 *Staphylococcus haemolyticus* (1MS, 1MC, 1P, 1T), 6 *Mammaliococcus sciuri* (anteriormente *Staphylococcus sciuri*; 3 MS, 1C, 1P, 1T), 4 *Staphylococcus simulans* (1MS, 1MC, 1P, 1T) e 2 *Staphylococcus xylosum* (1MS, 1P).

Para obtenção do soro ovino, as amostras sem anticoagulante foram centrifugadas a 3.400 rpm por 15 min. O sistema complemento do soro ovino autólogo foi inativado por tratamento térmico (incubação por 30 min. a 56°C). Posteriormente, as bactérias foram opsonizadas segundo Barrio *et al.* (2000).

A produção de ERO intracelular foi avaliada usando bactérias vivas por citometria de fluxo usando o diacetato de 2', 7'' - diclorofluoresceína (DCFH-DA) como sonda segundo Souza *et al.* (2022).

O ensaio de fagocitose com bactérias opsonizadas e não opsonizadas foi realizado segundo Della Libera *et al.* (2015), usando bactérias vivas marcadas com éster succinimidílico da carboxifluoresceína (CFSE), como descrito por Vander Top *et al.* (2006).

A população de PMNL foi identificada pelo tamanho celular (dispersão direta) e granularidade celular (dispersão lateral) por meio da citometria de fluxo (Swain *et al.*, 2015).

Para as leituras das amostras utilizamos citômetro de fluxo FACSCalibur™ com lasers de argônio (excitação 488 nm) e diodo (excitação 635 nm). O software FlowJo foi usado para analisar os dados, e a análise estatística foi conduzida utilizando dois programas estatísticos, o SAS OnDemand (SAS Institute., Cary, NC) e o SPSS (versão 20, IBM. Armonk NY).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a fagocitose de *S. aureus* e do grupo NASM percebeu-se que o grupo NASM apresentou maior GMFI e maior porcentagem de fagocitose do que o *S. aureus*, em ovelhas múltiparas. NAS e *S. aureus* foram mais fagocitados nos grupos opsonizados.

Avaliando a média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) para a fagocitose das diferentes espécies estudadas, *S. chromogenes* foi o isolado mais fagocitado. Considerando o efeito parto, houve diferença estatística ($P = 0,0006$) entre ovelhas primíparas e múltiparas, estas fagocitaram mais quando estimuladas por *S. aureus* e, as primíparas fagocitaram mais quando estimuladas por *S. haemolyticus*. Considerando as médias percentuais, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *M. sciuri* e *S. aureus* tiveram maior fagocitose opsonizada do que não opsonizada.

Considerando a porcentagem de produção intracelular de ERO por PMNL do sangue de ovelhas, houve efeito parto ($P = 0,012$), entre primíparas ($99,79 \pm 0,03$) e múltiparas ($99,88 \pm 0,01$). As ovelhas múltiparas desafiadas com *M. sciuri* produziram uma porcentagem maior de ERO do que as ovelhas primíparas, por exemplo.

Os PMNL de ovelhas múltiparas fagocitaram mais no grupo opsonizado do que as primíparas, sugerindo que as múltiparas são mais eficientes em debelar as infecções por estafilococos, provavelmente por já terem sido desafiadas em algum momento de suas vidas.

Nossos resultados mostraram que a opsonização impactou de forma positiva o percentual de fagocitose de todos os isolados, exceto quando utilizamos *S. Devriesi*. Sabe-se que a opsonização não é obrigatória para a ocorrência do processo de fagocitose, no entanto, ela potencializa substancialmente e são dependentes da bactéria alvo (Van Kessel *et al.*, 2014).

Observamos que *S. Chromogenes* foi mais fagocitado por PMNL que *S. Aureus* e demais espécies de NASM ($P=0,0006$), sugerindo que estas espécies foram capazes de evadir à resposta neutrofílica. *S. aureus* é conhecido por desafiar a eficácia dos neutrófilos e é conhecido por sua capacidade de evadir a fagocitose (Guerra *et al.*, 2017). Pouco se sabe sobre essas características relacionadas aos NASM.

Em nosso estudo nenhuma espécie inibiu a produção de ERO, pois todas elevaram a produção a níveis maiores ou foram semelhantes ao do controle não estimulado. Percebemos que *S. haemolyticus* induziu menor produção de ERO quando comparado ao *M. sciuri* que foi o patógeno com maior porcentagem de produção de ERO em ovelhas primíparas, informação importante para relacionar espécie à resposta inflamatória. Considerando que os níveis de ROS podem ditar uma variedade de vias de sinalização celular que medeiam processos patológicos, incluindo a inflamação (Dupré-Crochet *et al.*, 2013).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo demonstrou que a heterogeneidade das espécies de *Staphylococcus* e *Mammaliococcus* pode impactar a resposta do hospedeiro, que pode estar relacionada com a evasão do processo de fagocitose por PMNL, podendo refletir no processo inflamatório e na gravidade da infecção. Reforçamos assim, a importância de estudos considerando as espécies e suas características para o entendimento das doenças associadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrio, B. *et al.* Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. **Veterinary Research**, nov. 2000. v. 31, n. 6, p. 603–609. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/vetres:2000143>>.
- Dupré-Crochet, S.; Erard, M.; Nübe, O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 94, p. 1–14, 2013. DOI: 10.1189/jlb.1012544.
- Guerra, F. E. *et al.* Epic immune battles of history: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2017. v. 7, n. JUN, p. 1–19.
- Libera, Alice Maria Melville Paiva DELLA *et al.* Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. **Veterinary Research**, 2015. v. 46, n. 1, p. 1–8.
- Lodge, K. M. *et al.* Hypoxic regulation of neutrophil function and consequences for *Staphylococcus aureus* infection. **Microbes and Infection**, 2017. v. 19, n. 3, p. 166–176. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.005>>.
- PAAPE, J. M.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X.; J. W. L. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, 2003. v. 34, n. January, p. 597–627.
- Souza, R. M.; Souza, F.N.; Batista, C.F.; Piepers, S.; Visscher, A.; Santos, K. R.; Molinari, P. C. C.; Ferronato, J.F.; Cunha, A.F.; Blagitz, M.G.; Silva, G. G.; Rennó, F.P.; Cerqueira, Mônica M.O.P.; Heinemann, M.B.; De Vlieghe, S.; Della Libera, Alice M.M.P. Distinct behavior of bovine-associated staphylococci species in their ability to resist phagocytosis and trigger respiratory burst activity by blood and milk polymorphonuclear leukocytes in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 105, p. 1625-1637, 2022.
- Swain, D. K. *et al.* Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with *Staphylococcus aureus*. **Veterinary World**, 2015. v. 8, n. 3, p. 336–345.
- Vander Top, E.A., Perry, G.A., Gentry-Nielsen, M.J. A novel flow cytometric assay for measurement of in vivo pulmonary neutrophil phagocytosis. **BMC Microbiol.** 6, 61. 2006. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-61>.
- Van Kessel, K.P.M.; Bestebroer, J.; Van Strijp, J.A.G. Neutrophil-Mediated Phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Front Immunol.**, 2014, Sep 26;5:467. doi: 10.3389/fimmu.2014.00467.
- Vasileiou, N.G.C., Chatzopoulos, D.C., Sarrou, S., Fragkou, I.A., Katsafadou, A.I., Mavrogianni, V.S., Petinaki, E., Fthenakis, G.C. Role of staphylococci in mastitis in sheep. **J. Dairy Res.** 86, 254–266. 2019. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000591>.

CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Prototheca* EM CASOS DE MASTITE CLÍNICA EM VACAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Marcelo Fagali Arabe Filho¹, Hélio Langoni¹, Felipe Freitas Guimarães¹, Sâmea Fernandes Joaquim¹, Simony Trevizan Guerra, Carlos Eduardo Fidelis², Marcos Veiga dos Santos², Márcio Garcia Ribeiro¹

¹Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Botucatu, SP, Brasil. ²Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, Pirassununga, SP, Brasil

INTRODUÇÃO

Algas do gênero *Prototheca* são organismos unicelulares, aclorofilados e intracelulares, capazes de infectar humanos e animais. Recentemente, baseado no marcador molecular mitocondrial (gene *cytb*) houve a reclassificação taxonômica do agente em 15 espécies, incluindo isolados associados a mastite bovina, e.g., *P. bovis* (*P. zopfii* genótipo 2), *P. blaschkeae* e *P. ciferrii* (*P. zopfii* genótipo 1). *P. ciferrii* é comumente encontrada em matéria orgânica e ambiente de fazendas, enquanto *P. bovis* e *P. blaschkeae* têm sido descritas como agentes primários de infecções intramamárias, apesar do predomínio de *P. bovis* (Jagielski et al., 2019).

As infecções intramamárias por *Prototheca* spp. ocorrem a partir do ambiente contaminado. Estes microrganismos são considerados agentes emergentes de mastite, particularmente em países com bom controle de patógenos contagiosos. A prototecose mamária causa queda significativa na produção leiteira, bem ao como descarte de vacas infectadas, posto que não existem protocolos de tratamento efetivo (Santos e Fonseca, 2019).

O diagnóstico de rotina é baseado no cultivo microbiológico em meios convencionais, embora para a caracterização fidedigna das espécies de *Prototheca* é necessário o uso de técnicas moleculares. Recentemente, a padronização da técnica de *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDITOF MS), possibilitou o diagnóstico rápido e acurado de espécies da alga em casos de mastite bovina no Brasil (Fidelis et al., 2021).

Considerando os prejuízos da prototecose mamária, foi investigada a prevalência da alga em rebanhos de alta produção de leite nos estados de São Paulo e Minas Gerais, utilizando o MALDI-TOF MS para o diagnóstico em nível de espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *Prototheca* spp. foram obtidos a partir do cultivo microbiológico do leite de 4.275 vacas com mastite clínica, em dez fazendas de alta produção, sendo quatro provenientes do estado de São Paulo e seis do sul de Minas Gerais. Foram incluídas fazendas com os seguintes critérios: (1) criação de vacas Holandesas ou mestiças, (2) fazendas com programas de controle e armazenamento de dados (digitalizados) dos animais, (3) contagem de células somáticas (CCS) <400.000 SCC/mL, (4) produção >20 litros/vaca/dia, (5) mínimo de 200 vacas em lactação, (6) ordenhadeira mecânica, e (7) histórico de mastite clínica.

A caracterização de mastite clínica foi realizada utilizando o teste da caneca telada de fundo escuro. As amostras de leite dos casos clínicos foram colhidas assepticamente após antissepsia dos tetos com de álcool (70%) e mantidas em refrigeração (4-8°C) até o momento do cultivo microbiológico. As amostras foram cultivadas em ágar sangue bovino (5%) e MacConkey, em aerobiose a 37°C, por 96

horas. Colônias típicas da alga (branco-acinzentadas, irregulares), obtidas após 48 horas de cultivo em ágar sangue, foram submetidas a coloração de Gram para a visualização de estruturas compatíveis com a alga (células ovaladas ou em mórulas contendo endósporos) (Santos e Fonseca, 2019) visando o diagnóstico preliminar fenotípico do agente.

Todos os isolados compatíveis com o gênero *Prototheca* foram submetidos a espectrometria de massas pela técnica de MALDI-TOF MS. Foi realizado o protocolo de extração de proteínas ribossomais com o auxílio de *beads* de zircônia (Fidelis et al., 2021). Espectros de massas foram capturados na faixa de 2.000-20.000m/z pelo equipamento Microflex (Bruker e Daltonics™ - Bremen, Alemanha), operado com 337nm de laser. A identificação microbiológica foi realizada pelo software FlexControl 3.3. suplementado com uma biblioteca local. A caracterização em nível de espécie dos isolados foi considerada somente para o escore de identificação ≥ 2.0 .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de amostras de leite cultivadas, em 1,03% (44/4.275) foram isoladas colônias compatíveis com *Prototheca* spp. Prevalência variável (1-10%) de isolamento de espécies de *Prototheca* tem sido identificada em casos de mastite e em tanques de expansão em diferentes países (Jagielski et al., 2019). No presente estudo, a baixa prevalência (~1%) da alga nas infecções mamárias poderia ser creditada ao bom manejo geral e tecnificação das fazendas amostradas, particularmente no que tange ao controle e profilaxia de agentes de origem ambiental na casuística de mastite bovina.

De um total de 4.275 amostras de leite de vacas com mastite clínica, foi possível observar que 79% (1.244/4.275) dos patógenos apresentaram origem ambiental e contagiosa em 79% (1.244/4.275) e 21% (333/4.275). Tal achado está em consonância com estudos em outros países (Jagieski et al., 2019) e no Brasil (Alves et al., 2017), nos quais os casos de prototecose mamária em vacas ocorrem predominantemente sob a forma clínica.

Dentre os 44 isolados compatíveis com o gênero *Prototheca* identificados pelo cultivo microbiológico e técnicas fenotípicas convencionais, 38 (86,36%) foram identificados como *P. bovis* pela metodologia de MALDI-TOF MS. Estudo recente utilizando a espectrometria de massas (MALDI-TOF MS) no diagnóstico de 31 isolados de *Prototheca*, obtidos de casos de mastite bovina no Brasil, detectou 22 *P. bovis* e 3 *P. blaschkeae* com escores >2.0 , possibilitando a caracterização rápida e fidedigna da maioria das espécies da alga (Fidelis et al., 2021). No presente estudo, todos os isolados - incluindo os seis não caracterizados por MALDI-TOF MS - serão submetidos a caracterização molecular utilizando o gene *cytb*.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi observada baixa prevalência da prototecose mamária, provavelmente em virtude do bom manejo das fazendas amostradas, incluindo ações de controle/profilaxia para agentes de mastite de origem ambiental, incluindo algas do gênero *Prototheca*. Os casos ocorreram principalmente na forma clínica (79%), reforçando o predomínio da mastite clínica nas infecções intramamárias pela alga. O uso da técnica de MALDI-TOF MS possibilitou no diagnóstico rápido e acurado do agente, podendo minimizar os prejuízos aos produtores, pois possibilita a adoção de ações precoces de controle e profilaxia, como a segregação e descarte de animais infectados, em virtude da ausência de tratamento efetivo dos casos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, A.C., et al. In vitro algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, p. 419-423, 2017.
- Fidelis, C.E., et al. MALDI-TOF MS identification of *Prototheca* algae associated with mastitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.33, n.6, p. 1168-1171, 2021.
- Jagielski, T., et al. The genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. **Algal Research**, v.43, 2019.
- Santos, M.V.; Fonseca, L.F.L. **Controle da mastite e qualidade do leite. Desafios e soluções**. Editora Esalq-USP, Pirassununga, SP. p. 301, 2019.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para a condução do estudo sob a forma de Projeto Temático (2015/19688-8), desenvolvido no Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida ao mestrando Marcelo Fagali Arabe Filho;

Aos pesquisadores José Carlos de Figueiredo Pantoja, Vera Lúcia Morés Rall, Rodrigo Tavanelli Hernandez, Simone Baldini Lucheis e Domingos da Silva Leite pelo auxílio no diagnóstico do projeto.

CARACTERIZAÇÃO DE MASTITES SUBCLÍNICAS AVALIANDO SISTEMAS DE PRODUÇÃO E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM REBANHOS DO PARANÁ

Leonardo L. Damasceno^{1,2}, Simony T. Guerra², Maiquel Wagner², Eduardo M. Ribas², Huibert P. Janssen², Marcos K. Ortiz², Marcos V. Santos³, Rodrigo de Almeida¹

¹Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. ²Negócios Leite, Castrolanda Cooperativa Agroindustrial, Castro, Brasil. ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite é reconhecida como uma das enfermidades mais frequentes e que mais traz prejuízos econômicos na pecuária leiteira. Este impacto econômico evidencia a necessidade de monitoramento da doença, para diminuir os prejuízos causados por ela. A qualidade do leite é uma das principais exigências da indústria láctea e os critérios de avaliação desta característica envolvem: ausência de resíduos antimicrobianos e químicos, baixa contagem de células somáticas (CCS) e baixa contagem padrão em placas (CPP) ou contagem bacteriana total (CBT) (Silva & Antunes, 2018).

Desta forma, este trabalho teve o objetivo de determinar a prevalência dos principais agentes causadores de mastite subclínica, através de cultivos microbiológicos nas fazendas, comparando três distintos sistemas de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo analisou amostras de leite com mastite subclínica em 28 rebanhos leiteiros localizados na região Centro-Sul do Paraná, no período de abril de 2021 a março de 2022, com critérios de seleção baseados em volume de produção diário acima de 1.000 litros de leite e dificuldades com a manutenção de níveis de CCS inferiores a 350.000 céls/mL.

As análises foram realizadas em meios de cultura cromogênica que identificam patógenos gram-positivos e gram-negativos, ambos em CHROMagar. Foram cultivadas 2187 amostras de leite de animais diagnosticados com mastite subclínica pelo CMT e pela contagem de células somáticas acima de 200.000 céls/mL, para avaliação da frequência de identificação dos patógenos de acordo com o sistema de produção dos rebanhos.

Os dados foram avaliados estatisticamente usando o procedimento GENMOD do SAS (v.9.4).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fazendas foram caracterizadas de acordo com o sistema de produção, sendo 8 fazendas com sistema de *compost barn*, 10 *free-stall* e 10 propriedades com semi-confinamento. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os sistemas de alojamento na avaliação de valores médios de CCS; 281,5, 251,9 e 292,4 céls/mL, respectivamente para os sistemas *compost barn*, *free-stall* e semi-confinado.

No total de 2187 amostras, 1247 (57,0%) apresentaram resultado de cultivo negativo, 43 contaminadas e 897 positivas para algum agente. Dentre as prováveis causas da ausência do agente etiológico nestes casos, postula-se, com base em Costa et al. (1996), a presença de um processo inflamatório de etiologia não bacteriana. Além disso, outros fatores poderiam explicar esta alta proporção de cultivos negativos, tais como cura espontânea, infecções por agentes de crescimento fastidioso e/ou não detectáveis no cultivo na fazenda, baixa concentração do patógeno na amostra coletada e infecções causadas por agentes de liberação intermitente na glândula mamária como *Staphylococcus aureus*.

Nos resultados positivos para agente, encontramos diferença ($P=0,01$) na frequência para *Prototheca/Levedura* com uma maior frequência em *free-stall* (52,2%), maior ($P<0,01$) frequência de *Staphylococcus aureus* em fazendas com sistema *compost-barn* (52,5%); *Staphylococcus não aureus* com maior ($P<0,01$) frequência em fazendas semi-confinadas (50,3%); *Escherichia coli* com maiores ($P=0,02$) frequências em *free-stall* e semi-confinamento e menor frequência em fazendas *compost-barn* (50% e 40% vs. 10%, respectivamente). Para os demais patógenos não encontramos diferenças ($P>0,05$) entre os sistemas de alojamento, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Tipos de patógenos microbiológicos comparando sistemas de produção.

Patógenos microbiológicos	No.	Compost barn	Free-stall	Semi confinado	Valor P
<i>Streptococcus agalact. / dysgalact.</i>	119	21,0%	36,1%	42,9%	0,17
<i>Streptococcus uberis</i>	80	13,8%	31,3%	55,0%	0,23
Outros Gram-positivos	59	18,6%	28,8%	52,5%	0,85
<i>Enterococcus spp.</i>	22	18,2%	36,4%	45,5%	0,73
<i>Lactococcus spp.</i>	20	20,0%	45,0%	35,0%	0,26
<i>Prototheca / Levedura</i>	23	26,1% ^b	52,2% ^a	21,7% ^b	0,01
Outros Gram-negativos	29	13,8%	24,1%	62,1%	0,38
<i>Serratia spp.</i>	4	25,0%	.	75,0%	0,42
<i>Klebsiella / Enterobacter</i>	26	11,5%	34,6%	53,8%	0,45
<i>Pseudomonas spp.</i>	9	.	55,6%	44,4%	0,12
<i>Escherichia coli</i>	30	10,0% ^b	50,0% ^a	40,0% ^a	0,02
<i>Staphylococcus aureus</i>	118	52,5% ^a	21,2% ^b	26,3% ^b	<0,01
<i>Staphylococcus não aureus</i>	358	26,5% ^b	23,2% ^b	50,3% ^a	<0,01

Muitas pesquisas indicam que a maior parte dos casos de mastite bovina é de etiologia bacteriana e o *Staphylococcus aureus* tem sido o patógeno primário mais frequentemente isolado e identificado (Santos et al., 2006), o que reforça a importância deste microrganismo nas infecções intramamárias. Nossos resultados demonstram que 53,1% dos patógenos encontrados são *Staphylococcus aureus* e *não aureus*, porém a grande predominância foram os *Staphylococcus não aureus* com 39,9%.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O perfil de agentes associados à mastite subclínica na região estudada concorda com dados já publicados, com maior prevalência de *Staphylococcus não aureus*, principalmente em sistemas de alojamento semi-confinado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Costa, E. O., et al. Mastite bovina: CMT versus microbiológico. **Hora Veterinária**, n.89, p.53-54, 1996.
- Santos, C.D.M. ***Staphylococcus sp.* e Enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos.** 2006. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia.
- Silva, J. C.; ANTUNES, R. C. Efeito do tipo de ordenha e do ambiente sobre a qualidade do leite cru com base na contagem de células somáticas. **Ciência Animal Brasileira**, v.19, p.1-16, 2018.

COMPARAÇÃO DO TESTE CALIFORNIA MASTITIS TEST REALIZADO EM DISTINTOS MOMENTOS DA ORDENHA COMO INDICADOR DE MASTITE SUBCLÍNICA

Maria Victória Zangrande¹, Davi Dayan Assenheimer¹, Sara Dacheri Kielbowicz¹, Luciana Bignardi Brisola Casimiro da Costa², Higor Henrique Cogo¹, Jhulie Cristiani Nogueira¹, Maiara Garcia Blagitz³

¹Universidade Federal da Fronteira Sul. ²Ohio State University, Columbus, Ohio. ³Professor do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

INTRODUÇÃO

A mastite é definida como a inflamação da glândula mamária (Ruegg, 2017). Pode ser classificada como clínica (leite visivelmente anormal de um quarto mamário) ou subclínica (sem alterações visíveis na glândula mamária, tampouco no leite). Assim, a mastite subclínica constitui num problema grave gerando prejuízos econômicos ao produtor e ao bem-estar animal (Ruegg, 2011).

O diagnóstico da mastite subclínica é realizado principalmente por meio de indicadores de contagem de células somáticas (CCS) no leite. Dentre os quais, o mais utilizado durante a rotina nas propriedades leiteiras é o California Mastitis Test (CMT) por ser considerado rápido, prático, econômico e fundamental para o manejo da saúde do úbere durante a linha de ordenha. Apesar de ter sido criado em 1957, o teste é utilizado rotineiramente para avaliação indireta das células somáticas do leite a partir da reação do material genético da célula e do detergente aniônico utilizado. A interpretação do CMT consiste na observação visual do leite a partir da formação de gel diretamente associada com a quantidade de células, o que resulta em aumento da viscosidade da solução (Smolenski et al., 2007). Portanto, o resultado é classificado como negativo ou em graus de acordo com a da viscosidade formada. Como desvantagem, o teste apresenta a heterogeneidade da análise visual do observador e sensibilidade diminuída quando comparada ao CCS.

O presente estudo tem o objetivo de comparar os resultados obtidos do CMT realizado em dois momentos distintos, um antes e outro após a ordenha, bem como sua relação com o pH do leite como provável indicador para mastite subclínica.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a coleta de dados, realizada em uma fazenda comercial no sudoeste do Paraná, foram selecionadas 93 fêmeas bovinas em lactação, da raça Holandês, sendo 20 primíparas e 73 pluríparas. O teste de CMT individual de cada animal foi realizado em dois momentos distintos, o primeiro foi realizado antes do início da ordenha (M1) e o segundo após o término da ordenha (M2). A mensuração do pH foi realizada após o M2.

Amostras individuais de leite (2 mL) foram coletadas, utilizando-se raquetes com quatro quadrantes. Na sequência, em cada poço adicionaram-se 2 mL de reagente violeta de bromocresol 0,02% (Langenegger et al., 1970) seguido por 30 segundos de homogeneização. Os resultados foram interpretados por dois observadores treinados considerando-se graus de 0 a 4. As amostras foram assim classificadas: grau 0 sem reação, grau 1 traços, grau 2 reação com viscosidade leve, grau 3 reação com viscosidade moderada e grau 4 reação com viscosidade forte.

Para a mensuração do pH, as amostras de leite foram coletadas em tubos do tipo Falcon®, armazenadas em caixas isotérmicas de isopor e transportadas até o

laboratório. As mensurações foram realizadas por meio do PHMETRO de bolso (K390014P) da marca Kasvi® (M3) e os valores entre 6.50 e 6.74 foram considerados normais.

Os resultados obtidos foram tabulados e analisados através do software SAS 9.4. Foram consideradas duas situações. A primeira análise considerou os quartos mamários como amostras independentes e a segunda considerou o animal com qualquer quarto positivo como positivo, de acordo com o seguinte critério: negativo grau 0/traços e positivo para grau maior /igual a 1 em qualquer um dos quadrantes. O Teste de Fisher foi utilizado para verificar associações entre variáveis (CMT, pH) e Coeficiente de Pearson para correlação entre os diferentes tempos. Significância foi definida como $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma correta atuação na prevenção, sucesso nas recomendações e controle da mastite, o diagnóstico precoce é essencial. e o CMT mostra-se instrumental. Porém apresenta limitações como a necessidade de um profissional capacitado para realizar o teste diminuindo a subjetividade dos resultados. Para uma correta atuação na prevenção, sucesso nas recomendações e controle da mastite, o diagnóstico precoce a identificação do problema é essencial e o CMT mostra-se instrumental. Porém, apresenta limitações como a necessidade de um profissional capacitado para realizar o teste diminuindo a subjetividade dos resultados.

No total 93 vacas foram examinadas para o CMT, e quatro foram eliminadas da análise de pH devido a impossibilidade de coleta de amostra no M2. Pelos dados deste estudo preliminar demonstra-se a variabilidade dos resultados associados ao tempo em que este é feito justificando assim a necessidade deste teste ser realizado de forma/tempo consistente para uma avaliação confiável e implementação correta dos planos de controle e prevenção da mastite.

O número e porcentagem de vacas positivas e negativas para o teste CMT durante os dois momentos da ordenha (M1 e M2) estão apresentados na Tabela 1. Seguindo a interpretação dos escores do CMT para avaliar os índices de mastite subclínica obtiveram-se as seguintes proporções: 26% (n=24) dos animais apresentaram resultados negativos nos dois momentos, 36% (n=34) dos animais apresentaram resultados positivos nos dois momentos, 30% (n=28) dos animais apresentaram resultados negativos no M1 e positivos no M2 e 3% (n=3) dos animais apresentaram resultados positivos no M1 e negativos no M2.

Tabela 1 - Número e porcentagem de vacas referente ao teste CMT previamente (M1) e posteriormente (M2) a ordenha.

		M2			Total
		Negativo	Positivo	Faltando*	
M1	Negativo	24 (26%)	28 (30%)	2 (2%)	54 (58%)
	Positivo	3 (3%)	34 (36%)	2 (2%)	39 (42%)
Total		27 (29%)	62 (66%)	4 (4%)	93 (100%)

Quatro vacas não tiveram leite suficiente para realizar teste em M2*.

Grande parte dos animais (93% 80/86) apresentaram valores normais para pH, e somente 7% (6/86) valores anormais pH 4,6 n=1 e pH 6,8 n=5.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi comparado o teste California Mastitis Test realizado antes da ordenha e após a ordenha visando responder dúvidas recorrentes que ocorrem no campo entre técnicos da área e produtores rurais, tendo em vista sua utilidade devido ao seu baixo custo, simplicidade, e rápida realização. Conclui-se que a variabilidade do resultado dos testes de CMT associado aos diferentes momentos da ordenha sucede, atingindo assim nosso objetivo. Com isso evidencia-se a necessidade do teste ser realizado de forma consistente para uma avaliação de resultados fidedigna e confiável. Seguindo os resultados, os valores de pH não apresentaram relação com mastite subclínica nos animais avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ruegg, PL., Dairy production medicine: **Managing mastitis and producing quality milk**. John Wiley & Sons; p. 207–32, 2011.
- Ruegg, PL., A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal Dairy Science**, 2017.
- Smolenski, G.; Haines, S.; Kwan F.Y.S.; Bond, J.; Farr, V.; Davis, S.R.; Stelwagen, K.; Wheeler, T.T. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach, **Journal of Proteome Research**, p. 207–215, 2007.

COMPORTAMENTO DE AMOXICILINA E CLAVULANATO EM PH ALCALINO DE LEITE DE VACAS COM MASTITE

Giovanna de Medeiros Guimarães¹, Ana Carolina Alves Vieira², Leonardo Borges Acurcio¹, João Paulo Andrade de Araújo², Letícia Matos Mattioli²

¹Centro Universitário de Formiga - UNIFOR-MG – Formiga, MG. ²Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária - Belo Horizonte, MG

INTRODUÇÃO

Devido a importância econômica, cultural e social do leite, quaisquer alterações que afetem sua produção podem ser um problema dentro de propriedades rurais. Nesse contexto, a mastite aparece como importante causadora de impacto negativo nos rebanhos leiteiros (Santos et al., 2017).

A mastite é capaz de causar alterações físico-químicas no leite, como a alcalinização do seu pH. Isso ocorre porque a vaca com mastite libera histamina em resposta à infecção, e assim, a histamina deixa os capilares mais permeáveis à passagem de células e componentes sanguíneos, que por sua vez tem um pH ligeiramente alcalino, deixando assim o leite com propriedades parecidas (Santos et al., 2017; Silva; Primieri, 2020).

Além disso, a mastite está associada ao problema da resistência bacteriana, uma vez que a utilização de antibióticos de forma inadequada em seu tratamento faz com que a bactéria em questão passe a não ser mais sensível a determinado antibiótico (Pissetti et al., 2021). E por isso, para evitar impasses como estes, identificar outras possíveis formas de inativação e potencial resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos é essencial.

Com base no exposto, é de conhecimento que os meios líquidos alcalinizados podem provocar hidrólise de β -lactâmicos (Sá et al., 2018) e variações de pH no leite com mastite e deixam o mesmo mais alcalino (Santos et al., 2017). Assim, o objetivo deste trabalho foi observar se o pH alcalino do leite de vaca com mastite ambiental provoca inativação ou redução da ação dos antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas três amostras de leite de vacas saudáveis e com mastite, sendo algumas das amostras com mastite retiradas de animais separadamente (mastite), e outras retiradas de um tanque contendo apenas leite de vacas com mastite (tanque). Foi medido o pH de todas as amostras e as mesmas foram esterilizadas. As amostras foram inoculadas com *S. uberis* previamente isolado e acrescidos de antibiótico com base de amoxicilina e clavulanato (Amoxicilina Trihidratada 200mg, Clavulanato de Potássio 50mg, Acetato de Prednisolona 10mg; Mastite clínica VL[®] - J.A. Saúde Animal, Patrocínio Paulista, SP, Brasil).

Em 100mL de leite saudável e com mastite (tanque e vaca), foram colocados 3mL da solução salina com o inóculo e, juntamente, foi acrescido 0,1g de amoxicilina e clavulanato. Os leites já inoculados com micro-organismo e antibiótico foram refrigerados durante 8 horas.

Após, as amostras de leite novamente passaram por medição de pH e foram plaqueadas em triplicata, na diluição 10^{-2} e 10^{-3} , no meio de cultura ágar BHI (Kasvi; São José dos Pinhais, PR, Brasil), e incubadas por 24 horas, a 37°C (Silva et al., 2021). Após esse tempo foi quantificado o número de colônias presentes nas amostras, para se verificar, se o pH alcalino do leite com mastite teve alguma influência na menor ação dos antimicrobianos.

As placas de crescimento positivo, do leite esterilizado na diluição 10^{-3} , passaram pelo processo de antibiograma, onde foi verificada a resistência e sensibilidade dos agentes microbianos à base de amoxicilina e clavulanato, por método de disco-difusão

em meio Müller-Hinton, sendo avaliado a susceptibilidade do micro-organismo medindo-se o diâmetro dos halos de inibição, conforme proposto por Bauer et al. (1966).

Para a realização de todas as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). O teste realizado foi o teste t Student não pareado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O micro-organismo utilizado como inoculo não apresentou resistência no teste de antibiograma à amoxicilina e clavulanato. Os leites inoculados com micro-organismo e antibiótico analisados apresentaram os respectivos pH: leite saudável - 6,8; leite individual de vaca com mastite vaca - 7,6 (mastite) e leite de um conjunto de vacas com mastite - 7,3 (tanque). O pH do leite saudável e apropriado para o consumo humano encontra-se entre 6,6 e 6,8, enquanto o pH de leite de vaca com mastite, encontra-se levemente alcalino com valores acima de 7,2 (Silva; Primieri, 2020).

Quando comparado o crescimento da amostra microbiológica no leite de vaca saudável e no leite individual de vaca com mastite, mediante a ação de amoxicilina (200mg) e clavulanato (50mg) os resultados mostraram influência do pH na inativação do antimicrobiano, tendo em vista o maior crescimento ($p < 0,01$) de *S. uberis* em leite de vaca com mastite (pH 7,6). E quando comparado o crescimento da amostra microbiológica no leite saudável e no leite de um conjunto de vacas com mastite (tanque), mediante a ação de amoxicilina (200mg) e clavulanato (50mg), os resultados mostraram que não houve influência significativa do pH na ação do antimicrobiano, sendo visualizados crescimentos em ambas as amostras.

Na propriedade do estudo, o leite de todas as vacas com mastite é depositado em tanque específico para leite de descarte. Este resultado provavelmente se deu num contexto onde com um pH menos alcalino, a diferença de crescimento microbiano não é tão evidente assim. Essa menor alcalinidade pode ter ocorrido pelo efeito de diluição do tanque.

Sabe-se que a farmacocinética e a farmacodinâmica, em especial do leite de animais com mastite, são avaliados na maioria das vezes em animais normais, o que impede de avaliar alterações na permeabilidade vascular, e componentes presentes no tecido alvo, que pode ser completamente diferente mediante a um processo inflamatório (Duarte et al., 2019; Langoni et al., 2017; Ribeiro, 2008). Tudo isso em conjunto, quando avaliado apenas em animais saudáveis, pode resultar numa ineficácia do medicamento utilizado (Duarte et al., 2019; Pisseti et al., 2021).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em decorrência do pH alcalino do leite individual de vacas com mastite, a presença do antimicrobiano amoxicilina e clavulanato foi menos eficaz no controle do crescimento do agente causador de mastite, quando comparado ao crescimento em leite de vaca saudável. Enfatiza-se a necessidade da realização de mais estudos farmacológicos sobre os antibióticos utilizados na mastite, sendo essencial para que seja garantido um pH correto de absorção do medicamento e o tempo de aplicação entre doses seja eficiente, onde, o tratamento ideal para mastite precisa considerar não somente fatos como cura clínica e bacteriológica da doença, mas também os impasses pontuados.

REFERÊNCIAS

- Pisseti, C. et al. *Staphylococcus aureus* resistentes aos β -lactâmicos em mastites de gado leiteiro: uma meta-análise. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 1, n. 4, p. 772-788, 2021.
- Santos, W.B.R. et al. Mastite Bovina: Uma Revisão. **Colloquium Agrariae**, n. 13, p. 301-314. 2017.
- Silva, L.H.B. et al. Mastite bovina: Revisão bibliográfica. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 2, n. 1, p. 142-151, 2020.

Sá, T.A.P. et al. Métodos de Remoção do Antibiótico Amoxicilina em Solução via Hidrólise Ácida e Alcalina. **Revista Processos Químicos**, v. 12, n. 23, p. 25-32, 2018.

CONDUTIBILIDADE ELÉTRICA DO LEITE E PRÁTICAS DE MANEJO PARA PREVENÇÃO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM VACAS JERSEY EM SISTEMA DE ORDENHA ROBOTIZADA

Jessica Quirino da Silva¹, Marcelo Alves da Silva², Rodrigo de Almeida¹

¹Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. ²Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, Paraná

INTRODUÇÃO

Quanto mais precoce o diagnóstico da mastite, melhor o tratamento e mais alta a taxa de cura do animal. O diagnóstico de mastite subclínica pode ser feito pelo teste de triagem California Mastitis Test, por determinação da contagem de células somáticas (CCS) em equipamentos eletrônicos automatizados e ainda, nas fazendas mais modernas, através da condutividade elétrica conforme o leite é ordenhado. No caso da condutividade elétrica esta aferição é feita pela diminuição dos íons potássio e aumento dos íons sódio e cloro nos casos de inflamação mamária (Ribeiro e Beloti, 2012). O diagnóstico precoce da mastite subclínica na propriedade por meio da condutividade elétrica pode ser uma ferramenta importante para o diagnóstico precoce da mastite (Ribeiro et al., 2014). Se soubermos o momento exato de iniciarmos o tratamento e o quanto isso resultará em cura microbiológica, menores gastos serão necessários, diminuindo o uso de antibióticos e descarte do leite.

Este trabalho teve como objetivo gerar dados que possam originar diretrizes para o manejo de mastite subclínica em propriedades em sistema de ordenha robotizada, associando a condutibilidade elétrica ao resultado da cultura microbiológica do leite no momento da secagem, tendo como referência vacas da raça Jersey.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em propriedade leiteira no município de Arapoti, Paraná (latitude 24°09'28" Sul e longitude 49°09'37" Oeste, com altitude de 860 metros). Esta região conta com uma bacia leiteira que entrega mais de 8 milhões de litros de leite por mês. A fazenda possui seis sistemas automatizados de ordenha, dispostos em três barracões em sistema de *compost barn*, com 2 robôs em cada barracão. No experimento foram avaliadas 280 amostras que foram submetidas a cultura na fazenda, focando nos principais agentes causadores de mastite e associando estes resultados a número de lactações, meses do ano no momento da secagem, dias em leite (DEL), condutibilidade na secagem (CS), condutibilidade do teto com maior condutibilidade (CT) e a relação condutibilidade teto e condutibilidade média (RTM). Animais que apresentaram resultados negativos foram considerados como controle. Para análise estatística, foi adotado delineamento inteiramente casualizado seguidos de teste de Tukey para comparação de médias, a 5% de probabilidade. Para mensurar o efeito dos meses do ano em que ocorreu a secagem com o número de lactações considerou-se o fatorial 3x3, com três intervalos no ano (janeiro a abril, maio a agosto e setembro a dezembro) e três ordens de lactações (uma, duas e três ou mais lactações). Foram estimadas correlações fenotípicas entre DEL, PL, CS, CT e RTM. Para melhor interpretação da condutibilidade e organizar a proposta de manejo organizou-se os animais em três grupos. Para interpretação considerou-se o fatorial 3x3 (80) e resultados de cultura negativos, outros gram negativos (OGN) e SNA (*Staphylococcus* não *aureus*), sobre as variáveis DEL, CT, CS, RTM e PL. Em relação aos efeitos das análises de culturas encontradas no ano de 2020 considerou-se fatorial 3x6 (3 culturas – negativas, SNA e OGN x 6 – 1, 2, 3, 4, 5 e 6 lactações) sob as variáveis DEL, CS, CT, RTM e PL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, confrontam a rotina de manejo proposta pelo manual do equipamento do robô em relação aos índices de condutibilidade elétrica para mastite subclínica. Observou-se uma alta prevalência de animais com cultura positiva para SNA no momento da secagem. Esta alta prevalência, com muitas primíparas contaminadas (69,9% das primíparas), pode ser a causa dos 56,3% dos animais que eram positivos para SNA apresentarem condutibilidade abaixo de 70 mS. Com o aumento do número de lactações dos animais, aumenta-se o valor da condutibilidade elétrica no momento da secagem. Para os animais negativos na cultura no momento da secagem, 10,75% (10 animais em 93) apresentavam condutibilidade acima de 80 mS, e como 1/3 (33 de 93) eram animais com mais de 3 lactações,á podem apresentar condutibilidade mais alta.

Como neste estudo avaliou-se somente a condutibilidade no momento da secagem, o entendimento da condutibilidade elétrica ao longo da lactação, bem como a sua correlação com a curva de lactação, pode ser um referencial importante para o manejo das mastites. Com a implantação do PCF (programa de cultura na fazenda), recomenda-se como protocolo de secagem, a cultura microbiana de todos animais, associado com o histórico da produção e condutibilidade para a tomada de decisão. Caso o resultado da cultura seja negativo, e o animal seja primípara ou de segunda cria, e em propriedade onde a prevalência de SNA seja alta, é recomendado refazer a cultura para se evitar os falsos negativos antes da secagem dos animais, uma vez que animais jovens com cultura positiva para SNA, muitos apresentaram condutibilidade abaixo de 70. Apesar da contaminação por SNA não ter afetado a condutibilidade elétrica do leite e a produção de leite na secagem, a curva de tendência para produção para os animais positivos para SNA, apresentou uma queda mais intensa na produção ao longo das lactações. Em relação às vacas em lactação e fora do período de secagem, a conciliação da produção com a condutibilidade elétrica pode ser um bom parâmetro para se considerar no manejo para prevenção e controle de mastite subclínica e direcionamento para cultura do leite, de forma mais precoce, prevenindo-se assim a queda na produção de leite. Assim uma elevação na condutibilidade acima de 70 ao longo da lactação, com queda na produção, indicam a necessidade da execução da cultura. A partir da RTM (Relação da condutibilidade do teto com maior condutibilidade e a condutibilidade elétrica média dos tetos) acima de 1,08, pode-se direcionar para a cultura o leite proveniente de quartos com maior condutibilidade. Os valores do relatório de saúde de úbere da ordenha automatizada no estudo consideram que valores até 70 são valores normais, condutibilidade entre 80 a 100, indicam alta contagem de células somáticas, sendo possível mastite subclínica, e valores superiores a 100 recebem atenção e indica possível mastite clínica (Lely, 2009). Desta maneira os valores de referência da ordenha robotizada desta empresa deveriam ser reavaliados.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se uma grande prevalência de primíparas com cultura positiva para SNA, com sua prevalência diminuindo com o passar das lactações. A contaminação por SNA não afetou a condutibilidade elétrica do leite e a produção de leite na secagem, em relação aos animais com cultura negativa até a segunda lactação. A curva de produção de leite nos animais positivos para SNA, apresentou uma queda mais intensa na produção ao longo das lactações, principalmente a partir da terceira lactação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ribeiro, A. B. C. **Avaliação do diagnóstico por condutividade elétrica do leite frente aos métodos tradicionais de detecção de mastite subclínica bovina**. 2014. 37 p. Trabalho de Conclusão do Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia de Leite – Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.
- Ribeiro, J. C. J.; BELOTI, V. Mastite bovina e seu reflexo na qualidade do leite – Revisão de literatura. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)**, v.2, p.1-12, 2012.

Lely Innovations in Agriculture Monthly Management Magazine. Jun 2009.

A OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA BOVINA E SUA INFLUÊNCIA NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DE VACAS LEITEIRAS.

Ana Luísa Fadini Saleme Abreu¹, Maria Helena Naimeke¹, Naara Shalom Carara Ramos¹, Rhaissa Emanuely Dias Lopes Faria¹

¹Escola Superior São Francisco de Assis, Espírito Santo, Brasil

INTRODUÇÃO

Um dos fatores que exerce grande influência na composição e características físico-químicas do leite é a mastite, a qual é identificada por um aumento na contagem de células somáticas (CCS) presentes no leite, sendo: neutrófilos (<11%), macrófagos (66-88%), linfócitos (10-27%) e células epiteliais (0-7%) (AIRES, 2010). Conforme Radostitis, *et al.*, (2007), durante o período de infecção da mastite, as células somáticas aumentam em um valor médio de 100.000 cél./mL de leite para mais de 1.000.000 cél./ml, em apenas algumas horas. Desta forma, devido à lesão das células epiteliais secretoras da glândula mamária afetada, ocorre a queda da produção leiteira.

Além do declive no desempenho produtivo, a inflamação da glândula mamária também promove um efeito negativo sobre a eficiência reprodutiva dos rebanhos leiteiros, o qual é evidenciado pela diminuição da taxa de concepção ao primeiro serviço pós-parto, pelo aumento do número de inseminações artificiais (IA) requeridas por concepção e pelo prolongamento do intervalo parto-concepção (IPC) em vacas leiteiras (Barker *et al.*, 1998; Schrick *et al.*, 2001).

Desse modo, o objetivo do presente trabalho é evidenciar os efeitos da MC associada ou não, à ocorrência de doenças reprodutivas puerperais, relacionadas ao índice de concepção à primeira IA, como também verificar o efeito da relação temporal entre a ocorrência da MC e da inseminação artificial.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em duas fazendas, as quais foram denominadas como Fazenda 1 e Fazenda 2. O rebanho da Fazenda 1 era composto por animais da raça Girolando com composição genética variando entre 1/2 a 3/4 Holandês x Gir, com média de 170 vacas em lactação e produção média diária de 22 Kg de leite/vaca. Já o rebanho da Fazenda 2 era composto por animais da raça Holandesa, com média de 150 vacas em lactação e produção média diária de 29 Kg de leite/vaca.

O período voluntário de espera (PVE) das fazendas tinha duração aproximada de 40 dias. A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi o método preconizado para a primeira inseminação pós-parto de todas as vacas nos dois rebanhos. As doses de sêmen utilizadas eram de touros da raça Holandesa provenientes de centrais de inseminação idôneas. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia ± 35 dias após a IA.

A associação entre MC e as doenças puerperais foram correlacionadas a taxa de concepção à primeira IA, o número de IA por concepção e a duração do IPC, assim verificando a ocorrência de nenhum, um ou mais de um caso de MC, para a análise foram considerados apenas os casos de MC ocorridos durante o período de serviço até a confirmação da gestação.

Para o cálculo da relação temporal entre o momento da ocorrência de mastite em relação à IA, foi estabelecido o intervalo de 42 dias antes e 35 dias após a inseminação, com base nos resultados de Hertl *et al.* (2010), onde citam que as vacas Holandesas diagnosticadas com MC foram influenciadas apenas pelos casos de mastite ocorridos ± 42 dias antes em relação à IA. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e à regressão logística utilizando o Minitab.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 370 observações realizadas nas duas fazendas foram registrados 119 casos de MC (32,16%), sendo que na Fazenda 1 a ocorrência de MC foi de 22,11% (42/190) e na Fazenda 2 de 42,78% (77/180). De tal forma, as vacas acometidas pela MC necessitaram de um maior número de inseminações para se tornarem gestantes e apresentaram IPC prolongado em relação às vacas que não apresentaram nenhum caso de MC ($P < 0,001$).

As vacas da Fazenda 2 apresentaram IPC mais longo que as vacas da Fazenda 1. Os animais acometidos pela MC necessitaram de um maior número de inseminações para estarem gestantes e apresentaram IPC prolongado em relação às vacas que não apresentaram nenhum caso de MC. Os efeitos da doença foram agravados quando as vacas apresentaram dois ou mais casos na mesma lactação.

A relação existente entre a ocorrência da MC e o momento da IA é um fator que determina a maneira pela qual a resposta inflamatória influenciará a funcionalidade do trato reprodutivo da fêmea bovina. Caso a inflamação seja antes da inseminação, os efeitos podem comprometer o crescimento folicular, a esteroidogênese e o desenvolvimento da competência ovocitária. Se a inflamação ocorrer posteriormente à inseminação, os processos reprodutivos tais como a ovulação, a fertilização e o estabelecimento da gestação e o desenvolvimento embrionário inicial podem ser prejudicados (Soto et al., 2003).

O número de IA/concepção e o intervalo parto-concepção foram fortemente influenciados pela ocorrência de MC, principalmente quando foi associada às doenças reprodutivas puerperais como metrite e retenção de placenta. A ocorrência simultânea de dois processos infecciosos em um animal, mesmo que em órgãos-alvo distintos, faz com que a resposta inflamatória seja potencializada, o que reduz ainda mais a eficiência do sistema imunológico em combater ambas as infecções. Por isso, é provável que ocorra efeitos sistêmicos tais como hipertermia, síntese e liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias responsáveis por desencadear o comportamento patológico dos animais.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o avanço da mastite clínica, concluiu-se que a patologia associada ou não às doenças reprodutivas puerperais, aumenta o número de IA/concepção e o IPC de vacas leiteiras. Como os índices de prenhes foram decaindo, é recomendado ser elaborado novamente o protocolo reprodutivo, realizar o manejo de prevenção em todas as vacas, gerar condições de higiene aceitáveis, tanto ao nível de produção do leite, na alimentação, no bem-estar animal e no ambiente envolvido, garantir que a qualidade do leite seja avaliada através da contagem de células somáticas no leite cru, e validar cada vez mais o tratamento dessa patologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires, T. A. C .P; **Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho**. Dissertação (Mestrado). Lisboa, 2010.
Carla C. Campos, Francisco L. Prado, João P. Justos, Paula R. B. Silva, Ricarda M. Santos. A mastite clínica, associada às doenças reprodutivas puerperais, compromete o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras Girolando e Holandesa. **Anais eletrônicos**.

DIVERSIDADE MOLECULAR, FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus aureus* ASSOCIADOS A BOVINOS

Aline Leandra Carvalho Ferreira¹, Ana Cláudia Dumont Oliveira², José Ferronato², Fernando Souza^{1,2}, Eduardo Milton Ramos Sanchez^{5,6}, Alessandro Guimarães^{3,4}, Sérgio Caldas⁷, Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira¹

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. ²Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ³EMBRAPA-Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil. ⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil. ⁵Department of Public Health, School of Health Sciences, National University Toribio Rodriguez de Mendoza of Amazonas, Chachapoyas, Peru. ⁶Laboratório de Sorologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ⁷Fundação Ezequiel Dias

INTRODUÇÃO

Mastite é a doença que mais impacta os rebanhos leiteiros no Brasil e em todo o mundo. Entre os patógenos causadores da mastite bovina, *Staphylococcus aureus* se destaca. Embora a principal fonte de *S. aureus* nas infecções intramamárias (IIM) em bovinos seja o úbere, este patógeno pode também ser isolado também de de sítios extra mamários, como fossas nasais. Nesse sentido a presença de *S. aureus* em rebanhos bovinos representa um risco à saúde pública, pois os bovinos são considerados o principal reservatório para o aparecimento de novos clones epidêmicos de *S. aureus*.

O uso extensivo ou a má gestão do uso de antimicrobiano no tratamento da mastite bovina pode representar desafio para a saúde pública, devido ao potencial de seleção de bactérias resistentes e seu impacto na saúde única. Outro aspecto importante refere-se à formação de biofilmes que representa um dos fatores que protege *S. aureus* contra um ambiente hostil, possibilitando a evasão do sistema imune e da terapia antimicrobiana. Neste contexto, o *quorum sensing* pelo sistema *agr* representa papel importante na formação de biofilmes (Toledo-Silva et al., 2021), que também foi investigado no presente estudo.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar os *spa* tipos de *S. aureus* isolados de leite e de fossas nasais (*swab nasal*), associados ao fenótipo e genótipo de formação de biofilme e de resistência aos antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho foram incluídos 218 isolados de *S. aureus* (212 amostras de leite e seis amostras de *swab* nasal) proveniente de quatro rebanhos leiteiros (Fazendas A, B, C e D), entre 2013 e 2015 (Ladeira et al., 2017; Santos et al., 2020). Os isolados foram previamente identificados por testes bioquímicos e confirmados por MALDI-Tof MS e pela presença do gene *nuc* (Ladeira et al., 2017; Santos et al., 2020). A produção de biofilme foi mensurada *in vitro* pelo teste de aderência em placa de poliestireno, e a qPCR para identificação dos genes associados a produção de biofilme (*icaABCD* e *bap*). Também foi pesquisada a presença do gene *agr* que é considerado um regulador do sistema *quorum sensing* e que possui correlação com a produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos.

Para a avaliação do fenótipo e genótipo associados à resistência antimicrobiana foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os seguintes antimicrobianos, incluindo aqueles criticamente importantes de acordo com a categorização da União Europeia: Ampicilina (AMP), Ceftiofur (CEF), Ciprofloxacina (CIP), Eritromicina (ERI), Florfenicol (FFC), Gentamicina (GEN), Novobiocina (NOV), Oxacilina (OXA), Sulfametoxazol+trimetoprima (SUT) e Tetraciclina (TET). Para a

realização da genotipagem alguns genes de resistência antimicrobiana entre os isolados resistentes e indeterminados foram testados para os seguintes antimicrobianos: ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), oxacilina (OXA) e tetraciclina (TET). Para a identificação dos *spa* tipos presentes realizou-se a amplificação da região repetida (X) da proteína A. Foram realizadas análises descritivas das variáveis incluídas no estudo, com a determinação de suas frequências absolutas e relativas. Para verificação de possíveis associações entre as variáveis foi realizado o Teste Exato de Fisher considerando-se um nível de significância estatística de 5% ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fenótipo fracamente aderente foi predominante (82,68%) em todos os isolados. Em relação aos genes associados à formação do biofilme, o gene *icaABCD* foi amplificado em 100% dos isolados dos rebanhos A, B e D, e no rebanho C houve amplificação para *icaA* de 92,20%, *icaBC* 94,10%, e *icaD* 96,10%. Por outro lado, o gene *bap* esteve presente em 7,9%, 1,2%, 1,77% e 2,17% nos rebanhos A, B, C e D, respectivamente. O fenótipo moderadamente aderente, frequente em 8,71% dos isolados (19/218), foi associado à presença do gene *bap* (16/218) ($P \leq 0,05$). Estudos anteriores têm demonstrado que a expressão do gene *bap* é altamente correlacionada com a produção de biofilme fortemente aderente, mesmo na ausência do *icaABCD*.

Os *spa* tipos foram relacionados às respectivas fazendas e ao total de isolados encontrados em cada rebanho. Entre os 216 isolados, 86% apresentaram os *spa* tipos t605, t267 e t6861. O t605 foi identificado em 91/97 (93,81%) dos isolados estudados, sendo o único genótipo presente no rebanho D, e em 88,24% dos isolados no rebanho C. O rebanho B apresentou oito diferentes *spa* tipos, e o mais comum foi o t267. O t098 foi identificado no presente estudo, em quatro isolados coletados de *swab* nasal de animais do rebanho B. Já no rebanho A o *spa* tipo mais comum foi o t6861. Este trabalho foi o primeiro a reportar o *spa* tipo t6861 no Brasil.

Número de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes no teste de concentração inibitória mínima, distribuição entre os *spa* tipos e identificação de genes de resistência estão descritos na tabela 1.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A distribuição e prevalência dos distintos *spa* tipos em diferentes rebanhos destaca a importância de se conhecer melhor quais cepas estão circulantes e as implicações de sua presença na ocorrência de mastite, suas formas de prevenção e tratamento. Além disso, nosso estudo foi o primeiro a descrever a presença do *spa* t6861 no Brasil.

A frequência de amplificação dos genes *bap* foi associada ao fenótipo fracamente aderente e pode estar associada à resistência dos isolados

A multirresistência foi encontrada em 20% dos isolados e representam uma preocupação, uma vez que oito destes antimicrobianos fazem parte da lista da OIE como criticamente importantes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Toledo-Silva, B., Souza F. N., Piepers, S., Mertens, K., Haesebrouck, F., De Vliegher, S. Metabolites of bovine-associated non-aureus staphylococci influence expression of *Staphylococcus aureus* agr-related genes in vitro. **Veterinary Research**, 52(1):62,2021.
- LADEIRA, C. V. G. **Perfil genotípico de *Staphylococcus aureus* e variáveis zootécnicas e climáticas associadas à mastite em vacas mestiças**. Tese (Doutorado pelo Departamento de Tecnologia e Inspeção). Escola de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte, p. 63. 2017.
- Santos, R. P. et al. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis and nasal samples. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1–9, 2020.

Tabela 1 - Número de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes no teste de concentração inibitória mínima, distribuição entre os spa tipos e identificação de genes de resistência

Rebanho A			Rebanho B			Rebanho C			Rebanho D		
Resistência ATM %	spa tipo (n° de isolados)	Gene de resistência (n° de isolados)	Resistência ATM %	spa tipo (n° de isolados)	Gene de resistência (n° de isolados)	Resistência ATM %	spa tipo (n° de isolados)	Gene de resistência (n° de isolados)	Resistência ATM %	spa tipo (n° de isolados)	Gene de resistência (n° de isolados)
AMP (79,5)	t002 (3); t6861 (26); Unknowns (2)		AMP (86,42)	t1200 (1); t1236 (3); t127 (6); t267 (56); t306 (1); t359 (1); t7433 (1)		AMP (64,0)	t605 (30); t189 (2)		AMP (89,13)	t605 (41)	
CEF (0)			CEF (0)			CEF (0)			CEF (2,17)	t605 (1)	
CIP (7,69)	t6861 (3)	mepA (3)	CIP (0)			CIP (4,0)	t605 (2)	mepA (2)	CIP (0)		
ERI (2,56)	t6861 (1)		ERI (0)			ERI (6,0)	t605 (3); t098 (3); t605(14); t189 (2)		ERI (2,17)	t605 (1)	
FFC (35,89)	t002 (1); t6861 (12); Unknown (1)		FFC (32,1)	t1200 (1); t127 (4); t267 (19); t306 (1); t7433 (1)		FFC (38,0)	t605(28); t189 (2)		FFC (43,48)	t605 (20)	
GEN (20,51)	t6861 (5); t002(3)	aacA-aphD (4)	GEN (9,87)	t127 (1); t267 (6)		GEN (56,0)	t605(28)	aacA-aphD (27)	GEN (10,87)	t605 (5)	aacA-aphD (1)
NOV (76,92)	t002 (3); t6861 (26); Unknown (1)		NOV (55,56)	t1236 (2); t127 (4); t267 (36); t306 (1)		NOV (24,0)	t605(9); t189 (1); t098 (2)		NOV (50,0)	t605 (23)	
OXA (5,13)	t002 (1); t6861 (1)		OXA (1,23)	t267 (1)		OXA (0)			OXA (6,52)	t605 (3)	
SUT (2,56)	t6861 (1)		SUT (5,0)	t127 (3); t267 (1)		SUT (8,0)	t605(2); t189 (1); t098(1)		SUT (10,87)	t605 (5)	
TET (38,46)	t6861 (15)	tet(k) (15)	TET (2,5)	t1236 (1); t267 (1)	tet(K) (1)	TET (58,0)	t605(29)	tet(L) (28)	TET (6,52)	t605 (3)	tet(K) (1) tet(L) (1)

Legenda: Ampicilina (AMP), ceftiofur (CEF), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (ERI), florfenicol (FFC), gentamicina (GEN), novobiocina (NOV), oxacilina (OXA), sulfametoxazol+trimetoprima (SUT) e tetraciclina (TET).

EQUIVALÊNCIA ENTRE METODOLOGIAS DE SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* AOS ANTIMICROBIANOS DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

Breno Luis Nery Garcia¹, Gustavo Freu¹, Carlos Eduardo Fidelis¹, Lígia Beatriz Rizzanti Pereira¹, Kristian da Silva Barbosa¹, Renata de Freitas Leite¹, Marcos Veiga dos Santos¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP)

INTRODUÇÃO

O aumento da resistência aos antimicrobianos (RAM) é uma preocupação mundial, que tem sido parcialmente associada ao excessivo uso de antimicrobianos na produção animal (WHO, 2005). Na bovinocultura leiteira, o tratamento da mastite clínica (MC) é o principal motivo para o uso de antimicrobianos (Tomazi e Santos, 2020) e, por esse motivo, a diminuição no uso de antimicrobianos para o tratamento da MC pode ter efeitos positivos sobre a saúde pública.

Atualmente, a escolha de antimicrobianos para o tratamento da MC é feita de forma empírica, sem a realização de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, devido ao tempo necessário para o envio de amostras e obtenção dos resultados dos testes laboratoriais (3-5 dias). Considerando que o uso racional de antimicrobianos na produção animal tem sido associado à redução de RAM, a seleção de antimicrobianos para tratamento da MC a partir de testes rápidos e diretos de susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos (TRDSA) na fazenda, pode levar a redução das chances de ocorrência RAM nos rebanhos leiteiros. Portanto, o objetivo do presente estudo foi estimar a equivalência entre os resultados das metodologias de TRDSA e a metodologia padrão de antibiograma por disco difusão em ágar (DDA) em isolados bacterianos de MC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados aleatoriamente isolados bacterianos de casos de MC de cada uma das seguintes espécies: *Staphylococcus aureus* (n=70), *Streptococcus uberis* (n=48); *Klebsiella* spp. (n=57) e *Escherichia coli* (n=69). Os isolados foram selecionados a partir da biblioteca de bactérias causadoras de mastite do QualileiteFMVZ/USP, provenientes de 102 rebanhos leiteiros. Os isolados foram previamente identificados por MALDI-TOF MS e armazenados a -80°C.

A sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados foi avaliada por duas metodologias: TRDSA e DDA (metodologia padrão). A metodologia de TRDSA foi realizada por incubação em meio cromogênico Muller Hinton Orientation (MHO, CHROMagar®, France), com a inoculação direta de isolados bacterianos a partir de colônias bacterianas. Já a metodologia padrão foi realizada pela inoculação de isolados bacterianos padronizados a 0,5 McFarland (~10⁸ UFC/mL), seguindo as orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). Em ambas as metodologias, os seguintes antimicrobianos foram avaliados: amoxicilina+clavulanato, cefalexina, cefalexina/canamicina, cefaperazona, cefquinoma, ceftiofur, ciprofloxacina, cloxacilina, enrofloxacina, gentamicina, oxacilina, penicilina-novobiocina, pirlimicina.

Os halos de inibição nos meios MHO e da metodologia padrão DDA foram categorizados em três categorias (S, I e R) de acordo com as zonas de inibição (CLSI, 2020). Os resultados de concordância entre as metodologias foram calculados utilizando-se o coeficiente *Kappa* de Cohen e os resultados foram classificados por nível de concordância em: quase perfeita (0,81 - 1,00); substancial (0,61 - 0,80); moderada (0,41 - 0,60); regular (entre 0,21 e 0,40); leve (entre 0,00 e 0,20), e fraca (>0,00). Além

disso, a análise de concordância entre os resultados dos halos de inibição dos isolados em cada método foi realizado com base na metodologia de Bland-altman (BA) e a concordância geral foi feita pela divisão dos resultados concordantes entre os dois métodos pelo total de avaliações.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A concordância geral entre os métodos variou entre patógenos de 0,712 (*Klebsiella* spp.) a 0,837 (*Escherichia coli*), enquanto os resultados de *K* variaram de 0,211 (*Streptococcus uberis*) a 0,446 (*Klebsiella* spp. tabela 1).

Tabela 1 - Coeficiente *Kappa* de Cohen, análise de concordância de Bland-altman (BA) e concordância geral entre os testes rápidos e diretos de susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos e a metodologia de antibiograma por disco difusão em ágar (metodologia padrão) em isolados bacterianos de mastite clínica (n=244).

	n ¹	K ²	P Valor	Concordância	BA ³
Geral ⁴	244	0,410	0	0,769	-1,946
<i>Staphylococcus aureus</i>	70	0,355	0	0,790	-4,872
<i>Streptococcus uberis</i>	48	0,211	1.1 ⁻⁵	0,702	1,532
<i>Escherichia coli</i>	69	0,398	0	0,837	-1,640
<i>Klebsiella</i> spp.	57	0,446	0	0,712	-1,586

¹Número de isolados; ²Coeficiente *Kappa* de Cohen; ³Análise de concordância de Bland-altman e ⁴Valores para todos os isolados em conjunto.

Considerando as categorias interpretativas do *K*, o TRDSA apresentou concordância moderada/regular em relação ao método padrão para todos os patógenos avaliados. Os resultados de concordância moderada/regular observados podem estar associados à ausência de padronização do inóculo, que pode alterar o diâmetro do halo de inibição, ocasionando erros na interpretação dos resultados. Os resultados de BA variaram de -4,872 mm (*Staphylococcus aureus*) a 1,532 mm (*Streptococcus uberis*) com viés geral de 1,946 mm, indicando que, de forma geral, os halos foram maiores no TRDSA do que na DDA.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concordância entre a metodologia TRDSA e o DDA foi moderada, e foi observado um viés geral de -1,946 mm no diâmetro dos halos de inibição no método TRDSA. A interpretação dos resultados do TRDSA deve levar em consideração a diferença nos halos de inibição de cada espécie, e mais estudos serão necessários para a avaliação do TRDSA como método de seleção de antimicrobianos na fazenda para tratamento de MC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Tomazi, T.; Santos, M.V. Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herd-level descriptors Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herdlevel descriptors. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 176, n. February, p. 104937, 2020.
WHO. Critically important antibacterial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use: report of a WHO working group consultation. **Canberra: World Health Organization**. n. February, 2005.

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA PREVALÊNCIA DE FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Staphylococcus aureus* DE ORIGEM BOVINA

Aline Leandra Carvalho Ferreira¹, Ana Cláudia Dumont Oliveira², José Ferronato², Eduardo Milton Ramos Sanchez^{5,6}, Alessandro Guimarães^{3,4}, Sérgio Caldas⁷, Fernando Nogueira Souza^{1,2}, Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira¹

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

²Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ³EMBRAPA-Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil. ⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil. ⁵Department of Public Health, School of Health Sciences, National University Toribio Rodriguez de Mendoza of Amazonas, Chachapoyas, Peru; ⁶Laboratório de Sorologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ⁷Fundação Ezequiel Dias

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa hoje a terceira posição na produção mundial de leite. A mastite é a doença que mais acomete os rebanhos leiteiros no mundo e é responsável por perdas que impactam toda a cadeia produtiva do leite. Por isso, o seu controle eficiente representa uma medida necessária.

Entre vários patógenos associados à mastite, *Staphylococcus aureus* é um dos principais identificados. Este patógeno pode apresentar repertório de fatores de virulência, alguns dos quais estão associados ao estabelecimento, persistência e gravidade de infecções intramamárias. Esses fatores de virulência são regulados por uma complexa rede de elementos reguladores da transcrição que são críticos na patogênese da infecção por *S. aureus*, que também permitem que esse patógeno se adapte às mudanças nas condições micro ambientais durante a infecção, aumentando assim sua sobrevivência. Assim, investigações de fatores de virulência de *S. aureus* são fundamentais para o desenvolvimento de biomarcadores diagnósticos e prognósticos e a identificação de alvos vacinais. Neste cenário, investigamos aqui a presença de um conjunto de 16 fatores de virulência de *S. aureus*, alguns deles em isolados de *S. aureus* associados a bovinos pela primeira vez.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 216 isolados de *S. aureus* (201 provenientes de casos de mastite subclínica, nove de mastite clínica e seis isolados de swab nasal) identificados por testes bioquímicos, confirmados por MALDI-ToF MS e pela presença do gene *nuc*. No presente estudo foram investigados a presença dos genes da leucotoxina lukE-lukD (*lukED*) e leucotoxina Pantón-Valentine (*pvl*), enterotoxinas A (*sea*), B (*seb*) e C (*sec*), síndrome do choque tóxico toxina-1 (*tsst-1*), a enzima permease específica da lactose II (*lacE*), e nove proteínas candidatas promissoras ao desenvolvimento de uma vacina eficaz [*serine-aspartate repeat-containing protein D* (*sdrD*), *serine-aspartate repeat-containing protein E* (*sdrE*), *iron-regulated determinant H* (*IsdH*), *enolase* (*eno*), *elongation factor G* (*fusA*), *phosphoglycerate kinase* (*pgk*), *cysteinyI-tRNA synthetase* (*cts*), *F0F1 ATP synthase subunit α* (*sas*), e *succinyl-diaminopimelate desuccinylase* (*sdd*)] (Stranger-Jones et al., 2006; Cunha et al., 2020; Santos et al., 2021) pela reação da cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Para a avaliação dos genes, os isolados de *S. aureus* foram submetidos a reações de amplificação, em um volume final de 10 μ L, adicionando 8 μ L de GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) e 2 μ L de DNA (25 ng/ μ L). Para a identificação dos *spa* tipos presentes realizou-se à amplificação da região repetida (X) da proteína A. Inicialmente, foram realizadas análises descritivas das variáveis incluídas no estudo, com a determinação de suas frequências absolutas e relativas. Para verificar possíveis associações entre as

variáveis foi realizado o Teste Exato de Fisher e considerado nível de significância estatística de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, os genes das proteínas *eno*, *fusA*, *pgk*, *sas*, *cts* e *sdd* foram identificados em isolados de *S. aureus* de amostras de leite bovino, pela primeira vez na literatura. No presente estudo, essas proteínas foram identificadas nos distintos *spa* tipos de *S. aureus* (entre 99,5% e 100% de todos os isolados de mastite subclínica estudados) reiterando a importância destas proteínas como candidatas à vacina. Sabe-se que as seis proteínas descritas estão relacionadas a diferentes funções dos processos metabólicos e são importantes para a manutenção de atividades funcionais, como crescimento, formação de biofilme e multiplicação celular. Portanto, sugere-se que o bloqueio da atividade dessas proteínas pode levar à eliminação desse patógeno, o que poderá ser uma estratégia promissora no controle da mastite bovina por *S. aureus*.

O presente estudo identificou elevada frequência do gene *sdrE* (média 93,52%, entre 86,59 e 100%) e *isdH* (média 99,07, entre 96,08 e 100%) em todos os rebanhos. O gene *sdrD* foi detectado em apenas 34,72% (20,73 a 100%) nos rebanhos estudados. As proteínas *sdrD* e *sdrE* são componentes de superfície microbiana reconhecendo moléculas de matriz adesiva (*MSCRAMM*). As proteínas de superfície reguladoras de ferro da família *Isd* (incluindo a *IsdH*) atuam no sequestro de ferro em *S. aureus* e são consideradas importantes no metabolismo celular.

A leucotoxina *LukED* está ligada à formação de poros nas células de defesa o que provoca a morte celular. O gene *lukED* foi encontrado em 92% dos isolados (entre 82 e 100% dos isolados nos rebanhos estudados). O gene *pvl* foi identificado em apenas um rebanho (3,9% no rebanho C), sendo um gene de origem humana, e indica um sinal de alerta para transmissão interespecies.

O gene *lacE* é responsável por codificar a enzima *EII* que atua no transporte ativo da lactose, o principal carboidrato presente no leite (Sharer, et al. 2003) e está diretamente relacionada ao crescimento bacteriano. O gene *lacE* foi observado em mais de 99,7% dos isolados (entre 98,8 a 100% dos isolados entre os rebanhos estudados). Nenhum dos isolados deste estudo amplificou os genes *sea*, *seb*, *sec* e *tsst-1*.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genes *eno*, *fusA*, *pgk*, *cysS*, *atpF* e *dapE* foram identificados entre os distintos isolados, reiterando sua importância na estratégia de desenvolvimento de uma vacina universal para *S. aureus*. Ademais, os genes *isdH*, *lacE*, *lukDE*, apresentaram-se alta prevalência enfatizando sua importância na patogênese da infecção por *S. aureus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Stranger-Jones, Yukiko K.;BAE, Taeok;SCHNEEWIND, Olaf.Vaccine assembly from surface proteins of Staphylococcus aureus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.45, p.16942-16947,2006.
- Santos KR, Souza FN, Ramos-Sanchez EM, et al.Staphylococcus aureus Protection-Related Type 3 Cell-Mediated Immune Response Elicited by Recombinant Proteins and GM-CSF DNA Vaccine. **Vaccines (Basel)**.2021;9(8):899. Published 2021 Aug 13. doi:10.3390/vaccines9080899.
- Cunha, A.F. et al. Comparison of antibody repertoires against Staphylococcus aureus in healthy and infected dairy cows with a distinct mastitis history and vaccinated with a polyvalent mastitis vaccine. **Journal of Dairy Science**. v.103, n.5 p.4588–4605, 2020.
- Sharer M.V. et al. Differential expression of the lactose transporter gene affects growth of Staphylococcus aureus in milk. **Journal of Dairy Science**. 2003;86(7):2373-2381.

SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS NO LEITE DE VACAS DURANTE E APÓS TRATAMENTO NÃO CONVENCIONAL DA MASTITE

Larissa Cristina Brassolatti¹, Camila Chioda da Almeida², Elka Machado Ferreira³, Tereza Cristina Alves⁴, Luiz Francisco Zafalon⁴.

¹Graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, São Paulo. ²Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campos Jaboticabal. ³Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, FCAV-Unesp, Jaboticabal, São Paulo. ⁴Pesquisadores - Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é um processo inflamatório da glândula mamária que altera a qualidade e a produção de leite. A doença pode se apresentar sob a forma clínica, caracterizada por alterações visíveis no leite e na glândula mamária do animal; e a subclínica, quando não há alterações macroscópicas na glândula mamária e no leite. Em ambas a causa é principalmente infecciosa e exames laboratoriais são necessários para a identificação da etiologia infecciosa (Oliveira e Medeiros, 2015).

Staphylococcus spp. estão entre os principais patógenos causadores de mastite. Eles podem estar presentes no leite de vacas em lactação e na pele dos animais, além de estarem envolvidos em casos de intoxicações alimentares causadas pela ingestão de leite contaminado. Apresentam capacidade de formação de biofilmes que contribuem para a resistência antimicrobiana, ocasionando dificuldades ao tratamento (Damasceno et al., 2020).

Em rebanhos criados sob manejo de produção orgânica, estudos relacionados com o comportamento dos micro-organismos causadores da mastite são necessários, devido a carência de informações sobre a epidemiologia da doença. Desse modo, mais informações podem ser disponibilizadas com relação à permanência de agentes infecciosos nos rebanhos. A caracterização mais detalhada do patógeno causador da mastite pode contribuir com a avaliação da possibilidade de transmissão dos microrganismos e o desenvolvimento da doença, fornecendo informações importantes para a escolha de métodos apropriados de profilaxia e terapia, mesmo em rebanhos submetidos a tratamentos não convencionais (Kot et al., 2016).

Objetivou-se investigar a ocorrência e os perfis de suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados no leite de vacas tratadas com homeopatia e em lactação posterior sem o tratamento, além de genes ligados à resistência antimicrobiana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de leite foram coletadas de um rebanho composto por 50 vacas em lactação durante e após tratamento homeopático da mastite com formulação à base de *Belladonna* (12 CH), *Hepar Sulphur* (12 CH), *Silicea* (12 CH), *Phosphorus* (12 CH) e *Phytolacca decandra* (12 CH). As vacas foram submetidas aos procedimentos de lavagem dos tetos antes da ordenha com água clorada e, em seguida, a secagem com papel toalha descartável foi realizada. Posteriormente foi feita a antisepsia préordenha com produtos à base de cloro. Os animais foram submetidos ao *California Mastitis Test* (CMT) para o diagnóstico de mastite subclínica e a etiologia infecciosa da doença foi confirmada laboratorialmente, com a semeadura das amostras de leite em placas de Petri contendo ágar sangue. Realizou-se a observação macroscópica das colônias, em

conjunto com as características morfo-tintoriais e bioquímicas. Somente foram considerados como positivos os casos em que a contagem de células somáticas do leite era superior a 200.000 células/mL. Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados por meio da técnica de disco-difusão a partir de discos impregnados conforme recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute*. Os princípios ativos utilizados foram Penicilina (10µg), Gentamicina (10µg), Enrofloxacin (5µg), Ciprofloxacina (5µg), Norfloxacina (10µg), Eritromicina (15µg), Nitrofurantoína (300µg), Tetraciclina (30µg), Doxiciclina (30µg), Sulfazotrim (25µg), Oxacilina (1µg), Cefalexina (30µg) e Sulfametoxazol (25 µg). A confirmação das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas previamente foi realizada por meio de testes moleculares. A investigação de genes de resistência *mecA* e *blaZ* também foi realizada por meio de testes moleculares, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para a sua identificação. As mudanças nos padrões de resistência antimicrobiana no período de tempo estudado foram analisadas por meio do teste de Qui-Quadrado ($P=0,05$). A frequência de casos de mastite causada por *Staphylococcus* spp. foi obtida pelo coeficiente de morbidade prevalente, expresso pelo número de casos da doença existente no momento e nos locais de realização do trabalho relacionados com as populações existentes naqueles determinados momentos e locais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período em que o tratamento homeopático estava sendo realizado no rebanho, as espécies de *Staphylococcus* identificadas no leite de vacas com mastite foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus chromogenes*. Posteriormente à realização do tratamento, na lactação em que a homeopatia não mais estava sendo usada, *Staphylococcus* spp. continuaram a ser isolados no leite em vacas com a doença. As prevalências mensais de mastite subclínica estafilocócica no período do tratamento com homeopatia variaram de 10,9% a 24,4%, enquanto no período em que os animais não estavam sendo tratados houve uma variação de 5,9% a 15,0%.

S. aureus isolados no leite de vacas sob tratamento homeopático apresentaram resistência *in vitro* ao sulfazotrim, penicilina, tetraciclina e gentamicina. *S. epidermidis* apresentou padrão de resistência semelhante ao *S. aureus*. No período em que as vacas não estavam em tratamento, isolados classificados como *S. aureus* apresentaram resistência à penicilina, nitrofurantoína, tetraciclina, doxiciclina e sulfazotrim.

As alterações nos padrões de resistência antimicrobiana entre os períodos com e sem tratamento foram analisadas para a doxiciclina, penicilina e tetraciclina, uma vez que para os demais princípios ativos antimicrobianos os micro-organismos não apresentaram resistência antimicrobiana *in vitro* e não foi possível a análise pelo teste estatístico utilizado. Não houve diferença nos perfis de suscetibilidade para os microorganismos quando comparados os períodos em que a homeopatia foi usada e quando essa forma de tratamento deixou de ser usada.

Genes ligados à resistência antimicrobiana foram identificados em frequência superior nos isolados durante o tratamento com homeopatia, o que indica a presença de micro-organismos com potencial de resistência antimicrobiana neste período. A presença do gene *blaZ* foi identificada durante o tratamento homeopático em 32/32,6%, 14/14,3% e 14/14,3% isolados classificados como *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. chromogenes*, respectivamente. O gene *mecA* foi identificado somente em *S. epidermidis*, em um total de 12 isolados (12,2%). Nos micro-organismos isolados no período posterior ao tratamento, o gene *blaZ* foi identificado em um isolado (7,1%) classificado como *Staphylococcus* coagulase-negativo, em que não foi possível identificar a espécie, além de outros dois micro-organismos (14,3%) identificados como

S. aureus. Na lactação em que não estava sendo realizado o tratamento homeopático, houve ausência do gene *mecA* nos micro-organismos investigados.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Staphylococcus spp. apresentaram resistência antimicrobiana *in vitro* durante o tratamento homeopático e na lactação posterior, quando o rebanho não estava sob este tipo de tratamento, bem como genes relacionados com esta característica. A ocorrência da mastite causada por *Staphylococcus* spp. em ambos os períodos sugere que o tratamento homeopático não controla esses micro-organismos e que eles permanecem no rebanho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Damasceno, V.S. et al. Análise do perfil microbiológico de agentes causadores de mastite bovina e sua relação com a qualidade do leite em uma fazenda no Sul de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Development**, v.6, p.91409-91421, 2020.
- Kot, B. et al. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **Journal of Dairy Research**, v.83, p.228-235, 2016.
- Oliveira, M.R.M.; Medeiros, M. Agentes causadores de mastite e resistência bacteriana. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v.2, n.1, p.45-60, 2015.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo Fapesp nº 2020/09470-3.

EXPRESSÃO DE CTLA-4 E PD-1 POR LINFÓCITOS T E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA NO PERÍODO PÓS-PARTO

Alice Maria Melo do Nascimento¹, Carolina Menezes Suassuna de Souza¹, Ewerton de Souza Lima¹, Fernando Nogueira de Souza¹, Stephany Soares Mendes¹, Pedro Lucas Jordão de Luna Araújo¹, Bianca Rafaella Rodrigues dos Santos Oliveira¹, Artur Cezar de Carvalho Fernandes¹

¹Núcleo Aplicado à Produção e Sanidade da Glândula Mamária, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil

INTRODUÇÃO

O período do periparturiente correspondente a três semanas antes e após o parto está caracterizado por mudanças marcantes no metabolismo e na resposta imune de vacas leiteiras. Durante este período, estes animais estão mais susceptíveis à incidência de doenças infecciosas e distúrbios metabólicos (Leblanc, 2010). Recentemente, nosso grupo demonstrou que vacas leiteiras que apresentam maior expressão da proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e o antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) em linfócitos T sanguíneos foi associado à maior risco de endometrite no período pós-parto (Souza et al., 2022). Entretanto, não se sabe se o mesmo fenômeno está também associado às infecções intramamárias em bovinos. Nesse contexto, a investigação de inibidores de *immune checkpoints*, como a PD-1 e CTLA-4, se tornam importantes, uma vez que essas moléculas têm sido associadas à imunossupressão, progressão da doença e mau prognóstico, inclusive em doenças infecciosas bovinas (Kasimanickam et al., 2004; Ikebuchi, et al., 2013; Suzuki, et al., 2014).

Assim, o presente estudo buscou avaliar a expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T sanguíneos durante o período periparto, a fim de checar sua relação com a saúde da glândula mamária.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo, foram utilizadas 26 vacas leiteiras clinicamente saudáveis, onde 19 delas eram multíparas e 7 vacas eram primíparas provenientes de duas propriedades leiteiras, sendo utilizados 16 animais das raças Guzerá e 10 animais da raça Girolando. As amostras foram coletadas em 14 dias pré-parto (T-14), ao parto (T0) e 30 dias pós-parto (T30) para determinar a expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T sanguíneos. A população de linfócitos T, assim como aquelas que expressaram PD-1 e CTLA-4, foram analisadas por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais específicos conforme previamente descrito (Souza et al., 2022). O *software* Flow Jo Tree Star software (FlowJo - Treestar 10.5.3 for Windows, Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) foi utilizado para analisar os dados da citometria de fluxo. A saúde da glândula mamária foi determinada pela contagem microscópica de células somáticas (CCS) e exame microbiológico do leite. Portanto, foram coletadas amostras de leite de forma asséptica de todos os quartos mamários dos animais nos seguintes tempos pós-parto: No dia do parto (T0), três dias (T3), sete dias (T7), quinze dias (T15) e trinta dias (T30) pós-parto. Ademais, amostras de leite de todos os quartos mamários foram coletadas para CCS em T7, T15 e T30.

Para investigar a associação entre a expressão de CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T, com mastite subclínica (CCS > 200.00 células/mL) e infecções intramamárias (resultado exame microbiológico) no período pós-parto, foi utilizada regressão linear generalizada, sendo a variável dependente a doença e variáveis explicativas como tempo de amostragem, paridade e fazenda/raça. Todas essas análises foram realizadas no programa R (R Core Team, 2021) e nos pacotes *arrumado* (Wickham, 2019) e

vassoura (Robinson, Hayes & Couch, 2021). Comparações nos diferentes momentos (T7, T15 e T30) entre os grupos de animais sadios e com mastite subclínica ou infecções intramamárias foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos em média + erro-padrão. $P = 0,05$ foi considerado como significativo, exceto quando indicado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As moléculas PD-1 e CTLA-4 são vitais para manter a tolerância imunológica e modular a magnitude e a duração das respostas imunes efetoras para prevenir danos colaterais nos tecidos. No entanto, a sinalização por essas moléculas pode induzir "exaustão" em células imunológicas efetoras, particularmente linfócitos T (Wyked & Lewinn, 2018). As investigações sobre essas interações imunossupressoras têm o potencial de desenvolver estratégias clínicas para tratar e controlar doenças infecciosas veterinárias, otimizando a resposta imune do hospedeiro para combater doenças, semelhante à forma como os anticorpos que bloqueiam esses *immune checkpoints* têm sido usados para tratar e controlar muitos tipos de malignidades (Wyked & Lewinn, 2018).

No presente estudo, não foram observadas diferenças no modelo de regressão linear generalizada entre vacas multíparas e primíparas. No entanto, foi possível observar que o processo inflamatório da glândula mamária, ou seja, o diagnóstico da mastite subclínica ($CCS < 200,000$ células mL^{-1}) entre sete e 30 dias pós-parto foi associado à maior expressão de CTLA-4 por linfócitos T em T-14 ($P = 0,05$) e uma tendência com a maior expressão de PD-1 em T-14 ($P = 0,09$) por linfócitos T. Além disto, animais com alta contagem de CCS ($> 200,000$ células/mL) em T15 apresentam maior expressão de CTLA-4 ($461,1 + 26,62$; $P = 0,01$) e PD-1 ($433,7 + 21,27$; $P = 0,01$) em T-14 que o grupo controle (CTLA-4 = $361,0 + 25,80$; e PD-1 = $344,7 + 22,72$) representados por animais com baixa CCS ($< 200,000$ células/mL). Entretanto, não observamos nenhuma relação com a expressão de PD-1 e CTLA-4 por linfócitos T em T0 e T30 com a saúde da glândula mamária. Não houve relação entre a expressão dos *immune checkpoints* com os resultados do exame microbiológico do leite, ou seja, infecção intramamária. No entanto, os resultados do presente estudo corroboram com observado por nosso grupo com a endometrite subclínica nestas vacas leiteiras, no qual a maior expressão de PD-1 e CTLA-4 foram também associados a implicações negativas a saúde uterina (Souza et al., 2022).

Desta forma, apesar da expressão de CTLA-4 e PD-1 ter sido inicialmente e amplamente estudada na oncologia, sendo alvos importantes na terapia humana (Rotte A., 2019), o seu estudo nas infecções em humanos e na veterinária iniciou-se apenas na última década. Assim, apesar das terapias relacionadas aos *immune checkpoints* representarem um grande avanço na oncologia e de novas alternativas terapêuticas direcionadas pelo hospedeiro, e estarem relacionados à exaustão de células T, merecem ser estudadas na medicina veterinária como alvo terapêutico, especialmente considerando seu efeito no período crítico na saúde da glândula mamária das vacas leiteiras.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo indica o potencial emprego dos *immune checkpoints* como alvo terapêutico em vacas leiteiras, especialmente durante o período periparturiente, um período crítico para a saúde uterina e da glândula mamária de bovinos leiteiros, porém mais estudos são necessários.

REFERÊNCIAS

Ikebuchi, R., et al. Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. **Vet. Res.** 44(1):59. 2013. DOI:10.1186/1297-9716-44-59.

- Kasimanickam, R., et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**. 62(1-2):9-23. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2003.03.001. 2004.
- Leblanc, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **J. Reprod. Dev.** Suppl:S29-35. 2010. DOI: 10.1262/jrd.1056s29.
- Robinson, D.; Hayes, A. **Couch S.Converta objetos estatísticos em Tidy Tibbles.Versão do pacote R. 0,7,6. 2021.**
- Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. **J. Exp. Clin. Cancer Res.** 38(1):255. 2019. DOI:10.1186/s13046-019-1259-z
- Souza, C. M. S., et al. Brief Research Report: Expression of PD-1 and CTLA-4 in T Lymphocytes and Their Relationship with the Periparturient Period and the Endometrial Cytology of Dairy Cows During the Postpartum Period. **Front. Vet. Sci.** 9:928521. 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.928521.
- Suzuki, S., et al. Increased expression of the regulatory T cell-associated marker CTLA-4 in bovine leukemia virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 163(3-4):115-124. 2015. DOI: 10.1016/j.vetimm.2014.10.006.
- Wickham, H., et al. Welcome to the tidyverse. **J. Software de código aberto.** 4:1686. 2019. DOI: 10.21105/joss.01686.
- Wykes, M., N; Lewin, S., L. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 2, p. 91-104, 2018.

FATORES CLIMÁTICOS E CCS DE VACAS EM SISTEMA *FREE STALL*

Ângela Vitalina Barbosa de Assis Silveira¹, Ariel Eurides Stella²

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Jataí. ²Professor da Unidade de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Jataí

INTRODUÇÃO

A saúde e a produção de vacas leiteiras estão diretamente correlacionadas as condições ambientais. A mastite está entre as principais doenças que afetam a qualidade do leite. Onde as condições ambientais, tais como, chuva e alta umidade influenciam no bem-estar e na proliferação dos microrganismos causadores da doença (Neves *et al.*, 2019). A Contagem de Células Somáticas (CCS) é um indicador da qualidade higiênico sanitária do leite (BRASIL, 2018), e a sua respectiva contagem também define a presença de mastite (Carneiro; Domingues; Vaz, 2009). O sistema *Free Stall* está dentre os sistemas utilizados na bovinocultura leiteira visando melhorar as condições ambientais em que os animais vivem. O sistema proporciona maior conforto, contudo existe a geração de dejetos que pode favorecer o crescimento bacteriano caso o manejo da matéria orgânica seja incorreto, podendo estar correlacionado a ocorrência de mastite. O presente trabalho apresenta dados de CCS e de grupos bacterianos incidentes, em uma fazenda de alta produção, avaliando a diferença da casuística de mastite no período seco e no período chuvoso.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em uma propriedade rural, no município de Jataí, estado de Goiás, Brasil. A propriedade de alta produção (em torno de 200 animais em lactação) tem o sistema em *Free stall* com cama inorgânica de areia e com presença de ventilação mecânica controlada. A propriedade realiza a quantificação de CCS, através do envio ao laboratório credenciado Clínica do Leite disposto pela Portaria Nº 259, DE 02 DE DEZEMBRO DE 2019 do MAPA, que estipula a realização da CCS de forma eletrônica segundo estabelecido na ISO 13366-2:2006. Além disso a cultura do leite é realizada através da PCF onFarm®. Foram coletados os dados de CCS de todo o rebanho em lactação do ano de 2021 e com as respectivas culturas realizadas de cada mês. As informações foram organizadas onde os meses de maiores índices pluviométricos (janeiro, fevereiro, março, outubro, novembro e dezembro) foram separados dos de menor índice (abril, maio, junho, julho, agosto, setembro). Os dados encontrados foram divididos em ocorrência de mastite clínica, mastite subclínica e mastites de pós-parto. As bactérias encontradas foram separadas em *S. aureus*, *Streptococcus sp.*, Outras Gram positivas (OGP) e Gram negativas (GN).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o ano de 2021 no período chuvoso, ocorreram 108 (39,56%) casos de mastite clínica, 158 (57,87%) casos de mastite subclínica e sete (2,57%) casos de mastite no pós-parto. Foram identificados três *S. aureus*, 21 *Streptococcus sp.*, 105 outras Gram positivas (OGP) e 32 Gram negativas (GN). A CCS do período teve média de 443,1. Durante o período seco, foram encontrados 72 (43,9%) casos de mastite clínica, 87 (53,05%) casos de mastite subclínica e cinco (3,05%) casos de mastite no pós-parto. Os microrganismos encontrados foram, quatro *S. aureus*, 22 *Streptococcus sp.*, 86 outros Gram positivos (OGP) e oito Gram negativos (GN). A CCS do período teve média de 327,55. Observou-se um aumento da CCS no período chuvoso com o aumento da mastite clínica e subclínica, visto que o aumento da umidade do ambiente está diretamente correlacionado ao conforto térmico dos animais e a facilidade de proliferação bacteriana. Nesse período as temperaturas mais elevadas e maior umidade favorecem o crescimento de microrganismos e aumentam o desconforto térmico dos

animais podendo causar prejuízos imunológicos acarretando aumento na CCS e prejuízos na qualidade do leite. A diferença que existe na CCS entre as estações seca e chuvosas pode ser justificada pelo manejo das camas dos animais. Foi relatado que a areia de troca é mantida sem cobertura e no período chuvoso a troca ocorre com a areia úmida que pode se tornar um local propício a proliferação bacteriana. O aumento de casos de mastite no período chuvoso está associado principalmente ao aumento da prevalência de microrganismos ambientais. Dentre os casos de mastite contagiosa a ocorrência no período chuvoso corresponde a 55%, já para mastite ambiental no período chuvoso ocorre 63% dos casos. Com relação ao aumento dos casos de mastite no pós-parto observa-se que 58% dos casos de mastite no pós-parto ocorreram no período chuvoso. A ocorrência de mastite clínica está mais associada ao verão, como é o caso do presente trabalho, onde também houve um aumento dos casos de bactérias Gram-negativas. A ocorrência de mastite subclínica também teve aumento no verão, de forma que 64% dos casos ocorreram nesse período.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho possibilitou a observação da etiologia, bem como da variação da CCS das infecções de mastite durante todo o ano. Foi observada uma maior prevalência de mastite no período chuvoso seja de origem contagiosa ou ambiental. Levando em consideração que a mastite é a doença mais recorrente no rebanho leiteiro a análise permite classificar os pontos de necessidade de maior cuidado no ambiente e no manejo dos animais para evitar perdas econômicas e diminuir os gargalos da produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brasil, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **IN nº 77, de 26 de novembro de 2018.**
- Carneiro, D. M. V. F., Domingues, P. F., Vaz, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1934–1943, 2009.
- Neves, R. B. S., Mesquita, A. J., Santos, V. M., Soares, E. N., Bueno, C. P., Coelho, K. O. Avaliação sazonal e temporal da qualidade do leite cru goiano tendo como parâmetros a contagem celular somática e a contagem bacteriana total. **Archives of Veterinary Science**, v. 24, n. 1, p. 10–23, 2019.

IDENTIFICAÇÃO DE *Streptococcus agalactiae* CAMP-NEGATIVO ISOLADOS DE MASTITE BOVINA NO AGRESTE PARAIBANO

Ewerton de Souza Lima^{1,2}, Daniele Farias de Brito¹, Victória Gabrielly Linhares Delgado¹, Raphael Ferreira Ordonho^{1,2}, Alice Maria Melo do Nascimento^{1,2}, Vinicius Pietta Perez⁴, Fernando Nogueira de Souza^{1,2,3}, Artur Cezar de Carvalho Fernandes^{1,2}

¹Núcleo Aplicado à Produção e Sanidade da Glândula Mamária, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil. ³Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ⁴Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

INTRODUÇÃO

O *Streptococcus agalactiae* continua sendo um dos principais agentes causadores de mastite bovina com altos níveis de prevalência e contágio em rebanhos leiteiros, em especial, em países da América do Sul (Keefe, 2012), sendo considerado no Brasil o terceiro patógeno mais prevalente em casos de mastite bovina (Tomazi et al., 2018). O *S. agalactiae*, pertencente ao grupo B de Lancefield, possui uma proteína extracelular denominado fator CAMP (*Christie, Atkins e Munch-Petersen*) codificada pelo gene *cfb* e esta proteína confere um dos fatores de virulência de *S. agalactiae*.

O fator CAMP atua sinergicamente com a β -hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* em ágar sangue ovino, constituindo o princípio do teste, que visa a identificação de cepas de *S. agalactiae*. O teste CAMP é empregado em laboratórios para a identificação de estreptococos do grupo B (GSB), sendo considerado padrão-ouro como um teste chave para a confirmação e identificação destes patógenos. Alguns ensaios moleculares baseados em PCR utilizados para identificação de GSB têm como alvo a região do gene *cfb*, sendo este responsável pela expressão do fator CAMP (Ke D et al., 2000; Buchan et al., 2015).

Desse modo, o gene *cfb*, foi sequenciado pela primeira vez em 1994 e permitiu a confecção de primers gene-específicos para maiores investigações de GSB (Podbielski et al., 1994). Com isso, o presente estudo tem como objetivo caracterizar de forma fenotípica e molecular cepas de *S. agalactiae*, isoladas no agreste paraibano, que apresentaram resultado negativo ao teste CAMP.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, um total de 64 cepas CAMP-negativas foram analisadas. Os isolados foram obtidos de amostras de leite coletadas de 46 vacas em uma propriedade localizada no agreste paraibano. Após a coleta, as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário do CCA-UFPB. Foi realizado semeio de 10 μ L de leite em ágar sangue ovino a 5% e incubados em condições aeróbicas a 37°C, sendo realizadas leituras em 24, 48 e 72 horas (Oliver et al., 2004). Após o período de incubação, a identificação bacteriana foi realizada por meio das características macroscópicas das colônias, características hemolíticas, prova bioquímica da catalase e logo após realizada a coloração de Gram. Em seguida, foi realizado o teste de CAMP para a identificação presuntiva de cepas de *S. agalactiae*. Para tal, foi realizado o semeio utilizando uma cepa de *Staphylococcus aureus* beta-hemolítica de um ponto a outro da placa de ágar sangue ovino, e em seguida foram semeadas perpendicularmente (90°) as colônias suspeitas de *Streptococcus agalactiae*. As placas foram incubadas a 37°C por 48h, seguida da leitura dos testes, nos quais não foi possível observar a formação de seta entre a

interseção do *S. aureus* e as cepas sugestivas de *Streptococcus agalactiae*. Visto isto, as amostras foram semeadas em ágar BHI e encaminhadas para identificação a nível de espécie, por meio do método de espectrometria de massas (Maldi-Tof), e sorotipo capsular através de reação em cadeia da polimerase (PCR-multiplex) identificando as regiões alvo *cfb* (153 pb) e/ou *cpn60* (310pb) conforme descrito por Kerdsin et al. (2017). A interpretação do padrão de bandas como o respectivo sorotipo capsular foi realizada segundo descrito por Imperi et al. (2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A reação CAMP negativa observada nas 64 cepas do presente estudo pode ser explicada devido a uma reduzida expressão, ausência ou defeito do gene *cfb* (Podbielski et al., 1994; Guo et al., 2019). Em estudo realizado por Hasan et al. (2002) com cepas de *S. agalactiae* CAMP negativas isoladas de mastite bovina, a identificação deste patógeno foi possível através da amplificação do gene 16S rRNA por PCR. No presente estudo, a identificação foi realizada por meio da espectrometria de massas (Maldi-Tof) e PCR-multiplex, identificando as regiões alvo *cfb* (153pb) e *cpn60* (310pb) (Kerdsin et al., 2017). Nesse contexto as 64 cepas (100%) expressaram o gene *cfb*, ao passo que 59 cepas (85%) apresentaram, além do *cfb*, resultando positivo para o gene *cpn60*, demonstrando assim a necessidade de mais estudo acerca da identificação genotípica do *S. agalactiae* proveniente de bovinos.

O uso do teste CAMP é considerado padrão-ouro para a identificação de *S. agalactiae*. Contudo, a não identificação ou subnotificação de cepas de *S. agalactiae* CAMP-negativo precisa ser considerada, principalmente em rebanhos sabidamente infectados. Em contraste, o teste CAMP pode ser influenciado por inúmeros fatores, como condições de cultura, meios de inoculação, tempo de cultura e temperatura (Podbielski et al., 1994; Guo et al., 2019). Tais fatores não se aplicam às análises dos isolados do presente estudo, uma vez que foi utilizado um controle positivo de *S. agalactiae* CAMP positivo. Os 64 isolados do presente estudo apresentaram sorotipo capsular tipo-III, comum em isolados bovinos. No Brasil foram identificados cinco tipos capsulares (Ia, Ib, II, III e IV) (Pinto et al., 2014; Carvalho-Castro et al., 2017), sendo o III mais prevalente, assim como no presente estudo.

A identificação de cepas de *S. agalactiae* CAMP-negativas causando mastite em bovinos no agreste paraibano pode ser de interesse na perspectiva de desenvolvimento de testes rápidos para a identificação de *S. agalactiae* em rebanhos bovinos. A circulação de cepas CAMP-negativas pode interferir negativamente nas tomadas de decisão e facilitar a perpetuação do *S. agalactiae* nos rebanhos infectados, resultado de testes falso-negativos e limitando o efeito da blitz terapia, principal ferramenta de controle deste patógeno hoje.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que o teste CAMP não foi sensível o suficiente para a detecção de *Streptococcus agalactiae* no rebanho estudado é imprescindível a aplicação de outras ferramentas diagnósticas para uma melhor investigação seja por meio de pesquisa em meios cromogênicos, uso de técnicas avançadas como Maldi-Tof e PCR para identificação assertiva deste patógeno, assim contribuindo de forma eficaz para sua identificação e controle, viabilizando uma melhor sanidade e qualidade do leite para o rebanho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Keef, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, p. 203-216, 2012.
- Tomazi, T., et al. Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle. **Plos One**, v. 13, p. 1-18, 2018.

Hassan, A. A., et al. Molecular Characterization of Phenotypically CAMP-Negative *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, p. 257-259, 2002.

INFLUÊNCIA DA SUJIDADE NO ÚBERE DE VACAS LEITEIRAS E A OCORRÊNCIA DE CASOS DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA

Suelange Oliveira Cruz¹, Janaína Alves de Souza¹, Galdênia Lima¹, Valdir Ribeiro Júnior¹, Jarbas Miguel da Silva Júnior¹, Lígia Maria Gomes Barreto¹

¹Departamento de Zootecnia do Sertão, Campus do Sertão, Universidade Federal de Sergipe, Nossa Senhora da Glória, Sergipe, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite é a enfermidade mais comum na bovinocultura leiteira, apontada como causadora de importantes perdas econômicas na atividade, como aumento dos custos com tratamento, descarte do leite em decorrência do uso de antibióticos para tratar a doença, além do descarte de animais (Jesus; Coutinho, 2018). Esta enfermidade está ligada a presença de microrganismos patogênicos no ambiente produtivo e que conseguem adentrar, via esfíncter do úbere, ao sistema mamário, causando sua infecção (Schreiner e Ruegg, 2002). A mastite pode ocorrer de duas formas, a clínica que é considerada mais agressiva e com sintomas visíveis (secreção de grumos durante a ordenha), e a subclínica que apresenta sintomas mais discretos, como vermelhidão no úbere (Jesus; Coutinho, 2018).

As vacas leiteiras são expostas diariamente a ambientes com grandes quantidades de fezes e detritos, e a sujidade desses animais serve como um indicador que reflete o ambiente onde eles estão, como consequência, a higiene do ambiente compromete tanto a saúde, quanto a qualidade do leite e bem-estar dos animais (Cerqueira et al., 2019). Outro ponto importante é que, segundo Fonseca (2015), úberes sujos ou muito sujos em comparação com úberes limpos no início da ordenha são associados a maiores chances de incidência de mastite. Assim, visando garantir a diminuição da ocorrência de casos de mastite no rebanho, o produtor deverá fazer um controle de sujidades (ambiental e do úbere) de forma mais efetiva.

Desta forma, objetivou-se com o presente trabalho avaliar a influência da sujidade do úbere sobre a presença de mastite clínica e subclínica de vacas em lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma Fazenda comercial localizada no Município de Nossa Senhora da Glória–SE, que utilizava sistema de produção leiteira em piquetes abertos com dieta na forma de ração completa a disposição dos animais. Foram utilizadas 31 vacas em lactação, pluríparas, com diferentes ordens de parto e produção de leite, avaliadas em dois momentos, com intervalo de 30 dias. A avaliação da presença de sujidade do úbere foi realizada de modo subjetivo (Schreiner e Ruegg, 2002), no momento em que os animais entravam na sala de ordenha, considerando os escores: Escore 1 – atribuído a animais sem sujeira; escore 2 - animais com 2 a 10% da área com sujidade; escore 3 - animais com 10 a 30% da área com sujidade; escore 4 - animais com mais de 30% da área com sujidade. Após a observação, as vacas passavam pelo pré-dipping, posteriormente eram submetidas ao teste da caneca de fundo preto para detecção da ocorrência de mastite clínica, sendo considerado como positivo quando se observava qualquer alteração nas características normais do leite (presença de grumos, sangue, etc.). Para detecção da mastite subclínica, utilizou-se o teste CMT, para tal seguiu-se as recomendações do fabricante: adição de 2 mL de leite e 2 mL do reagente em bandeja específica, com separação para cada quarto mamário, seguido de homogeneização por aproximadamente um minuto. O resultado de cada amostra foi avaliado após observação macroscópica da viscosidade ou grau de gelatinização do leite, sendo os escores classificados em negativo (0), traços (1), reação leve (2), moderada (3) e intensa (4). A análise dos dados foi realizada por meio de

estatística descritiva, teste qui-quadrado (X^2) para comparação entre coletas, além de correlação de Pearson entre as variáveis de teste da caneca, CMT e sujidade de úbere, utilizando o software SAS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação aos escores de ocorrência de sujidades no úbere e tetos, observou-se que do total de animais avaliados ($n=31$) na primeira avaliação, 48% das vacas estavam sem sujidade de úbere (Escore 1), enquanto 26%, 23% e 3% apresentaram o Escore 2, 3 e 4, respectivamente. Na segunda avaliação, houve redução de 19% nos animais sem sujidade e aumento daqueles com sujidade (Escore 2 e 4), cujo aumento de sujidades está ligado diretamente com a higiene ambiental (Schreiner e Ruegg, 2003), que foi intensificado pela ocorrência de chuvas da primeira para a segunda avaliação, que aumentou a quantidade de lama na fazenda. No entanto, não foi observada diferença para higiene de úbere ($p = 0,3991$) entre as avaliações.

Em relação a ocorrência de mastite, na primeira avaliação 6% dos animais apresentaram quadro na forma clínica e 45% subclínica. Na segunda avaliação foram 16% das vacas com mastite clínica e 65% com subclínica. O teste X^2 apontou diferença entre as avaliações, tanto para o teste da caneca de fundo escuro ($p = 0,0477$) e como no CMT ($p = 0,0002$), e na avaliação separada do CMT de cada teto, houve aumento no quantitativo de vacas positivas nos tetos anterior direito -TAD ($p = 0,0304$) e posterior esquerdo - TPE ($p = 0,0119$).

A análise de correlação de Pearson demonstrou fracos coeficientes de correlação ($r < 0,20$) e ausência de significância entre as variáveis avaliadas ($p > 0,05$), mas houve correlação positiva e significativa ($r = 0,35$) entre o CMT do TAD ($p = 0,0174$) e TPE com a higiene de úbere ($p = 0,0205$), demonstrando que a sujidade no úbere pode levar a aumento na ocorrência de mastite. Fonseca et al. (2015) observaram que a higiene de úbere com grau de sujidade 3 e 4 eram mais propícios a ocorrência de mastite subclínica em relação aos tetos com grau de sujidade 1 e 2. Corroborando também com Schreiner e Ruegg (2003), que reportaram que relação da sujidade de úbere com a mastite está no acesso que têm os microrganismos à glândula mamária, quando essas se apresentam sujas.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento na ocorrência de sujidades no úbere possibilita aumento na ocorrência de quadros de mastite clínica e subclínica de vacas leiteiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cerqueira, J.O.L., et al. Indicadores de bem-estar baseados nos animais em dez explorações de vacas leiteiras. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, n.2, p.412-418, 2019.
- Fonseca, L.H.M., et al. Influência da sujidade de tetos na ocorrência de mastite subclínica em bovinos criados em sistema free-stall. **Revista Científica Univiçosa**, v.7, n.1, p.452-458, 2015.
- Jesus, R.A.; Coutinho, C.A. Uso de medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina: Revisão. **PUBVET**, v.12, n.3, p.1-10, 2018.
- Schreiner, D.A.; Ruegg, P.L. Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.10, p.2503–2511, 2002.

INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE COLETA EM ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE LEITE DE CABRA

Raphael Ferreira Ordonho^{1,2}, Hudson Fernandes Correia¹, Victoria Gabrielly Linhares Delgado¹, Vitoria Maria Andrade de Melo¹, Marina Tavares de Souza¹, Alice Maria Melo do Nascimento^{1,2}, Fernando Nogueira de Souza^{1,2,3}, Artur Cezar de Carvalho Fernandes^{1,2}

¹Núcleo Aplicado à Produção e Sanidade da Glândula Mamária, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil. ³Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

A caprinocultura leiteira é de suma importância para o sustento de milhares de famílias no semiárido nordestino. Contudo, há um claro descompasso se comparado ao potencial da indústria láctea com a tecnologia empregada, assim como, com os resultados apresentados. Algumas enfermidades como a mastite expõem o produtor a um grande risco, podendo gerar prejuízos, seja na produção ou qualidade do leite, bem como elevando o custo no tratamento de animais acometidos e até mesmo o descarte precoce.

Nesse contexto, torna-se fundamental o estabelecimento de medidas eficientes de controle dessa insidiosa enfermidade. Logo, se faz necessário identificar quais são as principais bactérias presentes nos tetos dos caprinos, bem como quais apresentam efetiva ação patogênica. Uma ferramenta muito importante para esse controle é a análise microbiológica, visto que ela fornece informações precisas quanto a etiologia destas infecções.

Usualmente as amostras de leite são coletadas pela forma recomendada pelo *National Mastitis Council*. Porém, já foi constatado que o exame microbiológico de amostras de leite de bovino por cânula (Friman et al., 2017) e por punção da cisterna do úbere (Hiitiö et al., 2016) reduziram o número de espécies bacterianas isoladas. Exposto isso, apesar de haver estudos com bovinos, não há relatos semelhantes quanto aos caprinos.

Diante do exposto objetivou-se avaliar a influência do método de coleta nos resultados microbiológicos do leite de cabras, bem como, determinar as espécies de *Staphylococcus spp.* originárias de amostras de leite e avaliar a incidência e etiologia da mastite caprina durante a lactação em animais primíparos e múltiparos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste estudo, foram utilizadas cabras da raça Saanen provenientes da Estação Experimental da Universidade Federal da Paraíba localizada na cidade de São João do Cariri. Para coletar as amostras de leite, inicialmente foi realizado o teste da caneca do fundo escuro avaliando os três primeiros jatos para identificar a presença de coágulos, flocos ou secreções anormais que possam estar presentes no leite, indicando alteração de sua composição. Após isto, foi realizado a antisepsia das extremidades dos tetos e do úbere na região da punção com algodão umedecido em álcool a 70% para então coletar as amostras por ambos os métodos.

Com isso, dando continuidade, foram coletadas 76 amostras de leite de 19 animais, comparando as duas técnicas de coleta do leite utilizadas e relacionando com os resultados da análise microbiológica para identificar o efeito da metodologia de coleta. Logo, para tal, realizou-se a técnica de coleta convencional do teto direito e esquerdo de cada animal, de acordo com o preconizado pelo NMC; e a técnica de coleta

por punção da cisterna direita e esquerda do úbere de cada animal, de acordo com Hiitiö et al. (2016). Para análise microbiológica, no laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do HV-CCA, as amostras de leite foram cultivadas com o auxílio de uma alça de platina calibrada, semeando 10 µL em placas de petri contendo ágar acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado, incubados a 37 °C, e posteriormente, feito a observação dos isolados bacterianos após 24 horas e 36 horas, para identificar fenotipicamente o patógeno presente na cultura microbiológica.

As amostras então foram cultivadas em ágar *Brain Heart Infusion* e encaminhadas refrigeradas em caixas isotérmicas com gelo reciclável para o Laboratório Qualileite da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP para a realização do MALDI-TOF como técnica de identificação biomolecular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas e cultivadas 76 amostras, todas negativas para mastite clínica, e apenas 14 apresentaram resultado positivo no exame microbiológico, com todas resultando em cepas de *Staphylococcus spp.*, exceto uma amostra que não obteve identificação pelo método molecular (Tabela 1). A partir destes resultados, constatamos que o método convencional obteve maior frequência de análises microbiológicas positivas, com um total de 78,6% (11/14) dos isolados provenientes desta técnica de coleta, em contrapartida, a coleta por punção da cisterna do úbere obteve o crescimento de apenas 3 cepas, totalizando 21,4% (3/14). Tal informação nos leva a crer que o método de coleta influencia diretamente no crescimento microbiológico, visto que amostras de leite do mesmo animal obtiveram resultados diferentes de acordo com a técnica.

Tabela 1 - Espécies de *Staphylococcus spp.* isoladas de acordo com o método de coleta.

Bactéria	Total	Total cisterna	Total convencional
<i>Staphylococcus caprae</i>	6	0	6
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	1	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0	1
<i>Staphylococcus simulans</i>	4	2	2
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	0	1
Não identificada	1	0	1
Total de amostras positivas	14	3	11

Neste aspecto, supomos que bactérias como *Staphylococcus caprae*, que foi isolado apenas de amostras colhidas pelo método convencional, pode não estar relacionadas a mastite diretamente, uma vez que a mesma não colonizou a cisterna do úbere dos animais analisados. Com isso, hipóteses quanto ao *S. caprae* e outros semelhantes se tratarem de bactérias comensais do teto também devem ser consideradas, enquanto bactérias como *Staphylococcus simulans* demonstram diferente comportamento, haja vista que foi o único patógeno isolado na mesma metade mamária tanto da amostra colhida pelo método convencional quanto pela punção da cisterna do úbere (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultado microbiológico de amostras de punção da cisterna com crescimento positivo comparado com a análise do leite do teto da mesma metade mamária.

ID Animal	Método de coleta	Teto	Espécie
1	Punção de Cisterna	Direito	<i>Staphylococcus cohnii</i>
	Convencional	Direito	<i>Staphylococcus xylosus</i>
2	Punção de Cisterna	Direito	<i>Staphylococcus simulans</i>
	Convencional	Direito	Não houve crescimento
3	Punção de Cisterna	Esquerdo	<i>Staphylococcus simulans</i>
	Convencional	Esquerdo	<i>Staphylococcus simulans</i>

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados, obtidos pela primeira vez na espécie caprina, demonstram a influência dos métodos de coleta no diagnóstico microbiológico de amostras de leite de cabra, ao passo que as diferenças observadas nas análises sugerem a presença de microrganismos diferentes no leite oriundo da ordenha convencional e da punção da cisterna da glândula. No perfil microbiológico dos isolados prevalecem cepas de *Staphylococcus spp.*, sendo necessário aprofundar o envolvimento dessas bactérias na etiopatogenia da mastite em caprinos, bem como, sua atuação nas diferentes regiões da glândula mamária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Friman, M., Hiitö, H., Niemi, M., Holopainen, J., Pyörälä, S., Simojoki, H. The effect of a canula milking sampling technique on the microbiological diagnosis of bovine mastitis. **The Veterinary Journal**, v.226, p. 57-61. 2017.
- Hiitö, H., Simojoki, H., Kalmus, P., Holopainen, J., Pyörälä, S., Taponen, S. The effect of sampling technique on the PCR-based bacteriological results of bovine milk samples. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.6532-6541, 2016.

PERÍODO PÓS-PARTO EM VACAS LEITEIRAS: DINÂMICA DA INFECÇÃO E DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA

Alice Maria Melo do Nascimento¹, Stephany Soares Mendes¹, Bianca Rafaella Rodrigues dos Santos Oliveira¹, Carolina Menezes Suassuna de Souza¹, Ewerton de Souza Lima¹, Pedro Lucas Jordão de Luna Araújo¹, Fernando Nogueira de Souza¹, Artur Cezar de Carvalho Fernandes¹

¹Núcleo Aplicado à Produção e Sanidade da Glândula Mamária, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma enfermidade infecciosa comumente encontrada no rebanho de gado leiteiro, implicando em consequências que afetam todo o rebanho, uma vez que há queda na produção, sanidade e diminuição da qualidade do leite, assim como gastos com medicamento e descarte precoce de animais doentes (Smith, 2006).

O diagnóstico dessa enfermidade é de suma importância para minimizar os danos em rebanhos leiteiros. O exame microbiológico do leite é o método padrão para diagnóstico da mastite bovina, mas apresenta algumas limitações (Della Libera et al., 2011). Desta forma, o uso de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina tem sido amplamente empregado para determinação da saúde da glândula mamária do animal, como por exemplo, pela contagem automática e microscópica de células somáticas (CCS) (Della Libera et al., 2011; Langoni et al., 2012) Este último é um método quantitativo para diagnóstico de mastite, em que os diferentes tipos de células presentes no leite são enumerados (Souza et al., 2016).

A partir disto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a dinâmica da infecção no período pós-parto e o emprego da contagem de células somáticas no diagnóstico da mastite bovina neste período.

MATERIAL E MÉTODOS

Na realização deste estudo foram analisadas 26 vacas leiteiras clinicamente saudáveis, sendo 19 multíparas e 7 primíparas, de duas propriedades da região do agreste paraibano. Destes, 16 animais eram da raça Guzerá (Alagoinha/PB) e 10 animais da raça Girolando (Pilões/PB). Foram coletadas amostras de leite dos quatro quartos mamários dos animais nos seguintes tempos pós parto: No dia do parto (T0), três dias (T3), sete dias (T7), quinze dias (T15) e trinta dias (T30) pós-parto, totalizando 520 amostras. A coleta asséptica de amostras de leite ou colostro foi feita após o descarte dos três primeiros jatos, seguido pela assepsia da extremidade do teto com algodão umedecido em álcool 70%, posteriormente realizando-se a coleta em tubos estéreis devidamente identificados. Após a coleta, as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Na análise microbiológica, 0,01 mL das amostras de leite foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar sangue de carneiro desfibrinado a 5% e incubadas por 24-72h a 37°C, seguido por observação morfológica, teste de Gram e testes bioquímicos para identificação de gênero bacteriano. A identificação de isolados bacterianos isolados de amostras de leite cru assepticamente coletadas deu-se por espectrometria de massas com fonte de ionização do tipo ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massas do tipo tempo-de-voo (MALDI-ToF MS).

As amostras de leite utilizadas para a CCS microscópica foram preparadas em duplicatas. Depois de secas e fixados em metanol por 15 minutos, foram corados em corante puro de Rosenfeld por 4 min; e em seguida, na solução de corante Rosenfeld

diluído (1:2) por 8 minutos. Os esfregaços foram examinados em microscopia com aumento de 100x e em cem campos visuais.

As análises para determinar os valores de sensibilidade, especificidade e curva ROC foram feitas a partir do programa MedCalc (Ostend, Bélgica). A sensibilidade sendo a proporção de indivíduos com a condição alvo (padrão de referência positivo) e dão resultados de teste positivos (ou seja, 'positividade na doença'), já a especificidade refere-se à proporção de indivíduos sem doença que são negativos nos resultados do teste (ou seja, 'negatividade na saúde'). As curvas da característica operacional do receptor (ROC) comparam a sensibilidade versus especificidade em uma faixa de valores para a capacidade de prever um resultado dicotômico. A área sob a curva ROC permite que sejam dados os melhores pontos de corte para uso clínico que maximizem a sensibilidade e a especificidade (Florkowski, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do exame microbiológico estão demonstrados na Tabela 1. No presente estudo, observou-se que 18 quartos mamários provenientes de 8 animais apresentavam infecção persistente, entre os patógenos responsáveis estão *Staphylococcus chromogenes* (n= 12 quartos mamários, 66,66%), *Staphylococcus aureus* (n= 4 quartos mamários, 22,22%) e *Staphylococcus hyicus* (n= 2, 11,11%).

Tabela 1 – Resultados do exame microbiológico referente aos 104 quartos mamários provenientes das 26 vacas incluídas no estudo.

Patógenos	T0	T3	T7	T15	T30
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	21,1%	22,1%	19,2%	23,07%	17,3%
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1,9%	0,9%	0%	0%	0%
<i>Staphylococcus hyicus</i>	7,6%	0%	4,8%	3,8%	4,8%
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	3,8%	4,8%	0,9%	3,8%	5,7%
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,6%	6,7%	3,8%	5,7%	8,6%
<i>Rothia endophytica</i>	0,9%	0%	0%	0%	0%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1,9%	0,9%	0%	0,9%	1,9%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,9%	0%	0%	0%	1,9%
<i>Staphylococcus xylosus</i>	0%	2,8%	2,8%	1,9%	0%
<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	0%	0,9%	0%	0%	0%
<i>Staphylococcus capitis</i>	0%	0,9%	0%	0%	0%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0%	0%	0,9%	0%	0%
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	0%	0%	0%	1,9%	2,8%
<i>Staphylococcus warneri</i>	0%	0%	0%	0%	0,9%
<i>Trueperella pyogenes</i>	0%	0%	0%	0%	0,9%
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0%	0%	0%	0,9%	0%
<i>Escherichia coli</i>	0%	0%	0%	0,9%	0%
Não apresentou	51,3%	60%	67,6%	56,7%	55,2%

Na tabela 2 é possível observar que os valores de curva ROC estão demonstrados os valores preditivos da CCS nos dois rebanhos estudados, enquanto que a Tabela 3 apresenta os resultados da Curva ROC dos animais da raça Guzerá.

Tabela 2 – Valores preditivos da contagem microscópica de células somáticas no diagnóstico da mastite bovina no período pós-parto dos 104 quartos mamários utilizados no presente estudo.

Todos	T0	T3	T7	T15	T30	T7, T15 eT30
ROC	0,622	0,544	0,695	0,665	0,678	0,67
95% CI	0,51-0,734	0,389-0,70	0,583-0,808	0,56-0,77	0,571-0,786	0,609-0,73
Youden cut-off	3921702	1024990	554116	184705	327270	241683
Sensibilidade	0,417	0,476	0,667	0,909	0,702	0,802
Especificidade	0,84	0,684	0,687	0,491	0,692	0,489

ROC: curvas da característica operacional do receptor; 95% CI: Intervalo de confiança 95% ; T0: No dia do parto; T3: 3 dias após o parto; T7:7 dias após o parto; T15:15 dias após o parto; T30:30 dias após o parto; T7,T15 e T30: média de 7, 15 e 30 dias após o parto.

Na tabela 3, observamos que os valores preditivos da CCS foram discretamente maiores que os valores onde incluímos todos os animais, sugerindo que a CCS como um bom indicador inflamatório no diagnóstico da mastite no período pós-parto nesta propriedade, mesmo no colostro e leite de transição. Devemos destacar que é esperado variações entre fazendas nos valores preditivos de indicadores inflamatórios, pois depende da prevalência da enfermidade e do tipo de microrganismo envolvido na etiologia da mastite.

Tabela 3 - Valores preditivos da contagem microscópica de células somáticas no diagnóstico da mastite bovina no período pós-parto dos 64 quartos mamários de vacas Guzerá utilizados no presente estudo.

Guzerá	T0	T3	T7	T15	T30	T7, T15 eT30
ROC	0,892	0,669	0,721	0,829	0,645	0,714
95% CI	0,588-0,955	0,531-0,806	0,589-0,853	0,714-0,945	0,49-0,799	0,637-0,79
Youden cut-off	410675	330112	310462	184705	280988	241683
Sensibilidade	0,905	0,612	0,846	0,906	0,778	0,812
Especificidade	0,467	0,719	0,529	0,759	0,522	0,605

ROC: curvas da característica operacional do receptor; 95% CI: Intervalo de confiança 95% ; T0: No dia do parto; T3: 3 dias após o parto; T7:7 dias após o parto; T15:15 dias após o parto; T30:30 dias após o parto; T7,T15 e T30: média de 7, 15 e 30 dias após o parto.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo descrito analisa a dinâmica de infecção por mastite no período pós-parto, apontando principalmente o perfil persistente da infecção por *S. chromogenes* e *S. aureus*. Os testes de análise microbiológica e CCS microscópica para avaliar a presença de mastite nos quartos mamários dos animais se mostraram satisfatórios quando analisados por meio da curva ROC, ou seja, na discriminação de animais sadios e animais doentes, mesmo em amostras de colostro e leite de transição.

REFERÊNCIAS

- Della Libera, A. M. M.P. *et al.* Avaliação dos indicadores de inflamação no diagnóstico da mastite bovina. **Arq Inst Biol.** 78:297-300. 2011.
- Florkowski, C. M. Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: communicating the performance of diagnostic tests. **Clin Biochem Rev.** Aug;29 Suppl 1(Suppl 1):S83-7. 2008.
- Langoni, H., *et al.* Somaticell VR as a screening method for somatic cell count from bovine milk. **Ciência Rural.** 42:1090–1101. 2012.
- Souza, F.N., *et al.* Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples. **Pesq Vet Bras.** 36:811–818. 2016.
- Smith, B. P., **Medicina Interna de Grandes Animais.**, 3° ed. Barueri, SP., 2006

PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E T CD8⁺ DE MEMÓRIA EM VACAS LEITEIRAS VACINADAS COM DISTINTOS HISTÓRICOS DE MASTITE POR *Staphylococcus aureus*

Thais Cristine dos Santos Soares¹, Kamilla Reis Santos¹, Raysa Brenda Marques Maia¹, Adriano França da Cunha², Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira², Marcos Bryan Heinemann³, Alice Maria Melville Paiva Della Libera¹, Fernando Nogueira Souza^{1,4}.

¹Veterinary Clinical Immunology Research Group, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-270, Brasil. ²Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-010, Brasil. ³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-270, Brasil. ⁴Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Paraíba, Areia 58397-000, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença mais prevalente e com maior impacto na pecuária leiteira, sendo *Staphylococcus aureus* um dos patógenos mais importantes devido à sua patogenicidade, perfil contagioso, persistência da infecção e baixas taxas de cura associados a terapias atuais (Cunha et. al., 2020).

Há um consenso de que os linfócitos T de memória contribuem para o controle de *S. aureus*, e a deficiência de sua resposta aumenta a susceptibilidade a infecções ocasionadas por esse patógeno (Bröker et.al., 2016). Estratégias de vacinação tem como objetivo otimizar a resposta dos linfócitos T frente às infecções por *S. aureus*. Dessa forma, trabalhos como o nosso que objetivam desvendar as respostas imunes em vacas leiteiras que controlam a infecção satisfatoriamente podem contribuir para descobertas de abordagens terapêuticas e preventivas mais eficazes no combate à mastite bovina por *S. aureus* (Souza et. al., 2020; Cunha et. al., 2020).

Utilizamos a proliferação de linfócitos, técnica amplamente utilizada, para avaliar a resposta imunológica mediada por células induzidas por antígenos específicos, sendo a base para o estabelecimento da memória imune e para montagem de uma imunidade protetiva (Soares et. al., 2010).

Diante deste cenário, investigamos a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em animais com distintos históricos de mastite, e o efeito da vacinação com vacina polivalente comercial, e desta forma, trazer informações importantes da resposta de vacas leiteiras que montaram uma resposta imune efetiva e tiveram sucesso frente a infecção por este patógeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente estudo, foram selecionadas 25 vacas leiteiras de segunda ou terceira lactação, originárias de dois rebanhos comerciais que apresentavam alta prevalência de mastite por *S. aureus* e alta contagem de células somáticas no leite do tanque. Esses animais foram divididos em infectados por *S. aureus* ou sadios antes da vacinação, e receberam três doses de vacina comercial (Startvac[®]-TopVac[®] Hipra). Amostras de leite foram coletadas para análise bacteriológica nos momentos d-14, d-7, d0 (dia da vacinação), d35, d65, d97, d104, d111 e d118 e contagem de células somáticas nos momentos d0, d35, d65, d97, d104, d111 e d118; sendo que as vacinas foram aplicadas nos dias d0, d35 e d65 e amostras de sangue periférico para avaliação da proliferação de linfócitos em dois momentos, ou seja, logo anterior à vacinação (d0) e 21 dias após a terceira dose (d118).

As células mononucleares do sangue periférico (CSMP) foram isoladas do sangue periférico para avaliação da proliferação de linfócitos a partir do gradiente de

concentração Ficoll® (GE Healthcare, EUA) conforme as orientações do fabricante. As CMSP foram incubadas por 72 h e plaqueadas em triplicatas estimuladas ou não com *S. aureus* isolado de casos de mastite persistente. Após este período, a imunofenotipagem foi realizada para identificação das populações de linfócitos utilizando anticorpos monoclonais para identificação das populações de linfócito T CD4⁺, linfócito T CD8⁺, linfócito de memória (CD45RO⁺), e para diferenciação das populações de linfócitos de memória efetora (CD44⁺, CL62L⁻) e central (CD44⁺, CL62L⁺), e o anticorpo Ki67 para a determinação da proliferação de linfócitos, conforme previamente descrito (Cunha et al., 2020).

Foi feita a análise estatística dos dados encontrados a partir de explorações gráficas e regressões lineares avaliando a interação entre as variáveis dependentes e independentes de interesse, vacinação, infecção e momento. Para toda a análise consideramos $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se diminuição da proliferação de linfócitos sanguíneos totais (redução média de 19,23%) e linfócitos T CD4⁺ (queda de 17,83%) nos animais infectados por *S. aureus* em relação os animais sadios, quando estimulados com *S. aureus*. Desta forma, nosso estudo reforça a ideia de que a resposta insatisfatória de linfócitos T CD4⁺ pode favorecer a persistência da infecção intramamária associada a este patógeno, já que os linfócitos T CD4⁺ estão associados eliminação infecções bacterianas (Souza et al., 2020).

Nosso estudo demonstrou que vacas com mastite subclínica por *S. aureus* apresentaram menor proliferação de células T de memória (redução média de 18,37%), o que pode ser explicado pela capacidade do *S. aureus* de inibir mecanismos que estabelecem a memória imunológica, o que também pode explicar por que infecções anteriores por *S. aureus* geralmente não conferem proteção para infecções subsequentes e seu desafio de desenvolver uma vacina eficaz contra esse patógeno. De fato, nenhum efeito significativo da vacinação na proliferação de linfócitos T foi observado, o que explica a insatisfatória proteção contra novas infecções intramamárias por este patógeno em condições de campo. Um dos grandes desafios para estabelecer a memória imunológica contra *S. aureus* é que os peptídeos imunodominantes podem não desencadear respostas protetoras de células T, o que também poderia nos ajudar a explicar nossos achados. Neste cenário, uma resposta robusta contra epítomos imunodominantes não protetores pode ser gerada às custas de uma resposta contra epítomos mais protetores, mas subdominantes (Teymournejad e Montgomery, 2021)

Ademais, observamos que aos 118 dias após a primeira coleta, os animais infectados apresentaram menor proliferação de linfócitos T CD8⁺ (redução média de 18,75%) especialmente da população de linfócitos T CD8⁺ de memória (redução média de 19,15%). Neste contexto, Ziegler *et al.* (2011) demonstrou progressiva redução da resposta de células T frente aos antígenos de estafilococos na infecção por *S. aureus* da fase aguda a infecção persistente, o que determinou que estas células entrassem num estado anérgico e de imunossupressão, que pode estar associado à falha da imunidade “esterilizante” favorecendo as infecções persistentes de longa duração (Ziegler et al., 2011).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo reforçou a ideia de que a regulação negativa da reposta de células T é crucial para a persistência das infecções intramamárias por *S. aureus*. Ademais, considerando a importância das células T para a proteção contra as infecções por *S. aureus*, a insatisfatória proliferação de linfócitos T encontrado no presente estudo pode justificar a baixa efetividade da vacinação encontrada a campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bröker, B. M. et al. The T cell response to *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 31, 2016.
- Cunha, A. F. et al. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy and infected dairy cows with a distinct mastitis history and vaccinated with a polyvalent mastitis vaccine. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, p. 4588-4605, 2020.
- Soares, A et al. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. **Journal of Immunological Methods**, v. 362, n. 1-2, p. 43-50, 2010.
- Souza, F. N. et al. Immune response in nonspecific mastitis: What can it tell us?. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5376-5386, 2020.
- Teymournejad, O.; Montgomery, C. P. Evasion of immunological memory by *S. aureus* infection: implications for vaccine design. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 430, 2021.
- Ziegler, C. et al. The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: from antigen-reactivity to *in vivo* anergy. **EMBO molecular medicine**, v. 3, n. 11, p. 652-666, 2011.

RELAÇÃO ENTRE A HIPERQUERATOSE, A OCORRÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA E A INFLUÊNCIA NA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM VACAS LEITEIRAS NA BAHIA E MINAS GERAIS

Marina Ferreira Borges¹, Mariana Brant D. M. Dornas², Pamela Micheli Furini³, Bárbara de Lima Sinis⁴, Isadora Marugeiro de Paula Teodoro⁵

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

²Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

³Universidade Estadual do Norte do Paraná, Jacarezinho, Brasil ⁴Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. ⁵Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é caracterizada por uma inflamação da glândula mamária, de origem infecciosa ou traumática e pode ser classificada como clínica ou subclínica (Coser et al., 2012).

Na mastite clínica, é possível notar alterações visíveis no leite e no animal. Essas alterações são perceptíveis na cor, grumo, pus, odor ou ausência de leite. Já o diagnóstico de mastite subclínica é dado apenas pela interpretação de exames laboratoriais, não sendo observadas alterações visuais no leite.

A principal barreira física para evitar essas infecções mamárias é o canal do teto (Grindal, 1988). Esse é revolto por um esfíncter e por camadas de queratina (Veigas, 2019). A musculatura do esfíncter se mantém fechada entre as ordenhas e impede a entrada de patógenos e ascensão para dentro da glândula mamária.

Uma rotina de ordenha ineficiente associada a equipamentos com alto nível de vácuo, mal calibrados, com elevado índice de sobreordenha ou utilização de produtos irritativos (Veigas, 2019), podem causar danos à saúde da glândula mamária e aumentar os índices de mastites.

As agressões de origem mecânica à pele permitem um crescimento acentuado de queratina da extremidade do teto, formando um anel em seu orifício, chamado de hiperqueratose.

O objetivo deste estudo foi avaliar a correlação entre o grau de hiperqueratose e a ocorrência de mastite clínica e interferência na contagem de células somáticas do leite (CCS) em diferentes perfis de fazendas do Estado de Minas Gerais e Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados dados do grau de hiperqueratose, ordem de parto, dias em lactação, número de casos de mastite clínica e subclínica de uma fazenda localizada na Bahia, e duas em Minas Gerais, Brasil. O período de avaliação do estudo foi de 16 meses, de janeiro de 2021 a maio de 2022.

Na fazenda 1, a compilação de dados foi feita no Excel, com anotações da identidade do animal, data, dias em lactação, quarto afetado pela mastite clínica e escore de esfíncter. O conjunto de dados continha avaliação de 1303 casos de mastite clínica, sendo 1082 vacas analisadas em relação ao escore de esfíncter e 4312 esfíncteres. Foram compilados dados de 660 vacas da fazenda 2 e 3, coletados pelo Software Ideagri.

O escore de esfíncter foi classificado de 1 a 4, em que o escore 1 (nenhum anel ou lesão na extremidade do teto); escore 2 (anel pequeno); escore 3 (anel com rachaduras); e escore 4 (anel protuberante com rachaduras e tecido queratinizado).

Foi utilizado a programa estatístico InfoStat para avaliação da correlação entre as variáveis de grau de hiperqueratose e mastite clínica, além da avaliação de ordem de parto, dias em lactação e contagem de células somáticas, valor passado para escore de células somáticas (ECS) por apresentar distribuição normal. Já para avaliação da relação entre grau de hiperqueratose e a mastite clínica, foi utilizado o teste t de student, de amostras independentes, separando em grupo controle as vacas que apresentaram média de escore de esfíncter até 1 e grupo de risco vacas que apresentaram média de escore de esfíncter acima de 1. A definição de mastite clínica foi dada como qualquer alteração no leite (sangue, pus, leite aquoso, presença de grumo ou ausência de leite) e mastite subclínica como a contagem de células somáticas acima de 200.000 céls./mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O t crítico=1,645 (sig =0,05) em que o t de student foi de -3,314, apontou que houve diferença significativa entre o grupo controle (grau de hiperqueratose menor ou igual a 1), e o grupo de risco (grau de hiperqueratose maior que 1). A porcentagem de vacas que apresentaram mastite clínica e um escore de esfíncter > 1, foi de 94,81%. A partir do escore de esfíncter 1, foi possível observar que as chances da vaca de contrair uma mastite clínica seria 0,48 vezes maior, Tabela 1, (OR=0,489), do que de uma vaca que apresentou um escore de esfíncter menor que 1.

A correlação (r) 0,19 entre o grau de hiperqueratose e aumento do escore de células somáticas demonstrou ser positiva e fraca. Isso pode ocorrer devido à variância do escore de células somáticas em relação ao ambiente, tipo de patógeno e imunologia da vaca. Na avaliação, o DEL (dias em lactação), apresentou correlação (r) de 0,02, demonstrando um baixo impacto e a OP (ordem de parto), apresentou correlação de 0,40, apresentando maior impacto conforme o aumento do escore de células somáticas. Porém, foi possível notar que 86,45% das vacas doentes (com mastite subclínica) apresentaram um escore de esfíncter maior que 1. Além disso, as chances de a vaca contrair uma mastite subclínica com um grau de hiperqueratose acima de 1 foi 0,67 vezes maior do que o de uma vaca que apresenta um grau de hiperqueratose menor ou igual a 1, (OR=0,67), Tabela 1.

Tabela 1 - Avaliação estatística entre o grau de hiperqueratose e a ocorrência de mastite clínica (Fazenda 1) e mastite subclínica (Fazenda 2 e 3) em Minas Gerais e Bahia.

Variável	N	OR	%MC >1	%MSC >1	r
Mastite clínica	1082	0,48	94,81%		
Mastite subclínica	660	0,67		86,45%	0,19

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo comprovou um grau de significância positivo entre o escore de esfíncter e a ocorrência de mastite clínica em vacas durante a lactação, e além disso, comprovou uma maior ocorrência de mastite subclínica em vacas que apresentaram maior grau de hiperqueratose, que pode ser influência também pela ordem de lactação das vacas e dias em lactação em menor grau. Dessa forma, medidas como a avaliação do equipamento de ordenha, prevenção dos fatores de riscos no processo de ordenha e pós-ordenha, além do manejo das vacas devem ser implementadas na fazenda a fim de prevenir a pressão de infecção e mitigar os casos de mastite bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Mein, G. A., F. Neijenhuis, W. F. Morgan, D. J. Reinemann, E. Hillerton, J. R. Baines, I. Ohnstad, M. D. Rasmussen, L. Timms, J. S. Britt, R. Farnsworth, N. Cook, and T. Hemling. 2001. **Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. Pages 347–351 in AABB-NMC Int. Symp. Mastitis Milk Quality Proc.**, Vancouver, BC, Canada. National Mastitis Council, Madison, WI.

PANTOJA, J. C. F. et al. Association between teat-end hyperkeratosis and mastitis in dairy cows: A systematic review. *J. Dairy Sci.* São Paulo, v. 103, n. 2, p.1-13, out/2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16811>. Acesso em: 1 jun. 2022.

Santos, Marcos; Fonseca, Luis. **Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções.** 1ª edição. Pirassununga - SP: Edição dos autores, 2019. 301 p.

RELATO DE CASO: IMPACTOS DA IMPLEMENTAÇÃO DA TERAPIA SELETIVA DE VACA SECA, BASEADA NO CULTIVO MICROBIOLÓGICO, NA SAÚDE DE GLÂNDULA MAMÁRIA DE UM REBANHO COMERCIAL

Felipe Zanforlin Freitas¹, Laura Christina Soares¹

¹Evoluir Saúde do Leite, Patos de Minas, Minas Gerais

INTRODUÇÃO

Uma das preocupações do setor primário é a produção de alimentos de forma segura, considerando a saúde do consumidor. O uso indiscriminado de antibióticos no controle da mastite em fazendas leiteiras, está diretamente relacionado ao aumento na resistência antimicrobiana, além de aumentar os riscos de resíduos de antibióticos no leite. A mastite é o principal motivo para o uso de antimicrobianos na pecuária leiteira. O principal uso desses antimicrobianos ocorre pela via intramamária (IM), seja durante a lactação ou no momento da secagem. No momento da secagem, a terapia de vaca seca (TVS), tem como objetivo curar infecções adquiridas durante a lactação, e prevenir novas infecções que possam ocorrer durante o período seco.

A terapia seletiva de vaca seca (TSVS), é uma medida de tratamento, em que vacas com quartos mamários sadios no momento da secagem, e em baixo risco de se infectarem durante o período seco, são selecionadas para receber apenas selante interno de teto no momento da secagem. Essa medida de manejo visa reduzir, ainda mais, o uso inapropriado de antimicrobianos na produção de leite. O tratamento pode ocorrer a nível do quarto mamário ou da vaca. As metodologias utilizadas para definir o tratamento variam, da avaliação por algoritmos embasado no histórico da contagem de células somáticas (CCS), mastite clínica (MC) e outras doenças, ou no CMT (California Mastitis Test), ou a cultura microbiológica dias antes da secagem.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo ocorreu em uma fazenda com 220 vacas holandesas em lactação, em sistema de compost barn, média de 38 kg de leite vaca/dia. O período seco era em sistema de piquete, boa cobertura vegetal e área de sombreamento. 30 Dias da data esperada do parto, as vacas eram movidas para o sistema confinado. As vacas recebiam duas doses da vacina J5 antes do parto, secagem e 30 dias após.

Durante o ano de 2019 foi realizado a terapia geral de vaca seca (TGVS) em todos os quartos mamários (n= 485) de 122 vacas secas. De janeiro de 2020 a novembro de 2021 a TSVS foi implementada, envolvendo 183 vacas secas e (n=724) quartos mamários.

A metodologia utilizada para selecionar o tratamento na secagem, foi o cultivo de leite em ágar sangue por quarto mamário 3 dias antes da secagem. A inoculação foi realizada com amostras frescas e refrigeradas, e a interpretação dos resultados foi realizada em 24 e 48 horas. Foi considerada infecção intramamária (IIM) quando estavam presentes no mínimo 3 colônias do mesmo microorganismo após a incubação a 37°C. A coleta das amostras de leite, foi realizada de forma asséptica seguindo os protocolos do National Mastitis Council (NMC). Os quartos positivos receberam antibiótico + selante (ATB+SEL), enquanto os negativos receberam apenas selante (SEL). Vacas com outros problemas de saúde, e mais de um caso de MC na lactação, receberam antibiótico intramamário em todos os quartos. O antibiótico utilizado era composto por 600,00 mg de cloxacilina benzatina, e o selante interno à base de subnitrato de bismuto.

Após o parto, foi avaliado a incidência de casos clínicos de mastite, (%MC = quartos infectados MC/total de quartos secos no período) em diferentes períodos, 0 a 30 e 0 a 90 dias após o parto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo de vacas que receberam a TGVS apresentou 1,0% (5/485) casos de mastite clínica até 30 dias pós-parto, e 3,1% (15/485) até 90 dias pós-parto. O grupo que foi submetido a TSVS apresentou 1,1% (8/724) casos de mastite clínica até 30 dias pós-parto, e 5,1% (37/724) até 90 dias pós-parto. Das vacas que receberam a TSVS e que apresentaram MC pós-parto até 90 dias, 43% (16/37) dos quartos foram secos apenas com SEL, e 57% (21/37) foram secos com ATB+SEL. A TSVS reduziu 51% (366/724) o uso de antibiótico intramamário no momento da secagem.

Numericamente, a incidência de mastite clínica até 30 dias pós-parto entre os dois tratamentos foi similar. Na avaliação até 90 dias, a incidência de MC foi numericamente, mais elevada no grupo TSVS quando comparada com o TGVS. Porém quando avaliamos o tratamento estabelecido nos quartos que tiveram MC pós-parto das vacas em TSVS, temos mais casos em quartos que receberam ATB+SEL (57%) do que nos quartos que receberam apenas SEL (43%).

O sucesso da implementação da TSVS, se deve a presença de uma mão de obra qualificada para garantir qualidade nos processos de coleta, inoculação e leitura das placas. Além disso, garantir boas práticas de manejo como higiene do ambiente das vacas secas e pré-parto, controle de lesões de orifício de teto e controle de doenças metabólicas no período de transição.

Um dos desafios para a implementação da TSVS, foi o tempo investido da mão de obra na execução dos processos de diagnóstico. Devido ao tamanho do rebanho, esse fator não teve muita influência negativa na implementação.

Alguns estudos como (Rowe et al., 2020), validaram o uso da TSVS por cultivo microbiológico a nível de vaca, apresentando resultados médios de redução de uso de antibiótico IM de 31,9% a 61,8% em diferentes rebanhos sem comprometimento da saúde de glândula mamária após o parto, quando comparado a vacas que receberam a terapia de vaca seca em todos os quartos mamários. Nesse mesmo estudo, com o uso de algoritmos para seleção de vacas, a redução do uso de antibióticos foi de 18,9% a 68,4% em diferentes rebanhos.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O relato de caso validou o uso da TSVS sem comprometimento a saúde de glândula mamária após o parto do rebanho acompanhado. Rebanhos que possuem boas práticas de manejo preventivo da mastite durante o período seco, podem ter vacas secas apenas com selante interno a nível de quarto mamário. Essa medida garante a redução do uso de antibióticos, e a produção de leite mais responsável levando em consideração as demandas de um consumidor final mais exigente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rowe, S. M., Godden, S. M., Nydam, D. V., Gorden, P. J., Lago, A., Vasquez, A. K., Royster, E., Timmerman, J., and Thomas, M. J., 2020. Randomized controlled non-inferiority trial investigating the effect of 2 selective dry-cow therapy protocols on antibiotic use at dry-off and dry period intramammary infection dynamics. **J. Dairy Sci.** 103:6473–6492 <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17728>.
- Theo, J. G. M., Jansen, J., Wessels, R. J., 2018. The Challenge of Changing the Mindset Toward Antimicrobial Use. **018 Regional Meeting**, June 20-22, 2018, Guelph, Ontario, Canada.

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

Ewerton Lima^{1,2}, Bernardo Araújo¹, Abraão Batista¹, Raphael Ordonho^{1,2}, Alice Nascimento^{1,2}, Fernando Souza^{1,2,3}, Artur Fernandes^{1,2}

¹Núcleo Aplicado à Produção e Sanidade da Glândula Mamária, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil. ³Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a enfermidade mais comumente presente em rebanhos leiteiros de todo o mundo. O *Streptococcus agalactiae* destaca-se como um dos principais agentes da mastite bovina, com sua característica contagiosa, sendo responsável pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS) e Contagem padrão em placa (CPP) diminuindo a qualidade do leite do tanque e consequentemente o produto final. Além disso, este patógeno também possui papel importante do ponto de vista de saúde pública, devido seu potencial zoonótico e transmissão interespecíes (Cobo-Angel et al., 2019).

O controle da mastite bovina por *Streptococcus agalactiae* tem como uma de suas principais ferramentas o uso de antimicrobianos intramamários, sendo recomendada a instituição da blitz terapia para o controle e erradicação do patógeno em rebanhos leiteiros. Contudo, vale ressaltar, que o uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária é uma das principais causas de resistência microbiana trazendo implicações para a saúde pública.

Desta forma, a realização de estudos acerca do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *S. agalactiae* isolados de mastite bovina é fundamental para uma melhor percepção do problema de resistência em *S. agalactiae* em âmbito regional e nacional. Portanto, este trabalho objetivou avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de mastite clínica e subclínica em rebanhos do Brejo e Cariri paraibano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 448 amostras de leite procedentes de três propriedades leiteiras da região do Cariri e Brejo paraibano entre o período de junho de 2021 a março de 2022. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário do CCA-UFPB. A identificação dos *S. agalactiae* foi realizada através das características macroscópicas da colônia, perfil de hemólise, além da coloração de gram e o teste CAMP para confirmação. Os isolados foram ainda submetidos ao teste de identificação bacteriana por Espectrometria de Massa por Ionização com Dessorção à Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF MS). Os mesmos foram então testados quanto à susceptibilidade a amicacina (30 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (10 µg), ampicilina (10 µg), azitromicina (15 µg), cefalexima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), norfloxacina (10 µg), penicilina (10 UI), e tetraciclina (30 µg), utilizando o método de disco difusão de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2019). Os antimicrobianos foram selecionados levando-se em consideração seu uso no tratamento de mastite em bovinos e/ou medicina humana, bem como, a disponibilidade na rotina laboratorial. Uma suspensão bacteriana em solução salina estéril de uma cultura pura foi ajustada para uma turbidez de 0,5 na escala McFarland e em seguida inoculada em Agar Muller-Hinton

acrescido de sangue ovino a 5%. Os discos de antimicrobianos foram colocados sob a superfície do inóculo no ágar e as placas foram incubadas durante 24 horas a 37°C. Os diâmetros das zonas de inibição foram então mensurados e os dados interpretados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, 448 amostras de leite de vacas foram analisadas, das quais foram isoladas 148 cepas de *S. agalactiae*, representando uma taxa de isolamento de 33,03%. Dos isolados, 6,08% (9/148) estavam relacionadas a casos de mastite clínica, ao passo que, 93,92% (139/148) associavam-se com casos de mastite subclínica.

A penicilina foi utilizada como antimicrobiano de primeira escolha para a prevenção e terapia dos estreptococos do grupo B (GBS) nos três rebanhos estudados. No presente estudo podemos observar que 16,89% desses isolados (25/148) apresentaram resistência à penicilina, resultado similar ao encontrado por Cobo-Angel et al. (2019) e inferior ao achado por Han et al. (2022).

Tais resultados podem justificar-se pelo constante uso indiscriminado de antimicrobianos em propriedades produtoras de leite na região. A redução da susceptibilidade de cepas de *S. agalactiae* a beta-lactâmicos isoladas de mastite bovina e humana foi relatada por Cobo-Angel et al. (2019). Foi possível observar no presente estudo a elevada resistência dos isolados à tetraciclina (94,67% - 71/75), podendo ser explicado principalmente devido a presença de genes de proteção *tet(M)* ou *tet(O)* ou por *tet(K)* e *tet(L)* (Rubio-López et al., 2012). Em relação a resistência e sensibilidade aos macrolídeos dos isolados observou-se que 34,74% (33/95) mostraram-se resistentes a eritromicina, enquanto para azitromicina 90,70% (78/86) apresentaram sensibilidade no teste.

A ausência de resistência à ampicilina, observada em 62 isolados de *S. agalactiae* neste estudo, corrobora com os achados de Cobo-Angel et al. (2019) no qual a maioria dos isolados foram sensíveis a este antimicrobiano. Nossos achados apresentam uma expressiva taxa de sensibilidade a ceftriaxona (100% - 53/53), no entanto, um estudo realizado na china por Han et al., (2022) observou-se que 98,1% dos seus isolados de *S. agalactiae* de mastite clínica apresentaram resistência a esse beta-lactâmico. Já para a amicacina, foi possível observar uma sensibilidade de 88,37% (48/53), além disso, uma alta taxa de resistência a norfloxacin (100% - 78/78) foi detectada neste estudo. Por fim, os isolados de *S. agalactiae* apresentaram uma considerável taxa de sensibilidade a outros beta-lactâmicos tais como cefalexima (55/70; 78,57%) e amoxicilina associada a ácido clavulânico (90/95; 94,74%).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo sugerem que a resistência à penicilina pode está surgindo na região nordeste, demonstrando a necessidade de mudança quanto ao uso indiscriminado de antimicrobianos e propondo o uso racional e criterioso dos mesmos em propriedades leiteiras da região. Nesse sentido, faz-se necessário uma ampla ação na região para o controle do *Streptococcus agalactiae*, com vistas a minimizar não apenas as perdas causadas por esta infecção, como também a exposição do respectivo microrganismo a uma elevada pressão de seleção e promover a mudança do perfil de resistência do mesmo, pondo em risco as atuais ferramentas de controle desta insidiosa infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cobo-Angel, C. G., et al. Potential group B *Streptococcus* interspecies transmission between cattle and people in Colombian dairy farms. **Scientific Reports**, v. 9, 14025, 2019.
- Han, G., et al. Molecular Typing and prevalence of antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from Chinese dairy cows with clinical mastitis. **Plos One**, v. 17, e0268262, 2022.

Rubio-Lopez, V., et al. Molecular Epidemiology, Antimicrobial Susceptibilities and Resistance Mechanism of Streptococcus Pyogenes Isolates Resistant to Erythromycin and Tetracycline in Spain, (1994-2006). **BMC Microbiology**, v. 12, 215, 2012.

SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS RESISTENTES CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA A EXTRATOS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO

Ângela Vitalina Barbosa de Assis Silveira¹, Emanuelle Azambuja Lima², Lucas Zaiden², Ariel Eurides Stella³

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Jataí. ²Mestrando do PPG em Biociência Animal da Universidade Federal de Jataí. ³Professor da Unidade de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Jataí

INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos resistentes na pecuária se estabelece como um problema de saúde pública, uma vez, que esses microrganismos podem chegar aos consumidores através de produtos contaminados. Além disso promove dificuldades dentro do processo produtivo, porque as opções de tratamento ficam limitadas (Silva e Lincopan, 2012). As ESBL (β -lactamases de espectro estendido) estão entre os principais mecanismos de resistência das bactérias Gram-negativas em que os microrganismos são capazes de inativar cefalosporinas, penicilinas e aztreonam, sendo as cefalosporinas o princípio ativo mais comumente utilizado no tratamento de mastites. O gene responsável pela resistência está, geralmente, contido em um plasmídeo e os grupos de ESBL que apresentam maior capacidade de interação e transmissão, são CTX-M, SHV e TEM. Os antibióticos convencionais nem sempre se mostram eficientes no combate a mastite, além de promoverem grande impacto econômico e epidemiológico, visto que existe o risco de resíduo no leite. Desta forma o uso de fitoterápicos tem se tornado uma possível alternativa. Plantas podem possuir compostos antimicrobianos e a aplicação em bactérias causadoras de mastite pode promover benefícios terapêuticos. Foi objetivo avaliar a sensibilidade de bactérias resistentes causadoras de mastite frente a extrato de *Lafoensia*, *Stryphnodendron adstringens* e *Hymenaea* sp. Também foi investigada a presença dos genes CTX-M, SHV e TEM nos isolados. Trazendo novas possibilidades de fitoterápicos para uso em bactérias multirresistentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 19 isolados oriundos de leite de vacas com mastite subclínica, identificados bioquimicamente, e pertencentes ao acervo da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Veterinária da UFJ. Para a realização das PCRs foi feita a extração de DNA por lise térmica. Foram investigados os grupos SHV, TEM e CTX-M. As reações de PCR foram montadas com um volume final de 25 μ l, sendo 12,5 μ l de Promega Mix 0,5 μ l de cada primer; 5 μ l de água ultrapura e 2,5 μ l de DNA (Bajpai et al., 2017). Todos os produtos foram analisados em gel de agarose com 1,5% de brometo de etídio e processados a 100V por 1h30 min. Foi realizado o antibiograma pelo método de disco difusão em ágar Muller-Hinton com uso de clindamicina, ciprofloxacina, gentamicina, cefoxitina e vancomicina para as bactérias Gram-positivas. Para as Gram-negativas foram utilizados cefoxitina, cefalotina, cefotaxima, amoxiciclina com clavulanato, ampicilina, piperaciclina com tazobactam, imipenem e cefepime. O material botânico de [*Lafoensia pacari* A.St.-Hil. (Dedaleiro); *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão); *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá)] foi obtido no município de Jataí, na região sudoeste do estado de Goiás (GO). Foram utilizados galhos contendo folhas verdes, e a identificação botânica das espécies realizada pelo Herbário Jataiense (HJ) da Universidade Federal de Jataí-UFJ. Os extratos foram fabricados das folhas do jatobá e do dedaleiro e da casca do barbatimão (Silva Junior et al., 2010). Os extratos foram testados nas concentrações de: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,5%. Os isolados foram cultivados em meio BHI, e diluídos em solução salina (9×10^8 UFC/ml). Foram realizados três testes independentes, utilizando-se a metodologia de microdiluição

seriada em microtubos (meio de culturas + bactérias + extratos), cultivados por 24h a 37°C. A concentração inibitória mínima foi definida por meio da quantificação de células bacterianas (UFC/mL) viáveis em cada concentração testada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das oito enterobactérias testadas (2 *Enterobacter sp.* e 6 *E. coli*) apenas uma apresentou o gene *TEM* e uma apresentou o gene *CTX-M*, mas nenhuma apresentou o gene *SHV*. Foi encontrado 50% de resistência a cefoxitina, 25% a cefotaxima, 100% a cefalotina, 37,5% a amoxiciclina + clavulanato, 12,5% ao Imipenem e 12,5% de resistência a cefepime, e não foram encontrados isolados resistentes a piperaciclina com tazobactan, sendo 50% bactérias multirresistentes. Foi detectada a presença de resistência a β -lactâmicos associada a presença de genes de resistência. Destaca-se o isolado 31, um *Enterobacter sp.* multirresistente portador do gene *TEM*. Analisando os isolados de *S. aureus* observou-se 36,36% de resistência a clindamicina, 09% de resistência a ciprofloxacina e 54,54% de resistência à vancomicina. Supreendentemente nenhum isolado apresentou resistência a gentamicina, sendo que 55% apresentaram multirresistência. Foi observada 36,36% de resistência cefoxitina, caracterizando-se como MRSA. A resistência a vancomicina também foi detectada em 36,36 % dos isolados caracterizando-os como VRSA.

Na busca por fitoterápicos alternativos a resistência antimicrobiana, foi observado que 63,16% dos isolados foram sensíveis a alguma concentração do extrato de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), sendo 42,1% destes *S. aureus*. Para o *Hymenaea courbaril* (jatobá) 21,05% dos isolados foram sensíveis, sendo todos *S. aureus*. Para o *Lafoensia pacari* (dedaleiro) foi possível observar 84,21% de sensibilidade geral, sendo 47,37% para *S. aureus* e 36,84% para as bactérias Gram-negativas. A planta foi a que apresentou melhores características antimicrobianas e não possui estudos relacionados a atividade antimicrobiana em mastite. O Dedaleiro teve maior eficiência e o Jatobá menor eficiência, frente aos microrganismos causadores de mastite, sendo que somente as amostras de *S. aureus* apresentaram inibição pelo Jatobá. As bactérias apresentaram sensibilidades em diferentes concentrações dos extratos mostrando a eficiência em concentrações variadas.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram identificados isolados ESBL, MRSA, VRSA e multirresistentes de casos de mastite bovina subclínica. Desta forma é fundamental a necessidade de criar alternativas que atendam à demanda do controle desses microrganismos para esta importante atividade econômica. As bactérias apresentaram sensibilidade para os extratos de *Lafoensia*, *Stryphnodendron adstringens* e *Hymenaea sp.*, em diferentes concentrações, mostrando que podem se tornar uma alternativa para o combate aos microrganismos causadores de mastite. O uso de extrato de plantas nativas do cerrado pode ser relevante no âmbito da produção sustentável de bovinos de leite, especialmente no controle da mastite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bajpai, T. et al. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. **Avicenna journal of medicine**, v. 7, n. 01, p. 12-16, 2017.
- Silva Junior, I.F. et al. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 422-428, 2010.
- Silva, K. C., Lincopan, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 91-99, 2012.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS-CURE RELATED ANTIGENS TRIGGER TYPE 3 IMMUNOLOGICAL MEMORY T CELLS

Kamila R. Santos¹, Ana Cláudia Dumont Oliveira¹, José Augusto Ferronato¹, Eduardo Milton Ramos Sanchez^{2,3}, Mônica Cerqueira⁴, Marcos Bryan Heinemann⁵, Fernando Souza^{1,6}, Alice M. M. P. Della Libera¹

¹Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ²Department de Saúde Pública, Escola de Health Sciences, National University Toribio Rodriguez de Mendoza of Amazonas, Chachapoyas, Peru. ³Laboratório de Sorologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ⁴Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. ⁵Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁶Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Paraíba, Areia 58397-000, Brazil

INTRODUCTION

Bovine mastitis is a mammary gland inflammation that is typically caused by bacteria. *Staphylococcus aureus* is one of the most significant mastitis pathogens, and it continue to be an important issue for the dairy industry globally related to its pathogenicity, contagiousness, persistence of intramammary infections (IMIs), and resistance to antimicrobial therapy. Thus, *S. aureus* mastitis creates an urgent demand for innovation and searches for efficient alternative non-antibiotic approach to its prevention and/or therapy. The search for an effective vaccine for bovine mastitis has been the subject of several studies over the years, nonetheless it has focused mostly on humoral response. However, there is growing evidence that the humoral response does not provide satisfactory defense against *S. aureus* infection. As a result, vaccines against *S. aureus* mastitis are currently only effective in reducing the severity of clinical cases and improving the chances of curing of existing IMI.

Therefore, we believe that the issue should also be viewed from other perspectives, such as mapping animal responses that mounted successful pathogenhosted immune responses; in doing so, we can discover new potential targets that provide a foundation for the development of alternative therapies.

Thus, in the present study, we propose the evaluation of the immune response induced by three recombinant proteins of *S. aureus*, so-called elongation factor-G (EFG), enolase (ENO), and phosphoglycerate kinase (PGK) in association with GM-CSF DNA vaccine in mouse for future development of the use in the dairy cow.

MATERIALS AND METHODS

For this study twenty-three C57BL/6 mice were divided into four groups of six animals each and immunized with: G1: none (control); G2: GM-CSF DNA plasmid vaccine; G3: the combination of EF-G+ENO+PGK recombinante proteins; and G4: the combinations of EF-G+ENO+PGK recombinant proteins plus GM-CSF DNA plasmid DNA vaccine. The GM-CSF gene was used to produce the DNA vaccine as described by Santos et al (2021). After 44 days, (14 days after the last administration of the recombinant proteins) spleen cells were collected for immunophenotyping and lymphocyte proliferation evaluation by flow cytometry using specific monoclonal antibodies upon *S. aureus* stimulus, as previously described (Santos et al., 2021). An udder-adapted *S. aureus* isolates originated from a case of persistent subclinical IMI was

used. *Staphylococcus aureus* (spa typing t605) inoculum was prepared as previously described (Souza et al., 2016) with minor modifications (Santos et al., 2021). The bacterial concentration was adjusted to the final inoculum dose (2×10^8 staphylococci mL^{-1}) to obtain 10 bacteria per cell. The production of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-17A, and tumor necrosis factor (TNF)- α was determined in the supernatant of control or *S. aureus*-stimulated spleen cell culture. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). To assess the percentage of each lymphocyte subpopulation, and the percentage of proliferative cells (ki67⁺), a stimulation index (SI) was calculated dividing the percentage of positive cells or geometric mean fluorescence intensity (GMFI) upon *S. aureus* stimulation per those unstimulated control. For the statistical analyses the Shapiro-Wilk tests were used to analyze the normal distribution. The parametric data were subjected to a One-Way ANOVA analysis followed by the Tukey test. Variables with non-parametric distributions were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's test. $P \leq 0.05$ was set as significant unless otherwise indicated.

RESULTS AND DISCUSSION

Animals vaccinated with the combination of recombinant proteins exhibited higher SI values in the intensity of IL-17A production by overall lymphocytes when compared to other groups ($P < 0.05$), which is an essential target for an effective vaccine (Rainard et al., 2020). However, analyzing distinct populations, we only detected a tendency toward a higher SI in intensity of IL-17A production in animals immunized with the combination of recombinant proteins when compared with both groups that received the GM-CSF DNA vaccine alone, such as in overall memory T cells, T CD4⁺ lymphocytes, TCRV γ 4⁺ cells, and T CD8⁺ central memory cells. These findings imply that maintaining a type 3 cell immunity environment depends on the involvement of the combined lymphocyte populations. Recently, it has been determined that the most significant population that offers protective immunity against future infections by *S. aureus* is a population of memory TCRV4⁺ cells that are predominantly IL-17A-producing. We found that this subpopulation tended to have higher SI of the IL-17A⁺.

The GM-CSF DNA vaccination favors an increase in the SI of TCRV γ 4⁺ effector memory cells ($P = 0.06$), while dampens TCRV γ 4⁺ central memory cells ($P = 0.001$). Our results did not demonstrate a significant improvement in T-cell mediated immunity of the three *S. aureus* cure-associated antigens increased by GM-CSF DNA vaccination, despite the fact that GM-CSF is a crucial mediator of the immune response. Although, we do not have any clear idea of this paradox, it has been postulated that it depends on numerous factors, including the immunogen(s), the dose and timing of GM-CSF administration. Thus, the vaccination with the three recombinant proteins alone appears as a better strategy than together with the GM-CSF DNA vaccine. Furthermore, immunization did not affect the levels of IL-2 and IL-4 and IL-6 cytokines. The concentrations of IL-10, IL-17A, TNF- α and IFN- γ were below the limit of the detection.

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

The vaccination with three *S. aureus* cure-associated recombinant proteins was able to trigger the type 3 immune response, by both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR⁺ cells, in splenocytes challenged with *S. aureus*. The potential for a chimeric vaccine with specific immunestimulatory properties, as demonstrated here, deem an additional and highly interesting path to pursue.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

Santos, K. R., Souza, F. N., Ramos-Sanchez, E. M., Batista, C. F., Reis, L. C., Fotoran, W. F., Heinemann, M. B., Goto, H., Gidlund, M., Cunha, A. F., Faria, A. R., Andrade, H. M., Lage, A.P., Cerqueira, M. M. O. P., Della Libera, A. M. M. P. Staphylococcus aureus protection-related type 3 cell-mediated immune response elicited by recombinant proteins and GM-CSF DNA vaccine, **Vaccines**. 9 (2021)1–16.

Souza, F. N., Piepers, S., Della Libera, A. M. M. P., Heinemann, Cerqueira, M. M. O. P., De Vliegher, S. Interaction between bovine-associated coagulase-negative staphylococci species and strains and bovine mammary epithelial cells reflects differences in ecology and epidemiological behavior, **J. Dairy Sci**. 99 (2016) 2867–2874.

Rainard, P., Cunha, P., Martins, R. P., Gilbert, F. B., Germon, P., Foucras, G. Type3 immunity: a perspective for the defense of the mammary gland against infections. **Vet Res**. 2020;51(1):129. Published 2020 Oct 15. doi:10.1186/s13567-020-00852-3.

***Staphylococcus* COAGULASE POSITIVOS (SCP) E *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVOS (SCN) EM VACAS COM MASTITE: CCS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

Emanuelle Azambuja Lima¹, Ângela Vitalina Barbosa de Assis Silveira¹, Lucas Zaiden², Angélica Franco de Oliveira³, Ariel Eurides Stella³

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Jataí. ²Mestrando do PPG em Biociência Animal da Universidade Federal de Jataí. ³Professor da Unidade de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Jataí

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença infecciosa mais frequente observada na pecuária leiteira do sudoeste goiano, afetando as glândulas mamárias e causando redução na produção de leite. Deriva principalmente de patógenos comuns no úbere, como estafilococos, estreptococos e espécies coliformes (Ruegg, 2017). Um dos gêneros mais frequentemente relacionado a doença, é o *Staphylococcus* sp. Dentre estes podemos destacar os *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) e os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN). Apesar destes grupos também causarem mastite clínica, uma proporção relativamente alta de vacas leiteiras tem mastite subclínica; isto é, inflamação do úbere como indicado por uma contagem de células somáticas (CCS) elevada, mas sem sinais de mastite clínica. A mastite subclínica também afeta a produção e a qualidade do leite e é caracterizada pela presença de componentes inflamatórios no leite (Heringstad et al., 2000). O ambiente do úbere é um local onde as bactérias podem trocar material genético, seja por conjugação ou pela simples absorção de DNA livre de outras bactérias já mortas. Essas trocas propiciam a dispersão de genes de resistência aos antibióticos. Informações acerca dos grupos bacterianos, perfis de resistência e perfil inflamatório presentes no úbere, são fundamentais para elucidarmos características relacionadas a mastite e a sua epidemiologia. Foi objetivo deste estudo identificar bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. presentes no leite de vacas com mastite, correlacionando esta presença com a CCS e a resistência antimicrobiana.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras (n=90) foram coletadas em uma granja leiteira localizada no município de Jataí-GO, com sintomatologia de mastite clínica ou subclínica. O transporte ocorreu em caixa de isopor e mantidas a 4° C até o início das análises. Assim que as amostras chegaram ao laboratório, foram analisadas e selecionadas para cultivo. Para o isolamento dos Estafilococos e a identificação das espécies as amostras foram semeadas no ágar Manitol e cultivados por 24h a 35°C, as colônias características (3 de cada placa) foram repicadas, foi feita coloração de Gram e identificadas bioquimicamente através dos seguintes testes: prova da catalase, teste da coagulase, sensibilidade a furazolidone e bacitracina, prova de DNase. O antibiograma dos isolados foi realizado por meio de disco-difusão para os seguintes antibióticos: cefoxitina, oxacilina, vancomicina, penicilina, sulfazotrim, clindamicina, gentamicina e ciprofloxacina. A propriedade realiza a quantificação de CCS, através do envio ao laboratório credenciado Clínica do Leite disposto pela Portaria Nº 259, DE 02 DE DEZEMBRO DE 2019 do MAPA, que estipula a realização da CCS de forma eletrônica segundo estabelecido na ISO 13366-2:2006.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras analisadas, 53 foram positivas (58.9%) para a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* sp., dos grupos *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP=5; 5,5%) e *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN=48; 53,3%). Os SCP foram relacionados com mastite clínica e subclínica. Já os SCN causaram

predominantemente mastite subclínica (68.75%). Com relação a CCS dos animais doentes, as vacas infectadas com SCP tiveram uma média de 953.000/mL. Enquanto as vacas infectadas com SCN tiveram uma média de 909.000/mL, entretanto neste grupo duas vacas sozinhas tinham contagens altíssimas (vaca 917: 9.621.000/mL, vaca 778: 7.508.000/mL), aumentando a média do grupo (sem estes dois animais a média do grupo SCN cai para 576.000/mL).

Destas amostras processadas, foram identificados 75 isolados, destes 5 (6,7%) foram identificados como multirresistentes, ou seja, eram resistentes a 3 ou mais classes de antimicrobianos. Além disso foram considerados *Staphylococcus* resistentes a Meticilina (MRS) todos aqueles isolados resistentes no teste de disco-difusão aos antibióticos marcadores cefoxitina e/ou oxacilina. Foram MRS 40% dos isolados. Normalmente isolados MRS carregam o gene *mecA*, que codifica a PB2a, um sítio alterado de ligação para os antibióticos beta-lactâmicos, ou seja, o antibiótico tem dificuldade de se ligar a parede celular da bactéria. As maiores resistências foram observadas para os antibióticos penicilina (69,3%) e vancomicina (58.6%). Enquanto as menores resistências foram observadas para ciprofloxacina (5,3%) e gentamicina (1,3%). Destaca-se a baixa resistência a gentamicina, um antimicrobiano muito utilizado na terapêutica da mastite bovina, entretanto este medicamento não estava sendo utilizado na propriedade. 58.9% das amostras foram positivas para a presença de bactérias do gênero *Staphylococcus sp.*, isto demonstra que este grupo bacteriano ainda é um importante agente causador de mastite, sendo os SCN os mais incidentes (53,3%) causadores de mastite neste rebanho.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram identificados SCN como agentes predominantes causadores de mastite bovina, principalmente sub-clínica em um rebanho bovino de alta produção. Uma alta CCS foi identificada nos animais infectados, onde também observou-se a influência individual dos animais na CCS do rebanho. Se destacam isolados MRS e vancomicina resistentes como causadores de mastite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Heringstad, B., Klemetsdal, G., Ruane, J. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. **Livestock Production Science**, v. 64, n. 2-3, p. 95-106, 2000.
- Ruegg, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.

SURTO DE MASTITE EM 2020 E 2021 CAUSADA POR *Mycoplasma bovis* EM UM REBANHO LEITEIRO NA CIDADE DE BAMBUÍ/ MINAS GERAIS: RELATO DE CASO

Isadora Marugeiro de Paula Teodoro¹, Bárbara de Lima Sinis¹, Mariana Brant Drumond Magalhães², Marina Ferreira Borges², Pamela Furini³

¹Graduanda do curso de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. ² Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. ³Escola de Veterinária, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Jacarezinho, Brasil

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite a nível mundial e essa atividade está em ascensão. A região sudeste assume a liderança de região de maior produção, sendo que o estado de Minas Gerais ocupa o ranking de primeiro lugar com a produção de 9,7 bilhões de litros por ano (CNA, 2021).

Na produção leiteira a mastite causa grandes perdas econômicas, uma vez que reduz a produtividade e gera gastos com tratamentos. Os principais patógenos envolvidos são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Mycoplasma spp* e *Streptococcus* ambientais (Dalanezi et al, 2020).

A distribuição do *Mycoplasma bovis* está disseminado mundialmente e atinge várias faixas etárias, justamente pelo seu perfil contagioso. Este agente está associado a casos de mastite, artrite e pneumonia em vacas, enquanto em bezerros levando a pneumonia, otite média e artrite são mais comumente observadas (Parker et al., 2017).

O *Mycoplasma spp.* não possui parede celular, o que compromete a atuação dos antibióticos, possui genoma pequeno e forma biofilmes. Em contrapartida, são suscetíveis a dessecação, sensibilidade ao congelamento, inativados pelo calor e por desinfetantes comuns (Parker et al., 2017). Diante disso, leva a um valor considerável de descarte de animais. A prevalência de *M. bovis* no rebanho, causando infecção do úbere ainda não é amplamente estudada, principalmente no Brasil. Tendo em vista o cenário apresentado, o presente estudo tem como objetivo relatar um surto de *Mycoplasma bovis* em um rebanho leiteiro na cidade de Bambuí/MG em 2020.

MATERIAL E MÉTODOS

Para ferramenta de estudo do presente trabalho, foram coletados dados de uma propriedade leiteira localizada no município de Bambuí, centro-oeste de Minas Gerais. A fazenda possui 800 hectares de extensão e rebanho de 1200 animais cruzados holandês e girolando, que são criados em sistema semi-intensivo, confinamento em piquetes na época da seca (maio a outubro) e a pasto no período das chuvas (novembro a abril), respectivamente. A fazenda possuía cerca de 500 animais em lactação no momento do surto por *Mycoplasma spp.* e nunca realizou compra de animais. A propriedade é dividida em dois retiros, sendo que no retiro 01 ficam os animais pré e pós parto, primíparas e vacas de alta produção, no retiro 02, vacas no final de lactação e próximas da secagem.

Inicialmente foram feitos os testes (PCR) dos animais suspeitos de forma individual em laboratório oficial e nos tanques de resfriamento com o leite de até 100 animais em cada. As coletas foram realizadas durante a ordenha utilizando material adequado, de acordo com NMC (1999), utilizando luvas, frascos estéreis, álcool 70° para desinfecção dos tetos e papéis descartáveis. Após a coleta as amostras foram congeladas e enviadas ao laboratório oficial em caixa térmica lacrada para pesquisa microbiológica de *Mycoplasma spp.* quanto para *Mycoplasma bovis*.

Para o diagnóstico são utilizados kits de extração e sequenciamento de DNA e PCR, o qual é considerado um teste com alta especificidade e sensibilidade para

diagnóstico de *Mycoplasma*. Além do tempo para o seu envio, o qual varia de acordo com a localidade e a forma, a análise e o seu consequente resultado levam cerca de 10 dias para ficar pronto.

Todos os dados foram coletados do programa Smartmilk 5.4 e do banco de dados provenientes dos 6 anos de consultoria, armazenados e analisados em planilhas de Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fazenda apresentava desafios com casos de mastite clínica no rebanho, tendo uma média de 18,1% de prevalência de casos em 2020 e 10,4% em 2021. Porém, nos meses de abril, maio e junho/2020 observou um aumento de alterações no leite (grumos e agalaxia), de 19,2%, 32,6% e 20,4%, respectivamente. Associado a essas alterações clínicas ocorreu variações na Contagem de Células Somáticas (CCS) do tanque, que apresentava média de 463 mil CS/ml e passou para 619, 646 e 647 mil CS/ml, correspondente a março, abril e maio de 2020. Portanto, é evidente que neste período houve aumento dos casos de mastites clínica e de subclínica, caracterizando-se como surto.

Nos meses de abril e maio/2020 ocorreram casos de mastite (21,3%) e queda brusca de produção (60,3%) em primíparas pós-parto. Essas estavam assintomáticas, com acometimento em mais de um quarto mamário e os protocolos mesmo com terapia estendida, não faziam efeito. Assim, iniciou-se as coletas de leite para envio e processamento do PCR. Primeiramente testou todo o rebanho, 426 vacas, sendo 22 positivas para *Mycoplasma bovis*. Segundo a literatura, a prevalência do agente causador de mastite é variável, entre 0,5 a 35% em diversos países (González & Wilson, 2003). Em estudos brasileiros anteriores o resultado encontrado foi de 8,8% no Paraná (Mettifogo et al., 1996); 1,3% em Minas Gerais (Mettifogo & Tamasso, 2013) e 3,03% em São Paulo (Junqueira, 2016). Nesse presente trabalho durante 2020 e 2021 foram testados 1.118 animais, destas 227 vacas positivas, prevalência de 20,3%. Esse resultado foi superior aos demais estudos, podendo ser justificado pelo tempo de análise.

Outrossim, previamente a confirmação laboratorial, muitos animais foram descartados pela agalaxia. A partir do histórico dos animais, 72% eram multíparas, 45% com mastite anteriormente, 28% primíparas, 6% recém-paridas e 2% com mastite recente. Essa análise assemelhou a outros estudos pelo perfil do agente, transmissão principal durante a ordenha e comportamento crônico da infecção (Hazelton et al., 2020; Haapala et al. 2021). Logo, com a alta incidência em primíparas infere-se uma contaminação ainda quando jovem, uma vez que o *Mycoplasma* tem potencial hematológico.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que no presente estudo houve uma alta prevalência de *Mycoplasma bovis*, gerando grande impacto na produção leiteira, mas ainda é preciso ter outros estudos no âmbito nacional para registrar a ocorrência do agente no país e os principais fatores de risco. É notório os prejuízos em decorrência do agente, seja por queda na produção, acometimento do sistema imune e descarte por não resposta ao tratamento. Portanto, é importante preconizar medidas preventivas, evitando sua ocorrência, seja em animais jovens e adultos. E em rebanhos positivos o monitoramento de todos os animais deve ser constante e realizar a segregação desses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dalanezi, F. M. et al. Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3648–3655, abr. 2020.

- Parker, A. M. et al. Comparison of culture and a multiplex probe PCR for identifying *Mycoplasma* species in bovine milk, semen and swab samples. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173422, 6 mar. 2017.
- Haapala, V. et al. *Mycoplasma bovis* infection in dairy herds—Risk factors and effect of control measures. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 2254–2265, fev. 2021.
- Hazelton, M. S. et al. *Mycoplasma bovis* and other Mollicutes in replacement dairy heifers from *Mycoplasma bovis*-infected and uninfected herds: A 2-year longitudinal study. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 12, p. 11844–11856, dez. 2020.
- González, R.N. & Wilson, D.J. 2003. *Mycoplasma mastitis* in dairy herds. *Vet. Clin. N. Am., Food Anim. Pract.* 19(1):199-221.
- Junqueira, N.B. & Langoni, H. 2016. Aspectos gerais sobre a mastite bovina causada por *Mycoplasma* spp. *Vet. Zootec.* 23(3):356-364.
- Mettifogo, E. & Tamasso, E. 2013. Mastite por *Mycoplasma bovis*: Surtos em Minas Gerais levam ao Descarte de Animais Produtivos. *Quality Milk, São Sebastião do Paraíso.*

SURTO DE MASTITE POR *Mycoplasma bovis*: INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO DE LEITE DE VACAS LEITEIRAS EM MINAS GERAIS

Bárbara de Lima Sinis¹, Isadora Marugeiro de Paula Teodoro¹, Mariana Brant Drumond Magalhães², Marina Ferreira Borges², Pamela Michéli Furini³, Alan Figueiredo de Oliveira²

¹Graduanda do curso de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Betim, Brasil. ² Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. ³Escola de Veterinária, Universidade Estadual do Norte do Paraná, Jacarezinho, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença que afeta a produção de leite mundial devido a sua alta prevalência. A mastite ocasiona perdas financeiras relacionadas à redução da produção de leite, o que a caracteriza como a doença mais cara dentro de um rebanho (Jashari et al., 2016). Além de ser uma doença multifatorial, a mastite é ocasionada por diferentes bactérias e apresenta sinais clínicos diversos.

Os principais patógenos encontrados nos rebanhos mundiais que levam a ocorrência da doença são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Mycoplasma spp* e *Streptococcus* ambientais (Dalanezi et al., 2020).

O *Mycoplasma spp.* é capaz de deprimir o sistema imune e tornar o hospedeiro susceptível à outras doenças, ocasionando infecções concomitantes. Assim, o *Mycoplasma spp.* é um patógeno que causa doenças como: mastite, pneumonia, septicemia, problemas reprodutivos e morte de animais (Justice et al., 2010). Por isso, sua presença nos rebanhos causa prejuízos econômicos e produtivos.

Os surtos de mastites causadas pela bactéria se assemelham a outros patógenos contagiosos, e devido a isso, a infecção concomitante do *Mycoplasma* com outras bactérias ainda é estudada (Fox, 2012). Além disso, a bactéria não é responsiva à antibioticoterapia convencional, e devido a isso, casos de mastite relacionados à micoplasmose geralmente se apresentam como surtos na propriedade. Dessa forma, objetivou-se relatar um surto de *Mycoplasma bovis* em um rebanho leiteiro de Minas Gerais e avaliar sua influência sobre a produção de leite.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados dados de um rebanho da raça Girolando, em uma fazenda localizada no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. As vacas eram criadas em sistema semi-intensivo, onde ficavam em pasto com suplementação concentrada na época das águas (novembro a abril) e confinadas em pista de alimentação na época da seca (maio a outubro). Os dados foram coletados durante o período do surto, entre os meses de abril e maio de 2020. Nesse período, a fazenda possuía cerca de 500 animais em lactação que apresentavam mastite em mais de um teto. As mastites foram seguidas de queda brusca na produção de leite e do isolamento de *Streptococcus uberis* nos casos de mastite clínica, o que foi frequente durante o surto.

Foram feitos testes de Polymerase Chain Reaction (PCR) em laboratório oficial dos animais suspeitos de forma individual e nos tanques de resfriamento com o leite. As coletas foram realizadas utilizando luvas de procedimento, frascos estéreis, álcool 70° e gaze descartável. Após a coleta, as amostras foram congeladas e enviadas ao laboratório em caixa térmica lacrada para pesquisa microbiológica de *Mycoplasma spp.* e *Mycoplasma bovis*. Para o diagnóstico foram utilizados testes com kits de extração e sequenciamento de DNA e PCR, de alta especificidade e sensibilidade para diagnóstico de *Mycoplasma*. Foram coletados dados de dias em lactação (DEL), produção de leite (PL) e contagem de células somáticas (CCS) antes e depois do surto referente a 169

animais, bem como, dados dos resultados de cultura em placas de meios cromogênicos usados na fazenda. Os dados de produção de leite foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância. Os dados foram analisados por análise de variância sobre o efeito do surto (antes ou depois) e o DEL foi utilizado como uma covariável ($P < 0.05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 169 animais positivos para *Mycoplasma bovis* nas amostras coletadas, o que demonstra que os achados clínicos (agalaxia, acometimento de mais de um quarto mamário e baixa responsividade aos tratamentos intramamários convencionais) levaram a uma suspeita clínica correta. O DEL ($P < 0,001$) e a ocorrência de micoplasmose ($P = 0,002$) tiveram efeito significativo sobre a produção de leite, sendo 16,2% (3,1 kg/dia) menor após o surto de *Mycoplasma* (tabela 1). Esses resultados corroboram com os achados de Timonen et al. (2017), que identificaram redução semelhante, demonstrando relação entre o *M. bovis* e a queda na produção. A verificação dessa redução é essencial para o entendimento dos efeitos econômicos ocasionados pelo *Mycoplasma*. Além disso, a utilização do DEL como covariável foi importante para isolar seu efeito e permitir a avaliação real do efeito do surto sobre a queda na produção.

Tabela 1 - Efeito da ocorrência de surto de mastite causada por *Mycoplasma bovis* sobre a produção de leite em um rebanho em Minas Gerais.

	Antes do surto	Depois do surto	EPM	P – Valor DEL	P – Valor surto
Produção de leite (kg/dia)	19,2	16,1	0,414	<0,001	0,002

EPM = erro padrão da média; DEL = dias em lactação.

Foi observado infecções concomitantes entre *Mycoplasma bovis* e outras bactérias oportunistas durante os meses do surto. Houve uma prevalência de 37% de amostras negativas, 16% de *Staphylococcus* não aureus, 11% *Escherichia coli*, 10% de *Streptococcus uberis*, 9% de *Streptococcus dysgalactiae*, 8% de *Klebsiella* spp., e 9% de outras bactérias que não apresentaram relevância significativa para o estudo.

A presença de bactérias com perfil ambiental era devido ao desafio que a fazenda enfrentava com o ambiente. Esses achados reforçam os achados de Timonen et al. (2017), onde 29% dos animais acometidos com *M. bovis* tiveram associação com outros patógenos, como *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis*, dentre outros. Esses resultados destacam a capacidade do *Mycoplasma* spp. de tornar o animal susceptível a outros patógenos. Entretanto, são necessários mais estudos para determinar os mecanismos bioquímicos associando a micoplasmose com outras bactérias, principalmente as de perfil contagioso, para destacar a importância desse agente e a mensuração dos prejuízos ocasionados.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de surto de mastite por *Mycoplasma bovis* reduz significativamente a produção de leite, o que mostra a importância econômica desse agente nas fazendas. Além disso, foi observado a ocorrência de infecções concomitantes ocasionadas por bactérias oportunistas que impactam a saúde do úbere.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dalanezi, F. M. et al. Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3648–3655, abr. 2020.
Fox, L. K. Mycoplasma Mastitis. **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 225-237, jul. 2012.

Jashari, R. et al. Evaluation of the composite milk somatic cell count as a predictor of intramammary infection in dairy cattle. **Journal Of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 9271-9286, nov. 2016.

Justice-Allen, A. et al. Survival and replication of Mycoplasma species in recycled bedding sand and association with mastitis on dairy farms in Utah. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 192–202, jan. 2010.

Timonen, A. A. E. et al. Within-herd prevalence of intramammary infection caused by Mycoplasma bovis and associations between cow udder health, milk yield, and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6554–6561, ago. 2017.

UMIDADE DA CAMA DE SISTEMAS DE *COMPOST BARN*S AUMENTA RISCO DE INCIDÊNCIA DE MASTITE CLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

Gustavo Freu¹, Gabriela Siqueira Di Leo¹, Larissa Schneider Gheller², Breno Luiz Nery Garcia¹, Marcos Veiga dos Santos¹

¹Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite (Qualileite), Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil. ²Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil

INTRODUÇÃO

O sistema de alojamento de vacas leiteiras *Compost-bedded pack barns*, também conhecido como *Compost barn* (CB), é uma estrutura aberta, sem repartições, onde as vacas leiteiras têm livre acesso à área de cama e pista de alimentação. A cama das vacas neste sistema utiliza material orgânico como substrato que permanece em constante atividade de compostagem, e proporciona superfície seca e confortável para as vacas leiteiras (Leso et al., 2020). Estes fatores, tem tornado o sistema CB atrativo para a produção de leite e tem contribuído para a expansão do sistema no Brasil e no mundo. No entanto, quando há deficiências de manejo da cama e da lotação, pode ocorrer maior risco de ocorrência de mastite.

A intensidade de contaminação da pele dos tetos e, conseqüentemente, o risco de novas infecções intramamárias são influenciadas pelo tipo (orgânico ou inorgânico) e pelas características físico-químicas do material das camas (e.g., umidade, temperatura e relação carbono-nitrogênio). Nesse sentido, estudos epidemiológicos são úteis não somente para identificar fatores associados à carga bacteriana presente na cama e ocorrência de mastite, mas também para identificar características da cama que sofrem maior variação e, portanto, requerem maior atenção em nível de fazenda. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar: (a) a frequência de isolamento dos microrganismos causadores de mastite em vacas leiteiras alojadas em CB; e (b) avaliar a associação entre o risco de incidência de mastite clínica (RIMC), prevalência de mastite subclínica (PMSC) e as características microbiológicas e físico-químicas da cama em sistema CB.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados oito rebanhos leiteiros do estado de São Paulo, com média de 116 vacas em lactação confinadas em sistema CB. Os rebanhos foram avaliados durante seis meses, com coletas mensais de amostras de leite e cama. Mensalmente, todas as vacas em lactação tiveram amostras compostas de leite coletadas para análise de contagem de células somáticas (CCS). Das vacas com CCS >200.000 células/mL, amostras compostas de leite foram coletadas de forma asséptica e submetidas à identificação microbiológica por espectrometria de massas (MALDI-TOF MS). De forma similar, vacas com mastite clínica tiveram o registro e amostras de leite do quarto mamário afetado coletadas. Além disso, mensalmente, foi mensurada a temperatura da cama na camada superficial (± 10 cm) e profunda (± 20 cm) em 12 pontos distintos de cada instalação. Dos mesmos 12 pontos e de ambas as camadas, foram coletadas amostras do material das camas para análises físico-químicas (e.g., pH, matéria orgânica, umidade, e relação carbono:nitrogênio) e microbiológicas (e.g., contagem bacteriana total, coliformes, *Streptococcus* e *Staphylococcus*). O RIMC foi calculado pela divisão do total de vacas que tiveram mastite clínica durante o período de um mês pelo número de vacas em lactação no rebanho no mesmo mês. A PMSC foi calculada pela divisão do total de vacas com CCS >200.000 células/mL pelo total de vacas

avaliadas no mesmo dia do teste. Modelos multivariáveis utilizando o PROC MIXED dos SAS 9.4 foram construídos para determinar associações entre o risco de mastite (clínica e subclínica) e as características físico-químicas e microbiológicas do material de cama dos sistemas CB. Significância estatística foi declarada quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 402 casos de mastite clínica foi registrado durante o período de estudo. Deste total, 47,8% ($n = 192$) das amostras tiveram resultado de cultura negativa (*i.e.*, ausência de isolamento microbiano). Das amostras com isolamento positivo, patógenos ambientais foram os mais frequentes; destes, *Escherichia coli* ($n = 47$; 11,7% do total de amostras) apresentou maior frequência de isolamento, seguida por *Streptococcus dysgalactiae* ($n = 30$; 7,5%), e *Streptococcus uberis* ($n = 27$; 6,7%). Em relação à mastite subclínica, do total de 1858 amostras de leite analisadas, 39,7% ($n = 738$) apresentaram cultura negativa. Das amostras de mastite subclínica com isolamento positivo, *Staphylococcus chromogenes* ($n = 478$; 25,7% do total de amostras) foi o patógeno com maior frequência de isolamento, seguido por *Streptococcus agalactiae* ($n = 84$; 4,5%) e *Streptococcus uberis* ($n = 74$; 3,9%). O teor médio de umidade da cama foi de $43,4\% \pm 8,8$ (variando de 30,4 a 61,9 %), enquanto a média de pH, matéria orgânica e relação carbono-nitrogênio foi de $8,4 \pm 0,5$; $54,2 \pm 11,6$ e $17,2 \pm 7,4$; respectivamente. A média geral da contagem bacteriana total na camada superficial foi de $8,1 \pm 0,5 \log_{10}$ ufc/g. As contagens de coliformes, *Streptococcus* e *Staphylococcus* variaram de 5,8 a 6,8 \log_{10} ufc/g.

O RIMC foi de $9,9 (\pm 4,3)$, enquanto que a PMSC foi de 38,5 (variando de 23,0 a 56,0). O teor de umidade da cama foi a única variável associada com o RIMC geral ($P = 0,012$; Tabela 1). Não houve efeito das características físico-químicas e microbiológicas da cama sobre a PMSC.

Tabela 1 - Regressão logística entre características físico-químicas e microbiológicas da cama e indicadores de mastite clínica e subclínica de rebanhos leiteiros alojados em sistema CB.

Variável	Coefficiente	DP ¹	Valor de P	Média (EPM) ²
Risco de incidência de mastite clínica				
Intercepto	-10,70	6,98		
Material de cama			0,051	
Casca de amendoim	7,48	2,40		16,99 (2,48)
Palha de arroz	-7,56	4,41		1,95 (3,76)
Serragem		Ref.		9,51 (0,81)
Umidade (%)	0,45	0,16	0,012	
Prevalência de mastite subclínica				
Intercepto	26,97	6,22		
Contagem de coliformes (\log_{10} ufc/g)	2,06	1,06	0,057	

¹Desvio padrão. ²Erro padrão da média.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Escherichia coli e estreptococos ambientais foram as principais causas de MC, enquanto que *Staphylococcus chromogenes* foi a principal causa de mastite subclínica nos rebanhos leiteiros avaliados. Adicionalmente, a umidade da cama foi positivamente associada com a incidência de MC. As características físico-químicas e microbiológicas da cama não foram associadas com a prevalência de mastite subclínica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Leso, L. et al. Invited review: Compost-bedded pack barns for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1072–1099, 2020.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

USO DA TÉCNICA MALDI-TOF NO ESTUDO DAS INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS CAUSADAS POR *Staphylococcus* spp. e *Mammaliicoccus sciuri* EM CABRAS DA BACIA LEITEIRA PARAIBANA: Estudo preliminar

Michele Flávia Sousa Marques¹, Guilherme Santana Moura², Ewerton Souza Lima³, Alice Maria Melo Nascimento³, Raphael Ferreira Ordonho³, Artur Cezar Carvalho Fernandes³, Fernando Nogueira Souza^{1,2}

¹Laboratório de caprinocultura, Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brasil. ²Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ³Núcleo aplicado à Produção e Sanidade da Glândula Mamária, Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite é reconhecida mundialmente como um importante problema sanitário e econômico em rebanhos especializados na produção de leite, caracterizando um entrave para toda a cadeia produtiva. São diversos os microrganismos que causam mastite em caprinos e atenção especial deve ser dada à mastite causada por *Staphylococcus* spp. (Gosselin et al., 2019). Os estafilococos não-*aureus* e *Mammaliicoccus sciuri* (anterior *Staphylococcus sciuri* - ENAM) são os patógenos mais frequentemente associados à mastite caprina e em pequenos ruminantes são mais patogênicos, levando ao aumento expressivo da contagem de células somáticas, e, portanto, considerados patógenos principais (Souza et al., 2012).

São crescentes as evidências de variações na patogenicidade e persistência da infecção intramamária entre as distintas espécies de ENA (Vanderhaeghen et al., 2014), a identificação dos agentes etiológicos da mastite baseada em testes bioquímicos apresenta limitações na identificação das espécies que compõem os ENA. Desta forma, a identificação por espectrometria de massa - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight* (MALDI-ToF MS), que foi empregada no presente estudo, permitiu a identificação de patógenos da mastite, incluindo as distintas espécies de ENA, com alta precisão.

Portanto, a especiação de *Staphylococcus* e *Mamaliicoccus* realizada no presente estudo forneceu importantes informações sobre a avaliação da prevalência da infecção intramamária por distintas espécies nos rebanhos que compõem a bacia leiteira caprina na Paraíba.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliamos 230 cabras em lactação provenientes de rebanhos que compõem a bacia leiteira caprina na Paraíba. Inicialmente, realizamos o teste da caneca do fundo escuro para identificar a presença de coágulos, flocos ou secreções anormais que pudessem estar presentes no leite. Depois de descartados os três primeiros jatos de leite, realizamos a assepsia das extremidades dos tetos com algodão umedecido em álcool a 70%, e as amostras de leite individuais de cada metade mamária foram coletadas assepticamente em frascos estéreis para análise bacteriológica (aproximadamente 10 mL).

A análise bacteriológica do leite foi realizada através do cultivo de 10 µL com o auxílio de uma alça de platina calibrada de acordo Oliver et al. (2004) em ágar 5% de sangue de carneiro desfibrinado, incubados a 37 °C por 24 horas. Uma amostra de leite foi considerada contaminada se três ou mais espécies bacterianas diferentes forem cultivadas, nesse caso, descartadas (Oliver et al., 2004).

Posteriormente, os isolados bacterianos foram armazenados a -20°C em 1 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) suplementado com 10% de glicerina

estéril até a análise por MALDI-ToF MS. Os microrganismos foram identificados por MALDI-ToF MS a partir de subculturas em placas contendo ágar infusão cérebro coração, enviadas ao laboratório de pesquisa em qualidade do leite – Qualiite-FMVZ-USP. O resultado foi fornecido por meio de uma pontuação de log com um valor máximo de 3,0. Valores de pontuação superiores a 1,7 foram considerados confiáveis para identificação de gêneros, e valores superiores a 2,0 foram considerados para identificação de espécies (Cameron et al., 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 460 amostras coletadas, 86 (18.69%) não apresentaram crescimento microbiológico e as colônias isoladas das 374 amostras restantes, foram identificadas como: 76 *S. aureus* (20.32%), 48 *S. epidermidis* (12.83%), 46 *S. chromogenes* (12.29%), 35 *S. xylosus* (9.35%), 28 *S. simulans* (7.48%), 24 *S. caprae* (6.41%), 15 *Mammaliococcus sciuri* (4.01%), 15 *S. saprophyticus* (4.01%), 8 *S. lugdunensis* (2.13%), 4 *S. haemolyticus* (1.06%), 2 *S. petrasii* (0.53%), 1 *S. gallinarum* (0.26%), 1 *S. cohnii* (0.26%), 1 *S. capitis* (0.26%) e 70 (18.71%) consideramos como outras espécies.

Tivemos uma prevalência de 81.28% (304/374) de isolados do gênero dos *Staphylococcus*, sendo 75% (228/304) correspondente ao grupo dos *Staphylococcus* não aureus e *Mammaliococcus* (SNAM) e 25% (76/304) de *S. aureus*.

Nosso resultado corrobora com vários estudos relacionados a etiologia da mastite caprina no Brasil que apontam *Staphylococcus* não aureus como os microrganismos mais frequentes (Martins et al., 2017, Lima et al., 2018).

A relevância de SNAM na epidemiologia das mastites de pequenos ruminantes está cada vez mais fortalecida, por estarem entre os agentes etiológicos mais frequentemente encontrados, variando de 25 a 93% dos isolados (Bergonier et al., 2003), além de atuarem como reservatório de genes de virulência para outras bactérias como *S. aureus* (Acosta et al., 2016) e já estarem relacionados a casos de mastite clínica em marrãs (Moura et al., 2018) e de mastite gangrenosa em ovelhas (Moura et al., 2020).

Staphylococcus aureus é considerado um dos agentes etiológicos mais importantes por ser responsável pela maioria dos casos clínicos e pela severidade deles, em pequenos ruminantes, está associado a maioria dos casos de mastite gangrenosa (Rainard et al., 2018), além da dificuldade de alcançar cura microbiológica na glândula mamária de animais infectados (Santos e Fonseca, 2019). Apesar de ser relatado risco de sua incidência em um rebanho inferior a 7% em uma lactação (Arsenault et al., 2008), Lima et al., (2018) isolou *S. aureus* em 60% das amostras de leite caprino da região da zona da mata de Minas Gerais.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados sobre o perfil microbiológico das infecções intramamárias das cabras da bacia leiteira paraibana são escassos, e essa falta de informação limita a implementação de medidas profiláticas, corretivas e que subsidiem as ações da assistência técnica prestada aos produtores. Nosso trabalho demonstrou uma prevalência de 75% de isolados pertencentes ao grupo de *Staphylococcus* não aureus e *Mammaliococcus*, conhecê-los é primordial para o avanço nas ações de controle da mastite. Este trabalho conta com apoio financeiro da Chamada nº 03/2020 Produtividade em Pesquisa PROPESQ/PRPG/UFPB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta A.C, Silva L.B.G., Medeiros E.S., Pinheiro-Júnior J.W., Mota R.A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- Arsenault J., Dubreuil P., Higgins R., Bélanger D. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, [S. l.], v. 87, n. 3–4, p. 373–393, 2008.

- Bergonier, D., R. Crémoux, R. Rupp, G. Lagriffoul, and X. Berthelot. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. **Vet. Res.** 34:689–716. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and a custom reference spectra expanded database for the identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci. **J. Dairy Sci.** 101:590–595, 5 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13226>. 2018
- Gosselin V.B., Dufour S., Adkins P.R.F., Middleton J.R. Persistence of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections in dairy goats. **Journal of Dairy Research**, v.86, p.211-216, 2019.
- Lima M.C., Souza M.C.C., Espeschit I.F., Maciel P.A.C.C., Sousa J.E., Moraes G.F., Filho J.D.R., Moreira M.A.S. Characteristics of resistance and virulence factors in different species of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of healthy sheep and animals with subclinical mastites. **J. Dairy Sci.** 100:2184–2195. 2017.
- Moura G.S., Mota R.A., Marques M.F.S., Abad A.C.A., Costa L.B.B.C., Souza F.N., Almeida V.M., Filho G.B.S., Bom H.A.S.C., Klaumann F., Souza F.A.L., Mendonça F.S. Gangrenous mastitis in sheep caused by multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Pesquisa veterinária brasileira (ONLINE)**, v. 40, p. 947-954, 2020.
- Moura G.S., Marques M.F.S., Souza F.N., Da Costa L.B.B.C., Abad A.C.A., Mota R.A. Catarrhal mastitis by *Staphylococcus simulans* in a nulliparous goat. **Brazilian journal veterinary res. and animal science**, v. 55, p. e140288, 2018.
- Oliver S.P., Lewis M.J., Gillespie B.E., Dowlen H.H. Jaenicke E.C., Roberts R.K. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. 4th ed. Verona, WI: **National Mastitis Council**, 47 p., 2004.
- Rainard P, Gitton C., Chaumeil T., Fassier T., Huau C., Riou M., Tosser-Klopp G., Krupova Z., Chaize A., Gilbert F.B., Rupp R., Martin P. Host factors determine the evolution of infection with *Staphylococcus aureus* to gangrenous mastitis in goats. **Vet Res** (2018) 49:72 <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0564-4>
- Santos, Marcos Veiga dos e Fonseca, Luis Fernando Laranja da. **Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções**. São Paulo: Edição dos autores. 2019. ISBN: 9788591591312.
- Souza, F.N., Blagitz, M.G., Penna, C.F.A.M., Della Libera, A.M.M.P., Heinemann, M.B., Cerqueira, M.M.O.P. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 107, n. 2–3, p. 65– 75, 2012.
- Souza F.N., Cunha A.F., Rosa D.L.S.O., Brito M.A.V., Guimarães A.S., Mendonça L.C., Vanderhaeghen, W., Piepers S., Leroy F., Van Coillie E., Haesebrouck F., De Vligher S. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. **Journal of Dairy Science**, 2014. v. 97, n. 9, p. 5275–5293.

CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE VACAS COM MASTITE CLÍNICA MONITORADAS ELETRONICAMENTE

Maysa Beatriz Araújo Ramos¹, Júlia de Barros Leite Marliele¹, Frank Ângelo Tomita Bruneli², Maria de Fátima Ávila Pires², Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto², Alessandro de Sá Guimarães², Bruno Campos de Carvalho²

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil. ²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite clínica é a principal doença que acomete as vacas leiteiras, com grandes perdas econômicas. Isso ocorre principalmente pela redução na produção de leite dos animais doentes, quanto pelos custos com tratamento e descarte do leite. A mastite interfere severamente na saúde das vacas, reduzindo seu bem-estar o que pode ser demonstrado pela perda de apetite, com redução no consumo de alimentos e por alterações no seu comportamento normal (Petersson, 2018; Sharun, 2021; Stangaferro, 2016).

Nos últimos anos, cada vez mais o monitoramento eletrônico da atividade tem sido empregado para monitorar a saúde e bem-estar de vacas leiteiras. O monitoramento eletrônico através de colares permite acompanhar alterações no comportamento e bem-estar, ao avaliar características como tempos de ruminação, ofegação, atividade e ócio. Essas características podem ser utilizadas de forma auxiliar aos métodos tradicionais de identificação da mastite, ao fornecer informações sobre o estado geral de saúde do animal. Ainda, a identificação precoce de alterações comportamentais permite iniciar terapias de suporte de forma mais imediata e assim, reduzir os impactos da mastite na produção de leite (Sharun, 2021; Stangaferro, 2016).

O objetivo do presente trabalho é caracterizar as alterações no comportamento de vacas antes, durante e depois da ocorrência de casos de mastite clínica.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no sistema de produção de leite Compost Barn Túnel de Vento da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG. O rebanho era formado por 90 vacas em lactação. Foram utilizados dados de 61 casos clínicos de mastite que ocorreram no período de 12 de março de 2020 a 17 de março de 2022.

A ordenha dos animais foi realizada três vezes por dia e, durante a rotina de ordenha, a mastite foi diagnosticada pela presença de grumo no teste de caneca telada. As vacas em lactação foram monitoradas por uma coleira eletrônica (CowMed, Santa Maria – RS, Brasil). Dados de ruminação, atividade, ócio e ofegação foram recuperados do sistema informatizado das coleiras de monitoramento no período de cinco dias antes até cinco dias após a manifestação clínica da mastite. Dados zootécnicos relacionados à época do parto (seca e águas), estágio de lactação (terços inicial, médio e final) e ordem de parto das vacas também foram coletados.

Os dados foram analisados com o auxílio do Sistema SAS. As variáveis tempo de ruminação, tempo de atividade, tempo de ócio e tempo de ofegação foram submetidos a análise de variância usando o procedimento GLM do SAS, considerando os efeitos de ordem de parto, época do ano, estágio de lactação e dias em relação à ocorrência da mastite. As médias de quadrados mínimos foram comparadas pelo teste Tukey-kramer ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os tempos de ruminação, atividade, ócio e ofegação em função do dia de ocorrência da mastite clínica. Observou-se redução no tempo de

ruminação ($P < 0,05$) a partir de um dia antes da ocorrência da mastite, atingindo valor mínimo no dia da ocorrência e permanecendo reduzida nos dois dias seguintes. O tempo de ruminação reflete o consumo de alimentos e pode indicar redução no consumo de alimentos associado com o curso clínico da doença.

O tempo de atividade representa o tempo de alimentação e de deslocamento do animal. Observou-se redução ($P < 0,05$) no tempo de atividade no dia da ocorrência da mastite (Dia 0) (Tabela 1). A atividade foi menos afetada do que a ruminação, não tendo sido observadas diferenças nos dias anteriores e posteriores à ocorrência clínica e pode refletir uma queda de consumo no Dia 0.

Tabela 1 - Tempo (minutos) de ruminação, atividade, ócio e ofegação de vacas monitoradas eletronicamente, em função do dia de ocorrência da mastite clínica (médias de quadrados mínimos).

Dia	Ruminação	Atividade	Ócio	Ofegação
-5	573,01 ^{c, d}	255,64 ^a	595,55 ^{d, e}	62,54 ^{a, d}
-4	581,73 ^{b, c}	252,02 ^{a, b}	590,66 ^d	46,72 ^d
-3	586,97 ^{a, b}	250,16 ^{a, b}	591,21 ^d	47,84 ^d
-2	584,75 ^{a, b}	244,60 ^b	597,63 ^{d, e}	46,13 ^d
-1	567,87 ^d	246,54 ^{a, b}	614,90 ^c	67,49 ^{a, c, e}
0	545,15 ^e	230,80 ^c	653,45 ^a	77,14 ^a
1	551,55 ^e	249,22 ^{a, b}	634,67 ^b	54,23 ^{b, c, d}
2	572,52 ^{c, d}	251,88 ^{a, b}	609,45 ^{c, e}	49,27 ^{d, e}
3	584,86 ^{a, b}	252,81 ^{a, b}	596,32 ^{d, e}	45,67 ^d
4	582,20 ^{a, b, c}	254,03 ^{a, b}	588,56 ^d	78,71 ^a
5	591,78 ^a	244,47 ^b	587,99 ^d	70,38 ^{a, b}

^{a, b} Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças entre as médias pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

De forma semelhante à ruminação, o tempo de ócio aumentou ($P < 0,05$) no dia anterior à ocorrência clínica da mastite, atingiu o maior valor ($P < 0,05$) no dia da sua ocorrência e manteve-se elevado pelos dois dias seguintes ($P < 0,05$) (Tabela 1). O tempo de ócio é a diferença entre o tempo total e os tempos de ruminação e atividade. Mudanças em tempos de ruminação e atividade afetam o tempo de ócio. Por fim, observou-se aumento ($P < 0,05$) no tempo de ofegação nos dias -1 e 0. A ofegação dos animais pode ser explicada pela ocorrência de febre ou até mesmo a presença de dor. A ocorrência de febre e redução no consumo de alimentos podem explicar os efeitos da mastite clínica sobre os parâmetros avaliados.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite clínica interfere no comportamento animal monitorado por coleiras eletrônicas. Os tempos de ruminação e ócio foram mais sensíveis, afetados por mais tempo. A ofegação também pode auxiliar no acompanhamento da evolução clínica da doença. O monitoramento eletrônico é importante ferramenta auxiliar para o diagnóstico precoce e monitoramento da evolução clínica da mastite. Mais estudos devem ser conduzidos para associar alterações comportamentais com protocolos de tratamento, de forma a reduzir os prejuízos causados pela mastite, seja pelos custos de tratamento e descarte do leite seja por minimizar a redução na produção, melhorando o bem-estar e consumo de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Petersson-Wolfe, C. S., et al. An Update on the Effect of Clinical Mastitis on the Welfare of Dairy Cows and Potential Therapies. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.34, p. 525-535, 2018.
- Sharun, K., et al. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**. v.41, p. 107-136, 2021.

Stangaferro, M. L., et al. Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part II. Mastitis. **Journal of Dairy Science**. v.99, p. 7411-7421, 2016.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, agradeço pelo apoio financeiro, imprescindível para a elaboração e desenvolvimento da pesquisa que oportunizou a elaboração deste trabalho. Com o auxílio desta prestigiada Fundação foi possível trazer mais inovação e conhecimento para a ciência médica veterinária.

VACINA AUTÓGENA E OS INDICADORES DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA: RESULTADOS PRELIMINARES

Carla Cristian Campos¹, Paulo César Franco Dutra¹, Felipe Zanforlin Freitas², José Willian Maluf de Paula³, Roberta Tomaz Botta França¹, Ricarda Maria dos Santos⁴

¹Inata Biológicos, Uberlândia ²Evoluir Saúde do Leite, Patos de Minas ³Aluno de graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário UNA Uberlândia ⁴Docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia

INTRODUÇÃO

A mastite é considerada a principal enfermidade dos rebanhos leiteiros mundialmente, sendo responsável por perdas produtivas e econômicas, as quais são atribuídas aos custos com tratamentos, descarte do leite com resíduos de antibióticos, redução na produção de leite, descarte prematuro de vacas, custos com reposição, comprometimento da eficiência reprodutiva, conforto e bem-estar dos animais (Akers E Nickerson, 2011; Seegers et al., 2003).

Algumas estratégias são fundamentais no controle e prevenção da mastite, tais como rotina adequada de ordenha, higiene no ambiente das vacas, segregação de animais doentes, tratamento dos casos clínicos com cultura microbiológica positiva, descarte de animais crônicos, entre outras.

A utilização de vacinas surge como uma estratégia adicional no controle da mastite, visando melhorar a capacidade do sistema imunológico em combater os agentes invasores da glândula mamária. As vacinas previnem a ocorrência de novos casos de mastite e reduzem a severidade dos quadros clínicos (Gorden et al., 2018), e conseqüentemente reduzem a utilização de antibióticos. Nas vacinas autógenas, as cepas bacterianas isoladas de um determinado rebanho são as que irão compor a vacina, induzindo uma resposta imune ainda mais específica. Além disso, sabe-se que as bactérias sofrem alterações estruturais e moleculares ao longo do tempo, e por isso a atualização das cepas para produção da vacina é de suma importância para garantir a proteção dos animais.

Objetivou-se avaliar a incidência mensal de mastite clínica e a dinâmica das infecções subclínicas (percentual de vacas sadias, crônicas, curadas e novas infecções) em resposta à utilização da vacina autógena.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento está sendo conduzido em uma fazenda comercial leiteira localizada no Triângulo Mineiro. O rebanho possui vacas Girolando em lactação mantidas em *Compost Barn*, ordenhadas três vezes ao dia, com produção média diária de 30,6 litros.

Para produção da vacina autógena, foram coletadas amostras de leite de vacas com mastite subclínica, diagnosticadas pelo *California Mastitis Test* (CMT). No laboratório, as amostras foram plaqueadas em ágar sangue e cromoagar e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Na primeira leitura, as colônias foram selecionadas e foi feito o repique para isolamento. Uma identificação prévia das colônias foi realizada considerando suas características morfológicas e confirmadas por testes bioquímicos. A técnica de PCR foi utilizada para confirmação da espécie bacteriana, quando necessário. Uma semente de cada bactéria isolada destas amostras foi criada e armazenada em freezer a -80°C até a fabricação da vacina.

Cultura microbiológica	Taxa de isolamento
Cultura negativa	60,1%

<i>Staphylococcus não aureus (SNA)*</i>	11,7%
<i>Corynebacterium bovis*</i>	6,5%
<i>Streptococcus uberis*</i>	5,4%
Outros agentes*	4,5%
<i>Streptococcus agalactiae*</i>	4,2%
<i>Escherichia coli*</i>	4,0%
Amostra contaminada	1,9%
Mais de 1 agente	1,2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5%

* agentes incluídos na vacina autógena; SNA: *Staphylococcus chromogenes*; outros agentes: *Streptococcus dysgalactiae*; totalizando seis agentes.

A fabricação da vacina autógena seguiu as determinações da Instrução Normativa 31 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Após a aprovação pelo MAPA, cada uma das sementes foi adicionada a um meio de cultivo específico para multiplicação bacteriana. Os concentrados produzidos a partir destes cultivos foram submetidos à inativação, titulação e ressuspensão. Os concentrados foram adicionados ao adjuvante oleoso e outros componentes da vacina. Após envase e rotulagem, a vacina foi submetida aos testes exigidos pelo MAPA para garantir a qualidade do produto.

Para o experimento, 600 vacas foram divididas aleatoriamente entre os grupos Vacinado: 2 mL de vacina autógena de mastite (n= 300) e Controle: 2 mL de solução salina estéril (n= 300). A primeira aplicação foi realizada em março de 2022 e o reforço vacinal 30 dias após a primeira dose. A próxima vacinação está prevista para agosto. Os dados de mastite clínica e CCS individual mensal foram compilados e analisados de

Mês	Março/22		Abril/22		Maio/22		Junho/22	
	Vacina	Controle	Vacina	Controle	Vacina	Controle	Vacina	Controle
% Sadias	65,0%	62,7%	65,5%	63,5%	69,1%	61,8%	63,7%	55,4%
% Curadas	6,3%	4,0%	6,1%	7,8%	7,6%	4,4%	2,6%	5,2%
% Novas infecções	9,8%	12,9%	7,8%	8,2%	8,1%	13,7%	14,1%	11,2%
% Crônicas	18,9%	20,5%	20,5%	20,6%	15,3%	20,1%	19,7%	28,7%
CCS média mensal	318	403	369	396	331	428	331	488
Taxa de mast. subclínica	26,5%	29,4%	28,3%	28,5%	23,0%	34,4%	33,9%	40,2%

forma descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como a primeira vacinação e o reforço vacinal foram realizados respectivamente em março e abril de 2022, nestes meses não foi possível observar diferenças nos indicadores de mastite clínica e subclínica entre os grupos Controle e Vacinado. Ao longo do período de avaliação, alguns animais foram excluídos do estudo por venda ou descarte em ambos os grupos.

A incidência de mastite clínica do grupo Controle foi superior ao grupo Vacinado, nos meses de maio (10,07% vs. 8,53%) e junho (10,48% vs. 8,73%), confirmando a hipótese de que a vacinação reduz a incidência de novos casos de mastite clínica.

Os resultados da avaliação de mastite subclínica estão descritos na tabela abaixo. Considerando a dinâmica das infecções subclínicas, a porcentagem de vacas sadias do grupo Vacinado foi superior à do grupo Controle em maio e junho. Nos meses de maio e junho, a porcentagem de vacas crônicas do grupo Vacinado foi inferior em relação ao Controle. Houve uma variação na taxa de novas infecções e na taxa de cura entre os grupos nos meses de maio e junho, visto que em maio o desempenho do grupo Vacinado foi melhor e em junho o resultado do grupo Controle foi melhor. No mês de junho, foi possível verificar que houve um desafio maior para a mastite na propriedade de forma geral, uma vez que os indicadores de ambos os grupos apresentaram queda.

Nos meses de maio e junho, observou-se que a taxa de mastite subclínica do grupo Controle foi superior à do grupo Vacinado, resultando em uma diferença de 14,4% e 6,3%, respectivamente. A CCS individual média também diferiu entre os grupos, sendo inferior no grupo Vacinado em relação ao grupo Controle.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados preliminares obtidos conclui-se que o uso da vacina autógena contra mastite altera a dinâmica das infecções subclínicas e reduz a incidência de casos clínicos de mastite. Espera-se que após a revacinação prevista para agosto de 2022 seja possível observar melhora nos indicadores avaliados, assim como visto em outras propriedades leiteiras que já utilizam vacina autógena. Além disso, as cepas bacterianas que irão compor a vacina serão atualizadas para a próxima aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akers, R.M.; Nickerson, S.C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v.16, n.4, p.275-289, 2011.

Seegers, H.; Fourichon, C.; Beaudeau, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.475-491, 2003.

Gorden, P.J.; Kleinhenz, M.D.; Ydstie, J.A.; Brick, T.A.; Slinden, L.M.; Peterson, M.P.; Straub, D.E.; Brukhardt, D.T. Efficacy of vaccination with a *Klebsiella pneumoniae* siderophore receptor protein vaccine for reduction of *Klebsiella* mastitis in lactating cattle. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.10398-10408, 2018.

Área Temática 04: BEM-ESTAR ANIMAL

CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE VACAS COM MASTITE CLÍNICA MONITORADAS ELETRONICAMENTE

Maysa Beatriz Araújo Ramos¹, Júlia de Barros Leite Marliele¹, Frank Ângelo Tomita Bruneli², Maria de Fátima Ávila Pires², Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto², Alessandro de Sá Guimarães², Bruno Campos de Carvalho²

¹Faculdade de Medicina Veterinária. ²Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite clínica é a principal doença que acomete as vacas leiteiras, com grandes perdas econômicas. Isso ocorre principalmente pela redução na produção de leite dos animais doentes, quanto pelos custos com tratamento e descarte do leite. A mastite interfere severamente na saúde das vacas, reduzindo seu bem-estar o que pode ser demonstrado pela perda de apetite, com redução no consumo de alimentos e por alterações no seu comportamento normal (Petersson, 2018; Sharun, 2021; Stangaferro, 2016).

Nos últimos anos, cada vez mais o monitoramento eletrônico da atividade tem sido empregado para monitorar a saúde e bem-estar de vacas leiteiras. O monitoramento eletrônico através de colares permite acompanhar alterações no comportamento e bem-estar, ao avaliar características como tempos de ruminação, ofegação, atividade e ócio. Essas características podem ser utilizadas de forma auxiliar aos métodos tradicionais de identificação da mastite, ao fornecer informações sobre o estado geral de saúde do animal. Ainda, a identificação precoce de alterações comportamentais permite iniciar terapias de suporte de forma mais imediata e assim, reduzir os impactos da mastite na produção de leite (Sharun, 2021; Stangaferro, 2016).

O objetivo do presente trabalho é caracterizar as alterações no comportamento de vacas antes, durante e depois da ocorrência de casos de mastite clínica.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no sistema de produção de leite Compost Barn Túnel de Vento da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG. O rebanho era formado por 90 vacas em lactação. Foram utilizados dados de 61 casos clínicos de mastite que ocorreram no período de 12 de março de 2020 a 17 de março de 2022.

A ordenha dos animais foi realizada três vezes por dia e, durante a rotina de ordenha, a mastite foi diagnosticada pela presença de grumo no teste de caneca telada. As vacas em lactação foram monitoradas por uma coleira eletrônica (CowMed, Santa Maria – RS, Brasil). Dados de ruminação, atividade, ócio e ofegação foram recuperados do sistema informatizado das coleiras de monitoramento no período de cinco dias antes até cinco dias após a manifestação clínica da mastite. Dados zootécnicos relacionados à época do parto (seca e águas), estágio de lactação (terços inicial, médio e final) e ordem de parto das vacas também foram coletados.

Os dados foram analisados com o auxílio do Sistema SAS. As variáveis tempo de ruminação, tempo de atividade, tempo de ócio e tempo de ofegação foram submetidos a análise de variância usando o procedimento GLM do SAS, considerando os efeitos de ordem de parto, época do ano, estágio de lactação e dias em relação à ocorrência da mastite. As médias de quadrados mínimos foram comparadas pelo teste Tukey-kramer ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os tempos de ruminação, atividade, ócio e ofegação em função do dia de ocorrência da mastite clínica. Observou-se redução no tempo de

ruminação ($P < 0,05$) a partir de um dia antes da ocorrência da mastite, atingindo valor mínimo no dia da ocorrência e permanecendo reduzida nos dois dias seguintes. O tempo de ruminação reflete o consumo de alimentos e pode indicar redução no consumo de alimentos associado com o curso clínico da doença.

O tempo de atividade representa o tempo de alimentação e de deslocamento do animal. Observou-se redução ($P < 0,05$) no tempo de atividade no dia da ocorrência da mastite (Dia 0) (Tabela 1). A atividade foi menos afetada do que a ruminação, não tendo sido observadas diferenças nos dias anteriores e posteriores à ocorrência clínica e pode refletir uma queda de consumo no Dia 0.

Tabela 1 - Tempo (minutos) de ruminação, atividade, ócio e ofegação de vacas monitoradas eletronicamente, em função do dia de ocorrência da mastite clínica (médias de quadrados mínimos).

Dia	Ruminação	Atividade	Ócio	Ofegação
-5	573,01 ^{c, d}	255,64 ^a	595,55 ^{d, e}	62,54 ^{a, d}
-4	581,73 ^{b, c}	252,02 ^{a, b}	590,66 ^d	46,72 ^d
-3	586,97 ^{a, b}	250,16 ^{a, b}	591,21 ^d	47,84 ^d
-2	584,75 ^{a, b}	244,60 ^b	597,63 ^{d, e}	46,13 ^d
-1	567,87 ^d	246,54 ^{a, b}	614,90 ^c	67,49 ^{a, c, e}
0	545,15 ^e	230,80 ^c	653,45 ^a	77,14 ^a
1	551,55 ^e	249,22 ^{a, b}	634,67 ^b	54,23 ^{b, c, d}
2	572,52 ^{c, d}	251,88 ^{a, b}	609,45 ^{c, e}	49,27 ^{d, e}
3	584,86 ^{a, b}	252,81 ^{a, b}	596,32 ^{d, e}	45,67 ^d
4	582,20 ^{a, b, c}	254,03 ^{a, b}	588,56 ^d	78,71 ^a
5	591,78 ^a	244,47 ^b	587,99 ^d	70,38 ^{a, b}

^{a, b} Letras distintas na mesma coluna indicam diferenças entre as médias pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

De forma semelhante à ruminação, o tempo de ócio aumentou ($P < 0,05$) no dia anterior à ocorrência clínica da mastite, atingiu o maior valor ($P < 0,05$) no dia da sua ocorrência e manteve-se elevado pelos dois dias seguintes ($P < 0,05$) (Tabela 1). O tempo de ócio é a diferença entre o tempo total e os tempos de ruminação e atividade. Mudanças em tempos de ruminação e atividade afetam o tempo de ócio. Por fim, observou-se aumento ($P < 0,05$) no tempo de ofegação nos dias -1 e 0. A ofegação dos animais pode ser explicada pela ocorrência de febre ou até mesmo a presença de dor. A ocorrência de febre e redução no consumo de alimentos podem explicar os efeitos da mastite clínica sobre os parâmetros avaliados.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite clínica interfere no comportamento animal monitorado por coleiras eletrônicas. Os tempos de ruminação e ócio foram mais sensíveis, afetados por mais tempo. A ofegação também pode auxiliar no acompanhamento da evolução clínica da doença. O monitoramento eletrônico é importante ferramenta auxiliar para o diagnóstico precoce e monitoramento da evolução clínica da mastite. Mais estudos devem ser conduzidos para associar alterações comportamentais com protocolos de tratamento, de forma a reduzir os prejuízos causados pela mastite, seja pelos custos de tratamento e descarte do leite seja por minimizar a redução na produção, melhorando o bem-estar e consumo de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Petersson-Wolfe, C. S., et al. An Update on the Effect of Clinical Mastitis on the Welfare of Dairy Cows and Potential Therapies. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.34, p. 525-535, 2018.

Sharun, K., et al. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**. v.41, p. 107-136, 2021.

Stangaferro, M. L., et al. Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part II. **Mastitis. Journal of Dairy Science**. v.99, p. 7411-7421, 2016.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, agradeço pelo apoio financeiro, imprescindível para a elaboração e desenvolvimento da pesquisa que oportunizou a elaboração deste trabalho. Com o auxílio desta prestigiada Fundação foi possível trazer mais inovação e conhecimento para a ciência médica veterinária.

EFEITO DE ÍNDICES TÉRMICOS NA TAXA DE PREENHIZ DE VACAS GIROLANDO DE DIFERENTES GRAUS SANGUÍNEOS

Guilherme Brandão Gonçalves Bizinoto¹, Emmanuel Arnhold², Maria Lúcia Gambarini³

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. ²Professor da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. ³Professora da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

INTRODUÇÃO

O estresse térmico tem efeito negativo na eficiência reprodutiva de vacas leiteiras, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Além da reprodução, o estresse térmico interfere negativamente em muitos aspectos, tais como produção, sanidade e rentabilidade da produção leiteira.

Os efeitos do estresse térmico na reprodução de bovinos veem sendo amplamente estudados nos últimos anos, através do estudo da relação entre índices térmicos e o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. Índice de Temperatura e Umidade (ITU), Índice de Temperatura e Umidade Ajustado (ITU ajust.), Índice de Temperatura Equivalente (ITE), Índice de Estresse Ambiental (IEA) Índice de Carga Térmica (ICT) são exemplos de índices térmicos utilizados para mensurar a intensidade do desafio ambiental. Diferenças significativas na taxa de prenhez de vacas de leite foram encontradas em épocas do ano distintas, bem como em ITU acima de 68, evidenciando o impacto do estresse térmico na reprodução bovina. A redução da fertilidade devido ao estresse térmico está relacionada com a alteração da dinâmica folicular ovariana, comprometendo a qualidade do oócito, além do desenvolvimento embrionário.

Esse estudo foi desenvolvido como objetivo de avaliar o efeito dos índices térmicos no desempenho reprodutivo de vacas Girolando de diferentes graus sanguíneos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados para o presente estudo foram obtidos de uma fazenda leiteira comercial, localizada no município de Morrinhos/GO. Todos os animais são registrados na Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, o que tornou possível a análise de acordo com a composição racial individual. As vacas são mantidas em sistema de produção à pasto com suplementação e ordenhadas duas vezes ao dia via ordenha mecanizada. Foram analisados dados relativos a 2.093 manejos reprodutivos do período de maio de 2020 a abril de 2021, utilizando três biotecnologias reprodutivas: Inseminação artificial (IATF), transferência de embriões em tempo fixo (TETF), em que os embriões eram produzidos via superovulação (SOV) ou fertilização in vitro (FIV).

Os dados climáticos foram obtidos da estação meteorológica do Instituto Federal Goiano de Morrinhos (IFGoiano – Campus Morrinhos), localizado a 29 quilômetros da propriedade. Os cálculos do Índice de Temperatura e Umidade (ITU), Índice de Temperatura e Umidade Ajustado (ITU ajust.), Índice de Temperatura Equivalente (ITE), Índice de Estresse Ambiental (IEA) Índice de Carga Térmica (ICT) foram feitos de acordo com o proposto por Thom (1959), Mader (2003), Baeta et al., (1987), Moran et al. (2001) e Gaughan et al. (2008), respectivamente.

Para análise estatística, uma vaca foi classificada como “prenhe” quando diagnosticada a gestação por palpação retal e ultrassonografia aos 30 dias pós serviço. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico R® na versão 4.1.3. Foram realizadas associações incondicionais (teste *Qui*-quadrado para independência) para avaliar se a prenhez dependia das variáveis avaliadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de taxa de prenhez de acordo com o grau sanguíneo e com os índices térmicos estão apresentados na tabela 1 e na tabela 2, respectivamente.

Tabela 1 - Taxa de prenhez de vacas Girolando de acordo com o grau sanguíneo.

Variável	Categoria	Prenhez		P
Grau sanguíneo	1/2	196/531	36,91%	0,6272
	5/8	281/830	33,85%	
	3/4	228/624	36,54%	
	PS ¹	38/108	35,19%	

¹Puro Sintético.

Não houve diferença ($P > 0,05$) na taxa de prenhez, possivelmente pelo fato dos animais Girolando, independentemente da composição racial, apresentarem resistência superior aos efeitos do estresse térmico.

Tabela 2 - Taxa de prenhez de vacas Girolando de acordo com os índices térmicos.

Variável	Categoria	Prenhez		P
ITU 68	Abaixo	237/613	38,66%	0,0524
	Acima	506/1480	34,19%	
ITU 72	Abaixo	682/1942	35,12%	0,1954
	Acima	61/151	40,40%	
ITUajust 68	Abaixo	381/1028	37,06%	0,1421
	Acima	362/1065	34,00%	
ITUajust 72	Abaixo	514/1354	37,96%	0,0013
	Acima	229/739	30,99%	
ITEmédio	< 23,77	348/929	37,46%	0,0942
	≥ 23,77	395/1164	33,93%	
ITEquartil	≤ 21,57	184/520	35,38%	0,9828
	21,57 < x < 25,58	374/1048	35,68%	
	≥ 25,58	185/525	35,24%	
IEAmédio	< 19,42	337/891	37,82%	0,0560
	≥ 19,42	406/1202	33,78%	
IEAquartil	≤ 17,57	201/498	40,36%	0,0337
	17,57 < x < 20,12	370/1080	34,26%	
	≥ 20,12	172/515	33,40%	
ICTmédio	< 75,89	378/1021	37,02%	0,1553
	≥ 75,89	365/1072	34,05%	
ICTquartil	≤ 69,82	208/528	39,39%	0,0358
	69,82 < x < 78,33	356/1004	35,46%	
	≥ 78,33	179/561	31,91%	

Houve diferença ($P < 0,05$) na taxa de prenhez quando os animais estavam submetidos a graus de estresse térmico distintos. Animais que estavam categorizados

com ITU ajustado acima de 72, IEA \leq 17,5, ICT \leq 69,8 apresentaram taxa de prenhez de (37,9%, 40,3%, 39,3%), respectivamente.

Quando a carga de calor excede a capacidade de dissipação, ultrapassando a zona de termoneutralidade, o organismo desencadeia reações fisiológicas e comportamentais, visando a manutenção da homeostase. Vale ressaltar que, quando o estresse térmico causa efeito negativo no desempenho reprodutivo das vacas, como esse estudo evidenciou, tanto índices produtivos quanto o bem estar desses animais já foram impactados primariamente.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que os efeitos do estresse térmico no desempenho reprodutivo de vacas Girolando variam de acordo com a intensidade do desafio climático ao qual o animal está sendo submetido, avaliado por meio dos índices térmicos calculados. A taxa de prenhez similar, independente do grau sanguíneo, sinaliza que a raça Girolando possui resistência superior aos desafios climáticos em qualquer composição racial. Novos estudos com animais Girolando em regiões diferentes e características ambientais distintas devem ser conduzidos, para melhor orientar os produtores e técnicos, visto que a maioria dos estudos atuais avaliam animais da raça Holandesa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baeta, F.C., Meador, N.F., Shanklin, M.D., Johnson, H.D. Equivalent temperature index at temperatures above the thermoneutral for lactating dairy cows. **Am Soc Agric Eng.** 1987.
- Gaughan, J.B., Mader, T.L., Holt, S.M., Lisle, A. A new heat load index for feedlot cattle. **J Anim Sci.** 2008;86(1):226–34.
- Mader, T. Environmental stress in confined beef cattle. **J Anim Sci.** 2003;81(14_suppl_2):E110–9.
- Moran, D.S., Pandolf, K.B., Shapiro, Y., Heled, Y., Shani, Y., Mathew, W.T. An environmental stress index (ESI) as a substitute for the wet bulb globe temperature (WBGT). **J Therm Biol.** 2001;26(4–5):427–31.
- Thom, E.C. The Discomfort Index. *Weatherwise.* 1959;12(2):57–61.

HORÁRIO DE ORDENHA, COMPORTAMENTO ALIMENTAR E DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS A PASTO

Delane Ribas da Rosa¹, Bruna Schmitz¹, Cindy Anne Klausberger Ximenes¹, Juliany Ardenghi Guimarães², Paulo César de Faccio Carvalho¹, Vívian Fischer¹

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. ²Graduação de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

INTRODUÇÃO

A complexidade e a quantidade de fatores que constituem um sistema de bovinos em pastagem e o seu dinamismo influencia no comportamento ingestivo dos animais, o qual está diretamente relacionado com o consumo de forragem, bem como ao desempenho animal, de modo que a resposta animal é uma consequência do manejo realizado e da qualidade da dieta consumida. Assim, tem-se a importância do conhecimento do comportamento animal como uma ferramenta crucial para proporcionar as condições ideais e ajustá-las com o sistema e objetivo de produção.

Na produção de vacas de leite em pastejo, a maximização do consumo de pasto é essencial para garantir um bom desempenho. O bovino segue um ciclo circadiano de comportamento ingestivo com maior incidência de pastejo ao amanhecer e ao anoitecer (Van Soest, 1994). No entanto, estes são os horários convencionais para o manejo da ordenha que coincidem com os horários de maior consumo do pasto.

Trabalhamos com a hipótese de que a realização de ordenha em horários que não coincidem com os momentos de maior intensidade de pastejo favorecem um maior consumo de pasto e alteram o consumo de suplementos sem prejudicar a produção e composição do leite. O objetivo foi avaliar os efeitos da mudança dos horários convencionais de ordenha da manhã e da tarde sobre o comportamento ingestivo, ingestão de suplemento e desempenho produtivo de vacas em lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em uma propriedade na cidade de Fagundes Varela-RS nos meses de março e abril de 2022. Dezoito vacas multíparas das raças Holandesa e Jersey, com dias em lactação entre 30 e 150 dias, produzindo entre 15 e

30 litros de leite e em sistema de pastejo em “pastoreio rotatínuo” com suplementação foram avaliadas em horário convencional de ordenha da propriedade (6:30 horas e das 17 horas) por 7 dias, e posteriormente as mesmas vacas foram avaliadas no horário alternativo de ordenha (8 horas e às 16 horas) por mais 21 dias com transição de horário ordenha gradual entre os tratamentos.

Semanalmente coletou-se dados de produção de leite, porcentagem de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, CCS, estabilidade do leite a solução álcool etílico P.A. de 74%, 80% (BRASIL, 2018) e acidez titulável com Solução Dornic (Vidal; Saran Netto, 2018), bem como informações sobre o comportamento ingestivo (pastejo, ruminação e ócio) e a posição no momento da observação (em pé ou deitado) em ambos os manejos duas vezes por semana. Concomitantemente, procedeu-se o monitoramento da saúde da glândula mamária com testes semanais de CMT e caneca de fundo preto.

Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias (antes, transição e após a troca) foi feita por meio do teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade. Os tempos de cada atividade foram comparados em intervalos de quatro horas: h1 (6:31-10:30h), h2 (10:31-14:30h), h3 (14:31-18:30h), dentro do período total de observação de 12 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de leite e seus constituintes não diferiram entre o antes e depois da troca de horário de ordenha, assim como estabilidade e acidez, mantendo os padrões anteriores a mudança. Manteve-se inalterada o consumo de suplementos em todo o experimento ($p>0,05$). A ausência de modificações na composição foi documentada por Zanela et al. (2006) quando as vacas foram expostas a restrição alimentar, com exceção da estabilidade em álcool.

O pastejo foi maior ($p<0,05$) antes do que durante a transição e após a alteração do horário de ordenha em h1. Já em h2 e h3 os tempos pastejo diferiram ($p<0,01$) com maior média após a troca. Esta translocação dos momentos de pastejo supriu as necessidades nutricionais das vacas, não alterando a produção ou demais características das vacas e a saúde da glândula mamária.

As médias de ruminação diferiram em h1, no entanto em h2 houve diferença significativa ($p<0,05$) entre o antes e o depois, consequência das características físicas do alimento, como tamanho de partícula, químicas, teor e tipo de carboidrato, consumo de matéria seca, proporção de FDN total consumido no intervalo anterior ou durante a observação. (Silveira et al., 2021).

Observou-se maior tempo de ócio na transição em h1 e h2 e diminuição do ócio nos dias seguintes ($p<0,01$). Podemos relacionar o aumento do ócio a existência de eventos que levam as vacas a esperarem e não executam as atividades nos momentos próximos a ordenha, como pessoas, sons, movimentação, luminosidade, bem como a locomoção e espera para a ordenha (Oliveira e Keeling, 2018).

Com relação a posição, os animais ficaram mais tempo de pé na transição em h1 ($p<0,05$), seguido pelos momentos depois e antes, respectivamente. Em h2 a transição e o após não diferiram entre si. Houve diferença entre as médias de deitado ($p<0,05$) nos períodos de observação, com prevalência do pré em h2 e h3.

Tais resultados demonstram que as vacas leiteiras em pastejo alteraram suas atividades com a troca de horário de ordenha, fato este explicado pela sensibilidade das das vacas à alteração de rotina em resposta às movimentações cotidianas do humanos (Oliveira e Keeling, 2018).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos dados apresentados, foi possível constatar que o manejo de ordenha influencia na atividade alimentar do animal, uma vez que, neste sistema, o animal é conduzido aos ambientes de alimentação. O horário alternativo de ordenha (8h e 16h) não afetou negativamente a produção e características do leite, mostrando-se uma opção de manejo a ser utilizada na rotina do produtor.

AGRADECIMENTO

Agradeço à orientadora Vívian Fischer pelos ensinamentos, às colegas e amigas de mestrado pelo apoio, aos produtores de leite de Fagundes Varela-RS pela parceria, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao CNPq pelo incentivo e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Oliveira, D.; Keeling, L. J. Routine activities and emotion in the life of dairy cows: Integrating body language into an affective state framework. PLoS ONE, v.13, n.5, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195674>>

Silveira, R. K., et al. Alimentos processados para bovinos: Riscos relacionados aos teores de fibra. Revista Brasileira de Nutrição Animal, v.15, n.1, p.1–11, 2021. VAN Soest, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1994.

Zanela, M. B. et al. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, n.5, p.835–840, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0100-204x2006000500016>>

SEASONALITY ON SOMATIC CELL COUNTS OF HOLSTEIN CATTLE IN BRAZILIAN FARMS

Timotheo Souza Silveira^{1,2}, Leonardo Lozano Damasceno^{1,3}, Rodrigo de Almeida¹

¹Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. ²Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Castro, Brasil. ³Castrolanda Cooperativa Agroindustrial, Castro, Brasil

INTRODUCTION

Throughout the year milk composition have a distinct seasonal relationship. In many regions, somatic cell count (SCC) has a seasonal pattern with increases during the summer and decreases during the winter months. Summer heat stress, older cows, more cows in later stages of lactation (Green et al., 2006), dietary changes, and mixing of groups (Harmon, 1994) may all be contributing factors. In the United States, the highest percentages of DHIA test-day SCC exceeding the official thresholds are in the summer months.

Traditionally, seasonality in dairy studies has been evaluated by comparison of aggregate data in discrete periods. Summer-to-winter ratios (Flamenbaum; Galon, 2010), in which the average of a variable studied during summertime is divided by its average during wintertime, have been commonly used as the measure of seasonality (Guinn, 2018).

Seasonality in dairy performance has economic implications (Ferreira; De Vries, 2015). In order to maintain consistent dairy output, cows may give birth during periods of increased heat stress. In the long term, this might increase illness incidence and decrease profitability. Changes in producer payments can produce positive results to improve milk quality over time.

The purpose of this study was to determine how the seasonality influences bulk tank SCC (BTSCC) levels in Brazilian dairy herds and to confirm that the same trend observed in the Northern hemisphere is also observed in the Southern hemisphere.

MATERIALS AND METHODS

Information from 233 DHI official milk recording herds from 2013 to 2019 was studied. The region's average latitude was 24.8 degrees South and the average temperature was 23.8°C. The initial database was edited and 55 herds were maintained. The selection criteria for keeping these herds were: information in at least 80 months, from a total of 84 months. The dataset had 949,148 cows test-days and the bulk tank information has been calculated from the test day information. The herds were predominantly Holsteins.

The SCC was transformed into SCS using a logarithmic transformation. In the statistical analysis with SAS v.9.4, the milk supplied, bulk tank SCC and log SCC (SCS), and the ratio P2/P1 were estimated. Periods P1 and P2 were defined from the months that had the highest and the lowest BTSCC, respectively. Period 1 (P1) was defined as August, September, and October months, and period 2 (P2) was defined as January, February, and March months. Dataset were analyzed to one-way ANOVA and parameter means were compared using the Tukey test.

RESULTS AND DISCUSSION

Throughout the year, we found well-defined periods with P2 with lower milk production and higher BTSCC and P1 with lower BTSCC and higher milk yields. We found differences ($P < 0.05$) among years for SCS: 2.47, 2.48, 2.50, 2.47, 2.43, 2.44, and 2.42, respectively from 2013 to 2019. Differences among months were also observed ($P < 0.05$): 2.50, 2.50, 2.49, 2.49, 2.47, 2.45, 2.42, 2.43, 2.42, 2.42, 2.44, and 2.45, respectively from January to December.

Farms which shipped lower milk volumes tended to have a higher BTSCC throughout the year and had greater seasonality in their BTSCC as well. They also had greater seasonality in the volume of milk shipped. In the present study, volume of milk shipped is a proxy for herd size, thereby indicating that larger herds tended to have lower BTSCC.

The P2/P1 ratio is 1.17 for SCS and 0.82 for milk delivered, which means that in the end of summer months (P2; January, February and March) these herds delivered 18% less milk with 17% higher BTSCC than in the spring months (P1; August, September and October). The subtropical climate with its high temperature and high humidity in the summer is conducive to an increase in intramammary infections and reduction in milk production. These effects of heat stress may explain part of the increase in BTSCC and decrease the milk volume shipped in the warmer months.

In the United States, larger herds are more likely to establish and follow strict sanitation and mastitis control programs (Ferreira; De Vries, 2015). We believe that the same occurs in Brazil. In the present study, larger farms tended to be less seasonal in their BTSCC and milk volume, indicating that they might provide more heat abatement.

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

The findings of this study show the same seasonality as those observed in similar studies from the United States. Farms that delivered more milk throughout the year had a lower seasonality. We found a significant impact between the alignment of pricing policies established by the market and the response in dairy sales. To control this variation, a bonus policy for quality brought a smaller variation throughout the year. But we found that physiological factors affect the milk quality. Changes in management are possible to current growth in supplying the market, but the animal's physiological seasonality persists and must be examined.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- Ferreira, F. C.; De Vries, A. Effects of season and herd milk volume on somatic cell counts of Florida dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.4182-4197, 2015.
- Flamenbaum, I.; Galon, N. Management of heat stress to improve fertility in dairy cows in Israel. **J. Reprod. Dev.**, v.56, p.S36-S41, 2010.
- Green, L. E.; SCHUKKEN, Y. H.; GREEN, M. J. On distinguishing cause and consequence: Do high somatic cell counts lead to lower milk yield or does high milk yield lead to lower somatic cell count. **Prev. Vet. Med.**, v.76, p.74-89, 2006.
- Guinn, J. M. Comparing dairy farm performance and heat stress abatement strategies in the United States using summer to winter ratios. M.Sc. Thesis. Univ. Kentucky, Lexington, 2018.
- Harmon, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2103-2112, 1994.

Área Temática 05: MICROBIOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS

AFLATOXINAS M1: PERCEPÇÃO DE PRODUTORES DE QUEIJO ARTESANAL

Isabela Maria de Moura Silva¹, Adriano Gomes da Cruz², Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Pernambuco, Brasil. ²Departamento de Alimentos Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil

INTRODUÇÃO

Os consumidores de leite e derivados estão constantemente expostos a potenciais ameaças à saúde devido a grande susceptibilidade desta matéria-prima a contaminação. Compreender a percepção dos produtores rurais sobre a presença de aflatoxinas nos produtos lácteos pode contribuir para produção de alimentos seguros (Paraffin et al., 2018).

Os fungos são os micro-organismos responsáveis pela produção destas micotoxinas nos cereais que habitualmente são utilizados na alimentação dos rebanhos leiteiros (Gonçalves et al., 2020). O milho e o sorgo são culturas vegetais passíveis ao ataque de cepas micotoxigênicas desde a produção no campo, assim como no processamento na forma de ração e, posteriormente, durante o período de armazenamento, pois sua extensão não é previsível já que pode variar de acordo com as práticas agrícolas adotadas (Oliveira & Corrassim, 2014).

As aflatoxinas ingeridas pela alimentação dos bovinos podem ser metabolizadas parcialmente no lúmen intestinal, enquanto outra fração é eliminada através da urina, fezes e leite. Conseqüentemente, o consumo do leite e seus derivados, pode representar um grande risco para a saúde pública diante do elevado potencial carcinogênico, teratogênico e mutagênico das aflatoxinas (Claeys et al, 2020).

O consumo de queijo representa uma das principais vias de exposição humana as aflatoxinas M1, já que o processamento do leite para obtenção de queijo aumenta a concentração desta substância devido sua elevada afinidade pela caseína (Jiang et al., 2021). Dessa maneira, este estudo teve o objetivo investigar a percepção de produtores artesanais sobre a presença de aflatoxinas M1 em queijos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em propriedades rurais localizadas no Estado de Pernambuco, Brasil. Foram visitadas vinte e seis fazendas produtoras de queijo artesanal (n=26) no período de março a maio de 2022. Os proprietários e/ou responsáveis pela produção do estabelecimento foram convidados para participar da pesquisa de acordo com os protocolos aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco (protocolo n.5354.204/2022 CEPE-UFRPE). A percepção dos produtores artesanais sobre a presença de aflatoxinas M1 em queijos foi investigada através de um questionário semi-estruturado composto de 08 sentenças (Tabela 1) no qual o respondente expressou o grau de concordância com as afirmativas de acordo com a escala bipolar de Likert de cinco pontos (1=discordo totalmente, 2=discordo parcialmente, 3=não sei, 4=concordo parcialmente, 5=concordo totalmente). Os dados foram analisados através de estatística descritiva utilizando o programa SPSS statistics da IBM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A percepção dos produtores de queijo artesanal do Estado de Pernambuco sobre a presença de aflatoxinas M1 foi apresentada na Tabela 1. De uma maneira geral, a resposta mais frequente quanto o grau de concordância entre os produtores rurais foi “Não Sei”, demonstrando a notória ausência de conhecimento dos respondentes quanto

ao tema abordado. Segundo Kimatu & Kanui (2017) é importante investir na informação de produtores rurais para tentar reduzir ou erradicar a produção de aflatoxinas em toda cadeia produtiva de alimentos.

Uma porcentagem significativa dos entrevistados (n=25, 96.15%) afirmaram não saber que as aflatoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos, assim como 88.46% (n=23) não sabiam que estas micotoxinas são prejudiciais a saúde do homem e dos animais. Esses resultados são preocupantes, pois de acordo com Oliveira & Corrassim (2014) a exposição crônica às aflatoxinas pode ocasionar problemas na saúde humana e animal. O consumo de aflatoxinas por vacas em lactação pode provocar uma redução no consumo de alimentos e conseqüente diminuição na produção de leite, em contrapartida, o consumo pelos humanos pode ocasionar problemas mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos, com destaque para o aumento na incidência de câncer hepático.

Apenas três produtores (11,54%) concordaram totalmente que as aflatoxinas podem ser encontradas na ração, assim como que, seu preparo e armazenamento adequado previnem o aparecimento desta micotoxina. Segundo Gonçalves *et al.* (2020) os alimentos e rações fornecidos aos rebanhos leiteiros são bastante susceptíveis ao ataque de cepas micotoxigênicas.

Aproximadamente 80,77% dos entrevistados (n=21) afirmaram não saber que as aflatoxinas são capazes de passar da ração contaminada para o leite e após o processamento para o queijo. Equivocadamente 19,23% dos produtores (n=05) concordaram totalmente que o tratamento térmico reduz a quantidade de aflatoxinas no queijo. Segundo Oliveira & Corrassim (2014) de acordo com os atuais conhecimentos técnicos e científicos, nenhum método é capaz de eliminar as aflatoxinas dos alimentos, sendo necessário adotar as Boas Práticas Agropecuárias como uma medida preventiva.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de aflatoxinas nos alimentos constitui uma grave ameaça à saúde pública e a economia de qualquer nação. Esta pesquisa constatou que a percepção dos produtores de queijo artesanal é inadequada. Esses dados podem se refletir na adoção insuficiente de medidas preventivas como a adoção das Boas Práticas Agropecuárias. Portanto, é importante realizar o monitoramento analítico dos queijos para realizar uma avaliação da exposição na dieta, bem como incentivar ações de educação sanitária em toda cadeia produtiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Claeys, L. *et al.* Mycotoxin exposure and human cancer risk: a systematic review of epidemiological studies. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, v. 19, p. 1449-1464, 2020.
- Gonçalves, Bruna Leonel *et al.* Aflatoxin M₁: biological decontamination methods in milk and cheese. **Food Sci. Technol**, v. 42, p. 22920, 2020.
- Jiang, Y *et al.* Aflatoxin in Dairy Cows: Toxicity, Occurrence in Feedstuffs and Milk and Dietary Mitigation Strategies. **Toxins**, v. 13, p. 283, 2021.
- Paraffin, A. S.; Zindove, T. J.; Chimonyo, M, Perceptions of factors affecting milk quality and safety among large- and small-scale dairy farmer in Zimbabwe. **Jornal of Food Quality**, v.18, 7pages, 2018.

AGENTES ETIOLÓGICOS DE MASTITE SUBCLÍNICA EM VACAS JERSEY DE UM REBANHO NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

Rosângela Silveira Barbosa¹, Maira Balbinotti Zanela¹, Denise da Fontoura Prates², Fernanda Moreira Oliveira², Renata Dias Dalbann², Christiano Fanck Weissheimer¹, Álcio Azambuja¹, Renata Costa Schramm³

¹Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. ²Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq, Programa Leite Seguro, Laboratório de Qualidade do Leite, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. ³Laboratório de Doenças Infecciosas e Bacteriologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma inflamação na glândula mamária decorrente de agressões físicas no local ou da presença de agentes infecciosos (Wang et al., 2021). Essa doença ainda é considerada uma das mais frequentes em rebanhos leiteiros e tem efeitos globais reconhecidos, prejudicando o bem-estar animal, a qualidade do leite e a rentabilidade desta cadeia. Ainda, pode constituir risco à saúde pública, em decorrência da veiculação de patógenos e suas toxinas (Ruegg, 2017).

A etiologia da mastite é complexa e multivariada. Quando a causa é microbiológica, há uma gama de mais de 140 micro-organismos que podem infectar o úbere (Zanela; Ribeiro, 2016).

O diagnóstico da mastite subclínica não é tão simples. A subclínica é considerada silenciosa, por não gerar sintomas clínicos visíveis no rebanho, esta pode ser monitorada por métodos auxiliares, como a contagem de células somáticas (CCS) e o California Mastitis Test (CMT). Métodos bacteriológicos do leite são eficazes para detectar mastite, inclusive, subclínica nos rebanhos, embora expressem dificuldade de utilização rotineira devido aos custos, demandarem suporte técnico e serem laboriosos.

Sabendo que a identificação dos micro-organismos que causam mastite é de extrema importância, pois os resultados auxiliam na identificação da origem do problema (bactéria ambiental ou contagiosa) e auxilia na estratégia de controle, prevenção, ainda serve para o monitoramento de rebanhos. Objetivou-se monitorar a mastite subclínica com identificação dos agentes etiológico, em rebanho de vacas Jersey no sul do Rio Grande do Sul, visando a seleção de animais para a realização de experimentos do Programa Leite Seguro.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite dos quartos mamários foram provenientes, de 29 vacas Jersey, em média, do rebanho do Sistema de Produção em Pecuária Leiteira (SISPEL), localizado no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. O rebanho experimental foi monitorado entre os meses de abril a julho de 2022.

A coleta das amostras foi realizada antes da ordenha da tarde, após o uso de pré-dipping com solução iodada e secagem das tetas com papel toalha individual. A identificação de mastite subclínica foi realizada pelo teste de California Mastitis Test (CMT), conforme Langenegger et al. (1970). A interpretação de CMT seguiu Tronco (1997), sendo: a) negativa (0) (sem alteração da viscosidade); b) uma cruz (+) (fracamente positivo com pequena alteração da viscosidade); c) duas cruzes (++) (positivo, com formação de viscosidade aparente); e d) três cruzes (+++) (fortemente positivo, com formação de muco).

As tetas que apresentaram reação positiva ao teste de CMT tiveram o leite coletado para análise microbiológica, após a desinfecção com algodão e álcool 70% v/v. As amostras individuais de 2 a 5 mL de leite foram coletadas em tubos de ensaio com tampa, previamente esterilizados, sendo transportadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável, até o Laboratório de Doenças Infecciosas e Bacteriologia da Faculdade de

Medicina Veterinária, para isolamento e identificação dos agentes etiológicos da mastite. Inicialmente as amostras foram semeadas na superfície de placas de Petri com ágar suplementado com sangue ovino desfibrinado a 5%. Após a incubação a 37°C/24 a 72 h, realizou-se a identificação dos micro-organismos (Koneman et al., 2001). Os dados foram analisados em relação ao número de animais com mastite subclínica, percentual de crescimento bacteriano e os principais agentes etiológicos isolados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas, no período de 04 meses, 117 vacas, totalizando 461 amostras de quartos mamários, descontando-se os tetos secos. Das amostras analisadas, 159 (34,5%) apresentaram reação positiva no CMT, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados do California Mastitis Test (CMT) e da análise microbiológica de leite de vacas em lactação em rebanho experimental.

Mês	Nº Vacas	Nº de teto seco	CMT				Total de tetos para análise microbiológica	Nº de amostras com isolamento positivo (%)
			(0)	(+)	(++)	(+++)		
Abril	30	1	70	26	15	8	49	14 (28,6%)
Mai	28	2	82	25	3	0	28	14 (50%)
Junho	28	2	82	25	3	0	28	6 (21,4%)
Julho	31	2	68	30	21	3	54	16 (29,6%)
Total	117	7	302	106	42	11	59	50 (31,4%)

Nota: Interpretação dos graus de intensidade do CMT= Negativa (0) (sem alteração da viscosidade); (+) (fracamente positivo com pequena alteração da viscosidade); (++) (positivo, com formação de viscosidade aparente); (+++) (fortemente positivo, com formação de muco).

Em relação as 159 amostras de leite que foram encaminhadas para análise microbiológica, 109 (68,5%) não apresentaram crescimentos bacteriano e 31,4 apresentaram isolamento microbiano. Destas, identificou-se *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) em 80% das amostras. SNC é uma bactéria Gram positiva, normalmente encontrada na pele do teto dos animais, consideradas contaminantes ou patógenos secundários, presente normalmente em condições de manejo higiênico adequado.

Convém salientar que, parte da qualidade do leite é estabelecida a partir da sanidade das glândulas mamária das vacas em lactação, por isso, a investigação microbiológica é de suma importância e é mais eficiente que testes auxiliares de diagnóstico de mastite.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O monitoramento da mastite subclínica, em rebanho de vacas Jersey no sul do RS, apresentou índice compatível com manejo de ordenha adequado, com um grande percentual de amostras negativas e a presença de bactérias secundárias no isolamento microbiológico. Desta forma, conclui-se que a saúde do úbere do rebanho apresenta condições para a realização dos experimentos do Programa Leite Seguro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Nan Wang et al. Mechanisms by which mastitis affects reproduction in dairy cow: a review. *Reproduction in Domestic Animals*. v.Ruegg, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.12, p.10381–10397. 2017.

Koneman, e. W.; Allen, s. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn JR, W. C. W. **Diagnóstico microbiológico – Texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.
Zanela, Maira Balbinotti., et al. Recomendações Técnicas para Diagnóstico, Identificação de Agentes e Controle da Mastite. Pelotas. Embrapa Clima Temperado, 2016. 6p. (**Embrapa Clima Temperado**. Circular Técnica, 175). ISSN 1516-8832.

AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Defesa de Direito Difuso do Consumidor pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsas e a Universidade Federal de Pelotas pelo apoio na execução do trabalho.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS E RICOTAS INSPECIONADOS PELO SERVIÇO OFICIAL DO ESTADO DE GOIÁS EM 2020 E 2021

Priscilla Vanesa Rodrigues Gonçalves^{1,2}, Aline Barichello Cerqueira^{1,2}, Henricson Nascimento Custódio², Luanne Puglisi Marreto², Hérica Xavier da Costa², Saray Araújo Brandão Maranhão², Cíntia Silva Minafra e Rezende³

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás. ²Agência Goiana de Defesa Agropecuária. ³Professora do Departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

INTRODUÇÃO

O queijo é composto por um concentrado proteico-gorduroso constituído por caseína em forma de gel, resultante de coagulação do leite. Devido suas grandes vantagens nutricionais, o queijo possui grande importância nos hábitos de consumo da população brasileira, sendo parte integrante dos hábitos e da cultura nacional. A contaminação microbiológica desse produto reflete as condições de produção, armazenamento e transporte, e assume relevância tanto para a indústria, pelas perdas financeiras, como para a saúde pública, pelo risco de transmitir doenças (Paiva et al., 2020).

Esses alimentos são regulamentados pelos serviços de saúde competentes, que realizam atividades de educação, prevenção e fiscalização. O controle da produção é realizado como função exclusiva do Estado e se desenvolve por meio de ações de controle e intervenção (Brasil, 2017). Dessa forma, é imprescindível que seja realizada análise microbiológica para controle e monitoramento da fabricação e distribuição desses produtos. Neste sentido, o objetivo desse trabalho é realizar análise dos parâmetros de qualidade microbiológica de queijos, em amostras oriundas do Serviço de Inspeção do estado de Goiás entre 2020 e 2021.

MATERIAL E MÉTODOS

Nos anos de 2020 e 2021, foram coletadas e analisadas 258 amostras fiscais de queijos e ricotas por servidores do Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos (LABQUALI) da Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA). Após a colheita das amostras, as mesmas foram lacradas e acondicionadas sob temperatura adequada, conforme indicação de rotulagem, e encaminhadas ao LABQUALI. Na recepção das amostras no laboratório foi realizada aferição da temperatura do produto e integridade da embalagem.

No setor de microbiologia as amostras foram pesadas (alíquota de 25 g) e analisadas conforme normas ISO (*International Organization for Standardization*) referenciais (ISO 11133; ISO 7218; ISO 6887; ABNT NBR ISO 4831; ABNT NBR ISO 4832; ANBT NBR ISO 6888-1; ISO 6611/IDF 94; ISO 21528-2; ISO 6579-1), Manual de Métodos Oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e *American Public Health Association* (APHA). Os ensaios realizados variaram conforme o produto a ser analisado, em decorrência das determinações federais vigentes e observação de padrão de referência para o produto em questão.

Após o período de análise, os resultados obtidos foram interpretados, registrados e classificados qualitativamente como em “acordo” ou “desacordo”, conforme os padrões de referências vigentes na legislação federal (Port. 146/1996, MAPA; Port. 352/1997, MAPA; Port. 354/1997, MAPA; Port. 357/1997, MAPA; Port. 359/1997, MAPA; Port. 364/1997, MAPA; Res. 4/2000, MAPA; IN 30/2001, MAPA; IN 4/2004, MAPA; IN 16/2005, MAPA; IN 46/2007, MAPA; Port. 837/2018, MAPA; IN 58/2019, MAPA; Res. 1/2019, MAPA; IN 60/2019, ANVISA; IN 73/2020, MAPA; IN 66/2020, MAPA). A análise dos dados qualitativos foi realizada de forma descritiva, considerando

as frequências das alterações encontradas (%), em planilhas do programa EXCEL for Windows 2010.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram avaliadas 258 amostras de queijos, dentre eles muçarela (172), coalho (27), minas frescal (23), queijo curado ralado (20), minas padrão (05), provolone (05), ricota fresca (05) e ariche (01). Foi observado que 18,2% das amostras de queijos apresentaram resultados acima do padrão de referência preconizado em legislação vigente. Analisando as frequências dentre os tipos de queijo, notou-se que o Coalho possuiu a maior frequência (70,4%) de amostras em desacordo, seguido do Minas frescal (43,5%). O queijo ralado, Minas Padrão e Ricota apresentaram 20% das amostras acima do padrão permitido e Muçarela 7%. As amostras de Provolone e Ariche não apresentaram desacordos (Tabela 1).

Tabela 1 - Amostras fiscais de queijos e ricotas classificadas em “ACORDO” ou “DESACORDO”.

Produto	ACORDO	DESACORDO	TOTAL
Muçarela	160/172 (93%)	12/172 (7%)	172
Coalho	8/27 (29,6%)	19/27 (70,4%)	27
Queijo Minas frescal	13/23 (56,5%)	10/23 (43,5%)	23
Queijo ralado	16/20 (80%)	4/20 (20%)	20
Queijo Minas Padrão	4/5 (80%)	1/5 (20%)	5
Provolone	5/5 (100%)	0	5
Ricota	4/5 (80%)	1/5 (20%)	5
Ariche	1/1 (100%)	0	1
TOTAL	211/258 (81,8%)	47/258 (18,2%)	258

Tabela 2 - Amostras fiscais de queijos e ricotas em “DESACORDO”, segundo os padrões microbiológicos vigentes.

Produto	Contagem Coliformes totais	Contagem Coliformes a 45°C	Contagem <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Contagem Fungos e leveduras	Deteção de <i>Salmonella</i> spp.
Muçarela	6	2	7	NA	0
Coalho	16	9	6	NA	0
Queijo Minas frescal	8	0	2	5	0
Queijo ralado	0	0	0	4	0
Queijo Minas padrão	0	0	1	NA	0
Ricota	1	1	0	0	0
TOTAL	31/68 (45,6%)	12/68 (17,7%)	16/68 (23,5%)	9/68 (13,2%)	0

Nota: Algumas amostras foram classificadas em desacordo para mais de um ensaio microbiológico. NA: não se aplica

Observando a frequência sob a ótica dos ensaios realizados, notou-se que os desacordos foram mais predominantes para contagem de coliformes totais (45,6%), seguido da contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (23,5%) e da contagem de coliformes a 45°C (17,7%). Para o ensaio de contagem de fungos e leveduras foi observada uma menor frequência (13,2%), quando comparada aos outros ensaios realizados. Não houve amostras com detecção de *Salmonella* spp. (Tabela 2).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste estudo 81,8% dos queijos avaliados estavam em acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação. No entanto, o queijo Coalho apresentou maior índice de prevalência de não conformidades avaliadas, sendo a contaminação por coliformes totais e a 45°, *Staphylococcus* coagulase positiva as principais não conformidades descritas. As divulgações dos resultados são importantes como elementos norteadores para ação do Serviço de Inspeção Estadual e importância em saúde única, bem como são elementos que apontam para deficiência em procedimentos higiênico-sanitários relacionados aos processos de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Paiva, G.L., Ramosa, A., Nascimento, J.S., Cruza, A.G. Aplicação Da Avaliação Quantitativa De Risco Microbiológico Em Produtos Lácteos. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**. vol. 1, n. 10, 2020.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto N°9.013, De 29 De Março De 2017. Dispõe Sobre A Inspeção Industrial E Sanitária De Produtos De Origem Animal. Brasil, 2017.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Manual de Métodos Oficiais**. Brasil, 2015.

DIVERSIDADE BACTERIANA PRESENTE NO LEITE CRU COM BAIXA CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Vanessa Pereira de Abreu¹, Carla Daniela Suguimoto Leite¹, Maria Aparecida Batista Arantes², Valéria Quintana Cavicchioli³, Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro³, Iolanda Nunes³, Cristiano Sales Prado³, Moacir Evandro Lage³, Francine Duarte³, Cintia Minafra³

¹Pós-doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás. ²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás. ³Professor(a) da Escola de Veterinária e Zootecnia, Centro de Pesquisa em Alimentos da Universidade Federal de Goiás

INTRODUÇÃO

O leite é considerado alimento de grande relevância por apresentar alto valor nutritivo. Sabe-se que o leite cru contém comunidades bacterianas relacionadas ao ambiente da glândula mamária. Estudos demonstram que a microbiota do leite cru tem ganhado cada vez mais interesse nos últimos anos e deve ser explorada de forma ampliada, uma vez que a diversidade das populações bacterianas tem sido registrada pela adoção de técnicas de sequenciamento. A aplicação das técnicas de sequenciamento de DNA utilizando regiões do gene 16S rRNA pode revelar populações microbianas presentes no leite cru não detectáveis por técnicas tradicionais dependentes de cultura, além de permitir a detecção de comunidades dominantes e não dominantes.

Esta microbiota apresenta impacto direto na qualidade do leite e do seu beneficiamento na indústria, possibilitando o estudo do microbioma do leite de tanque a granel que poderá estar associado aos parâmetros de qualidade do leite (Rodrigues et al., 2017). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar uma investigação inicial da diversidade de gêneros bacterianos mais abundantes presentes em amostras de leite de tanques com baixa Contagem Padrão em Placas (CPP).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite cru refrigerado conservadas com azidiol, provenientes dos estados de Goiás (n=24) e Tocantins (n=6) foram analisadas por citometria de fluxo, pelo Laboratório de Qualidade do Leite (LQL/CPA/EVZ/UFG). As amostras foram selecionadas considerando resultados de CPP inferior a 100.000 UFC/mL.

Foi realizado o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) para a identificação dos gêneros bacterianos, utilizando regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA. A preparação das bibliotecas para sequenciamento de *amplicons* das bactérias foi realizada utilizando os oligonucleotídeos 341F e 806R em um protocolo de PCR de duas etapas (Wang & Qian, 2009).

As reações de PCR foram realizadas utilizando Platinum Taq (Invitrogen, EUA) com as condições específicas, sendo 95 °C por 5 min, 25 ciclos de 95 °C por 45 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 45 s e uma extensão final de 72 °C por 2 min para PCR 1 e na PCR 2 95 °C por 5 min, 10 ciclos de 95 °C por 45 s, 66 °C por 30 s e 72 °C por 45 s e uma extensão final de 72 °C por 2 min. Todas as reações de PCR foram realizadas em triplicata. As reações finais de PCR foram purificadas utilizando Neobeads® e em cada rodada de PCR, foi incluído um controle negativo de reação. A concentração final de DNA do *pool* de bibliotecas foi estimada através de ensaios utilizando Picogreen dsDNA (Invitrogen, EUA), e em seguida foi diluída para quantificação por qPCR utilizando o Kit de Quantificação de Biblioteca Colibri™ (Invitrogen, EUA).

Em cada amostra foi quantificado o total de sequências de DNA (*reads*) para as bactérias identificadas. A partir deste resultado, calculou-se a abundância e a proporção de sequências, considerando a totalidade de amostras e separadamente por região.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados 40 gêneros no total das 30 amostras coletadas. Contudo, 75.261 *reads* não foram atribuídos a nenhum gênero específico e foram agrupadas como não definidas, representando 14,99% do total de sequências.

Nas amostras pertencentes ao estado de Goiás foram identificados 34 gêneros, enquanto nas do estado do Tocantins, 26 gêneros. Foram identificados 20 gêneros em comum aos dois grupos, contudo, a abundância de *reads* para cada gênero entre as duas regiões foi diferente. Na Tabela 1, estão apresentados os dez gêneros mais abundantes para cada região.

Tabela 1. Proporção dos 10 gêneros mais abundantes nas amostras de leite cru com baixa CPP utilizando NGS, em cada região.

Região de Goiás	Proporção (%)	Região de Tocantins	Proporção (%)
<i>Enterococcus</i>	29,8	<i>Enterobacter</i>	62,83
<i>Streptococcus</i>	29,28	<i>Pantoea</i>	15,09
n.d.	16,51	n.d. Enterobacteriaceae	7,05
Enterobacteriaceae			
<i>Enterobacter</i>	8,55	<i>Citrobacter</i>	5,31
<i>Lactococcus</i>	6,67	<i>Pseudomonas</i>	4,59
<i>Citrobacter</i>	2,73	<i>Shigella</i>	1,02
<i>Pantoea</i>	1,57	<i>Lactococcus</i>	0,89
<i>Serratia</i>	1,09	<i>Klebsiella</i>	0,88
<i>Acinetobacter</i>	0,77	<i>Erwinia</i>	0,67
<i>Weissella</i>	0,18	<i>Hafnia</i>	0,61

n.d. Enterobacteriaceae = gêneros não definidos da família Enterobacteriaceae.

Observou-se que as amostras oriundas do Tocantins apresentaram maior prevalência (77,1%) de bactérias psicrotróficas da família Enterobacteriaceae, em comparação com as de Goiás (28,9%). Tais bactérias podem apresentar desenvolvimento sob baixas temperaturas e as amostras foram coletadas em tanques refrigerados, sem o controle do tempo em que o leite permaneceu neste local.

O NGS permite a identificação de uma “*core microbiota*” nas amostras de diferentes origens. Em revisão elaborada por Parente et al. (2020), foram apontados 25 principais gêneros encontrados em tanques de leite de diferentes países, relatados na literatura. Entre eles, foram em comum com os achados neste estudo os gêneros: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Staphylococcus*. Um gênero presente neste estudo, estando presente em amostras de ambas as regiões, pouco relatado na literatura, foi o *Pantoea*.

As diferenças encontradas entre os principais gêneros e entre as duas regiões podem ser decorrentes das condições climáticas e geográficas, de fatores não explorados neste estudo, como raça, alimentação, sistema de criação, manejo de ordenha, estágio da lactação, entre outros.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar similaridades para a composição do microbioma das amostras oriundas de duas regiões distintas, embora a proporção entre os principais gêneros obtidos tenha sido diferente. Destaca-se a presença do gênero *Pantoea*, pouco evidenciado em leite de tanque na literatura. Contudo, estudos adicionais controlando outras variáveis inerentes ao sistema de produção, a localização geográfica e considerando o tempo de armazenamento do leite nos tanques são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Parente, E., et al. The microbiota of dairy milk: A review. **International Dairy Journal**, v.107, n.104714, p.1-16, 2020.

Rodrigues, M. X., et al. The microbiome of bulk tank milk: Characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.4, p. 2536-2552, 2017.

Wang Y, Qian P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoSOne**, v.4, e7401, 2009.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Centro de Pesquisa em Alimentos vinculado à Escola de Veterinária e Zootecnia e à Universidade Federal de Goiás.

EFEITO DO PROJETO DE QUEIJOS FINOS SOBRE A QUALIDADE DO LEITE EM UMA PROPRIEDADE NO OESTE DO PARANÁ

Pâmela Rosana Schneider¹, Carolina Balera Trombini¹, Kennidy de Bortoli¹, Ana Paola Buchman¹, Rosilei Heck Schmidt¹, Leandro de Paula¹, Gabryella Della Giustina¹, Juliano da Rosa Justim²

¹Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de Queijos Finos, Associação de Ensino, Pesquisa e Extensão Biopark/Faculdade Biopark, Toledo, Paraná, Brasil.

²Associação de Ensino, Pesquisa e Extensão Biopark/Faculdade Biopark, Toledo, Paraná, Brasil

INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande potencial em atividades relacionadas ao agronegócio no setor leiteiro. O país produziu volumes superiores a 35,4 bilhões de litros de leite no ano de 2020 (IBGE, 2020). O Estado do Paraná é o 2º maior produtor de leite, tendo grande importância nacional neste setor (IBGE, 2020).

Embora seja um grande potencial produtivo, o país ainda enfrenta problemas com a baixa qualidade microbiológica do leite aqui produzido, principalmente devido aos altos índices de Contagem Padrão em Placas (CPP) em distintas propriedades leiteiras (Lopes et al., 2022). A CPP é fortemente impactada pela falha das boas práticas de ordenha, sobretudo a falta higiene e condições não conformes de estocagem do leite cru (Santana et al., 2020).

Por conseguinte, foi lançado em 2019 o Projeto de Queijos Finos do Parque Científico e Tecnológico de Biociências Ltda – Biopark, com a iniciativa de valorizar a bacia leiteira e contribuir com a diversificação de queijos para a região Oeste do Paraná. Assim como, conduzir com prioridade a profissionalização do produtor, corroborando com o desenvolvimento da qualidade do leite, o qual é a principal matéria-prima para a produção dos queijos.

Diante dos pressupostos apresentados, objetivou-se analisar o efeito na qualidade microbiológica do leite cru de uma propriedade conveniada ao Projeto de Queijos Finos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo foram avaliados resultados obtidos das amostras de leite do tanque expansão de uma propriedade conveniada ao Projeto de Queijos Finos do Biopark, localizada no município de Toledo – PR, no período de julho de 2019 a julho de 2022. As análises mensais de CPP foram realizadas no laboratório PARLPR, da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), pertencente a Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), considerando o método de citometria em fluxo referência para contagem microbiana do leite cru pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Os dados foram analisados segundo o teste não-paramétrico de Mann-Whitney com 95% de confiança, esse teste foi escolhido a fim de comparar a tendência central (mediana) devido a não necessidade de conhecimento acerca da distribuição dos resultados. O Minitab foi utilizado como programa estatístico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos dados coletados, foi possível a elaboração do gráfico de séries temporais, o qual apresenta os resultados de CPP, separado no período anterior a iniciativa do Biopark (ano 2019) e após a qualificação e suporte ao produtor (2020, 2021

e 2022) (Tabela 1). É possível observar uma nítida melhoria na avaliação microbiológica do leite cru, após as orientações propostas pela área técnica do Projeto de Queijos Finos, a partir de 2020, especialmente, observa-se uma média na contagem de CPP de 14.500 UFC/ml, diferentemente do semestre anterior (ano 2019), o qual apresentou média de contagem de CPP de 997.000 UFC/ml.

Tabela 3 - Resultados da Contagem Padrão em Placas (CPP) de uma propriedade do Projeto de Queijos Finos de julho de 2019 a julho de 2022

Mês analisado	CPP (x1.000 UFC/ml)
jul/19	1.024.000a
ago/19	1.390.000a
set/19	2.494.000a
out/19	970.000a
nov/19	428.000a
dez/19	43.000a
jan/20	249.000b
fev/20	12.000b
mar/20	12.000b
abr/20	14.000b
mai/20	21.000b
jun/20	31.000b
jul/20	27.000b
ago/20	185.000b
set/20	119.000b
out/20	13.000b
nov/20	7.000b
dez/20	28.000b
jan/21	7.000b
fev/21	6.000b
mar/21	4.000b
mai/21	54.000b
jun/21	20.000b
jul/21	98.000b
ago/21	5.000b
set/21	1.000b
out/21	14.000b
nov/21	11.000b
dez/21	21.000b
jan/22	300.000b
fev/22	11.000b
mar/22	15.000b
abr/22	11.000b
mai/22	40.000b
jun/22	4.000b
jul/22	30.000b

^aResultado anterior a iniciativa do Biopark; ^bResultado posterior a iniciativa do Biopark.

Com base nisso, uma vez que o valor-p apresentou um resultado abaixo do nível de significância (0,05), se comprova que após a iniciativa do Biopark os resultados microbiológicos do leite cru apresentaram uma melhora estatisticamente significativa quanto à sua tendência central, sendo o limite máximo especificado de 300.000 UFC/ml,

segundo a Instrução Normativa nº 76, de 2018 (BRASIL, 2018). Outros autores encontraram resultados positivos semelhantes sobre a qualidade microbiológica do leite, após a capacitação dos produtores e colaboradores responsáveis pelas atividades da produção, onde as abordagens principais foram sobre higienização de estruturas, equipamentos, ambientes e armazenamento do leite (Tischer et al., 2018; Pereira et al., 2022). Os avanços na tecnologia da fabricação de queijos são impulsionados pela demanda por qualidade do leite, o que justifica tais ações focadas no desenvolvimento desse parâmetro (Judacewski, 2020).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa forma, com base nos resultados coletados e analisados, comprova-se que após o início da atuação do Projeto de Queijos Finos do Parque Científico e Tecnológico de Biociências Ltda – Biopark, foi possível observar uma melhoria estatisticamente significativa nos resultados de Contagem Padrão em Placas, demonstrando que a participação junto ao projeto, se mostra eficiente perante a qualidade geral do leite produzido nesta propriedade.

AGRADECIMENTOS

Ao Parque Científico e Tecnológico de Biociências Ltda – Biopark e Associação de Ensino, Pesquisa e Extensão Biopark/Faculdade Biopark pela disponibilidade de realização deste trabalho.

EVOLUÇÃO DOS COLIFORMES AO LONGO DA MATURAÇÃO DE UM QUEIJO MINAS ARTESANAL DO MUNICÍPIO DE PIUMHI-MG

Mariana Tereza de Moraes Souza¹, Ana Carolina Alves Vieira²; Leonardo Borges Acurcio¹

¹Centro Universitário de Formiga - UNIFOR-MG – Formiga, MG, ²Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária - Belo Horizonte, MG

INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos queijos mais antigos e tradicionais produzidos no Brasil, sua produção envolve um grande número de pequenos produtores rurais, ajudando na sobrevivência de várias famílias, além de ser fundamental na economia de diversos municípios e regiões.

Existem uma série de microrganismos utilizados como indicadores de qualidade microbiológica em alimentos, como queijos. Dentre eles os coliformes totais, os quais possuem a capacidade de fermentar a lactose para a produção do ácido-láctico, na temperatura entre 35 e 36°C. O crescimento destes microrganismos é indicativo de baixa higiene de forma generalizada. Outro importante grupo de coliformes, os termotolerantes, são capazes de fermentar a lactose entre 44,5±0,5°C, estes são indicativos de contaminação por meio de material de origem fecal e sua presença é mais preocupante (Martins & Reis, 2012).

Muitos microrganismos podem ser utilizados para a avaliação microbiológica de alimentos, como o queijo, na qual sua contaminação geralmente ocorre durante seu processo de fabricação, através da manipulação, a partir de pessoas com hábitos de higiene inadequados e também por meio de matéria-prima contaminada em processos anteriores. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de um Queijo Minas Artesanal de Piumhi-MG em relação ao crescimento de enterobactérias ao início e final do seu processo de maturação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras, no mês de junho, de um QMA de diferentes tempos de maturação (Dia 0 e Dia 22) em um laticínio no município de Piumhi-MG. Foi realizada a análise microbiológica das amostras no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Formiga – UNIFOR-MG.

As amostras foram coletadas no laticínio, armazenadas em sacos plásticos e transportadas dentro de uma caixa térmica com refrigeração. O estudo teve caráter analítico descritivo e quantitativo, onde foi avaliada a possível presença de enterobactérias nessas amostras. Ao todo foram utilizadas seis amostras de QMA em diferentes tempos de maturação.

Para realização das análises microbiológicas, foram inicialmente preparadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) a partir de 1g de amostra e 9ml de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Após esse procedimento, foi realizado o plaqueamento do tipo “spread plate” nos meios de cultura ágar Salmonella Shigella (KASVI, São José dos Pinheiros, PR, Brasil) e Ágar MacConkey (KASVI, São José dos Pinheiros, PR, Brasil), os quais foram incubados em estufa a 36°C por 24 horas. Foram escolhidos estes meios de cultura pois ambos são seletivos para bactérias Gram negativo de origem intestinal, como enterobactérias (Câmara, 2011).

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). O teste realizado foi t Student pareado, onde foram considerados estatisticamente significativos resultados que apresentaram significância mínima de 5% ($p < 0,05$) entre si.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados mostraram a presença de bactérias do grupo coliformes em QMA acima do permitido pela legislação ($>10^3$), apesar de não ter sido utilizado métodos oficiais nesta análise (Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 331/2019 e Instrução Normativa (IN) 60/2019). Com isso, pode-se concluir que o tempo de maturação estipulado para a região da Serra da Canastra, 22 dias de maturação, não foi o suficiente para a eliminação das enterobactérias nas condições experimentais do presente estudo.

Contaminações podem ocorrer devido a diversos fatores, dentre eles condições sanitárias dos rebanhos, qualidade do leite, excessiva manipulação do queijo durante sua produção, além da falta de higiene e ambiente inadequado para a fabricação do produto (Santos et al., 2017). Tais aspectos podem explicar porque o queijo ao início da maturação (Dia 0) não obteve resultados diferentes ($p>0,05$) do queijo com 22 dias (final da maturação), tendo em vista o crescimento de coliformes.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Comparando a contagem de enterobactérias em dois tempos de maturação de um Queijo Minas Artesanal do município de Piumhi-MG, foi possível observar que não houve redução na contagem desses microrganismos ao final do período de maturação (22 dias). É importante atentar-se para as boas práticas de fabricação do Queijo Minas Artesanal, uma vez que elas podem estar relacionadas com a manutenção dos coliformes em níveis alarmantes.

Portanto, é importante que sejam realizadas novas pesquisas no laticínio pesquisado para se compreender melhor a fonte da contaminação e, assim, adequar-se à produção para a elaboração de um produto com contagens de coliformes reduzidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Martins, E.S., et al. Determinação de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas frescal. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v.06, n.02, p. 842-851, 2012.
- Santos, L. S. et al., Easy classification of traditional Minas cheeses using artificial neural networks and discriminant analysis. **International Journal of Dairy Technology**, [s.l.], v. 70, n. 4, p. 492-498, 2017.

IN VITRO EVALUATION OF PROBIOTIC AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ARTISANAL CHEESE PRODUCED IN THE SERRA GERAL – MINAS GERAIS - BRAZIL

Ana Carolina Alves Vieira¹, Thamiris Carolina Souza Mello¹, Gustavo Lucas Costa Valente¹, Elisabeth Neumann², Karen Costa², Elisa Elena Paz Andrade¹, Carla Ferreira Soares¹, Marcelo Resende de Souza¹

¹Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária - Belo Horizonte, MG.

²Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Biológicas - Belo Horizonte, MG

INTRODUCTION

There is great technological potential for the use of lactic acid bacteria (LAB) isolated from artisanal dairy products, such as cheese, and it has generated an increasing interest for the identification of these microorganisms, in addition to the evaluation of their potential probiotic properties. Andrade et al. (2014) and Silva et al. (2019) described *in vitro* probiotic potential of LAB isolated from Minas artisanal cheese produced in the Canastra and Araxá regions, respectively. However, to date, there is no research in the literature on the *in vitro* probiotic potential of LAB isolated from artisanal cheeses produced in the Serra Geral region, as well as their raw materials and production environment.

Thus, the present study aimed to evaluate the *in vitro* probiotic potential of LAB isolated from raw milk, endogenous starter cultures, artisanal cheeses and swabs from surfaces of the cheesemaking environment.

MATERIALS AND METHODS

The LAB used (*Leuconostoc pseudomesenteroides* (LPM); *Lactobacillus rhamnosus* (LR); *Levilactobacillus brevis* (LB); *Pediococcus pentosaceus* (PP); *Lactiplantibacillus plantarum* (LP); *Lactiplantibacillus plantarum* (LM); *Lactococcus lactis* (LLSG) and *Lactococcus lactis* (LLL)) were previously isolated and identified by proteomic analyses by Rocha (2021). The LAB were screened for their *in vitro* probiotic properties - in duplicate, with three repetitions - according to sensibility to antimicrobials, antagonistic activity against selected bacteria and resistance to both artificial gastric acid and bile salts.

The antibiogram was performed using the disk diffusion method, according to the technique adapted from Charteris et al. (1998). The spot-on-the-law antagonism was carried out using the technique proposed by Tagg et al. (1976). The artificial gastric acid and bile salt resistances were determined using the adapted technique described by Silva et al. (2013).

After carrying out the *in vitro* tests, two LAB that obtained the best results were selected for the elaboration of fermented milks, which were submitted to physical-chemical and microbiological analyses. For this, three different batches of Molico (Nestlé®, Araçatuba, São Paulo, Brazil) skimmed milk powder were used.

The fermented milk were stored at 8°C and after 1, 7 and 14 days they were submitted to physical chemical analyses: determinations of pH (Gehaka PG1800, São Paulo, Brazil), titratable acidity (AOAC, 2019); and contents of moisture, protein, and fat (AOAC, 2019). The counts of LAB in the initial inoculums and in fermented milks were also determined at 1, 7 and 14 days of storage, using serial decimal dilutions in saline solution (0.9% NaCl).

Graphpad Prism 7.0 software (Graphpad Software, San Diego, California, USA) was used to perform the statistical analyses.

RESULTS AND DISCUSSION

All evaluated LAB were sensitive to penicillin, tetracycline and chloramphenicol. A total of 87.5% of the LAB showed resistance to vancomycin. Most of the LAB (75%) showed resistance to ciprofloxacin and 75% to gentamicin. All LAB were resistant to amikacin.

All samples were able to produce inhibition halos against the tested pathogens. In addition, no LAB produced halos against the LAB isolated from Minas artisanal cheese, which is desirable for LAB screening. *Salmonella* var. Typhimurium was inhibited by some samples, as *Lactococcus lactis* (LLL).

None of the LAB was considered tolerant to artificial gastric acid, being only sensitive (25%) or moderately tolerant (75%). Regarding bile salt resistance, 87.5% of the LAB (7/8) were tolerant, only one was moderately tolerant and none were sensitive to this adverse condition.

Lactococcus lactis (LLSG) and *Levilactobacillus brevis* (LB) were selected to produce fermented milk, as they showed the best *in vitro* results (Table 1). In addition, *Lactococcus lactis* is the main LAB species used as a starter culture for several foods, being commonly used by industries for fermented dairy products manufacture, such as cheeses (Pereira et al., 2020).

Table 1 - Summary of the results obtained by *Lactococcus lactis* (LLDG) and *Levilactobacillus brevis* (LB) after *in vitro* tests to evaluate the probiotic potential

TESTS				
LAB	Antibiogram	Antagonism	Acid resistance	Bile salts
LLSG	Sensitivity to 10 antimicrobials	Inhibition against pathogens without inhibiting desirable LAB	Moderately tolerant	Tolerant
		Inhibition against pathogens without inhibiting desirable LAB	Moderately tolerant	Tolerant
LB	Sensitivity to 10 antimicrobials	Inhibition against pathogens without inhibiting desirable LAB	Moderately tolerant	Tolerant

After the fermentation test, only milk inoculated with LLSG and association of LLSG and LB produced a firm clot. As a result, only LLSG was selected for the elaboration of fermented milk. The inoculum used to prepare the fermented milk had 2×10^8 CFU/g of that LAB. LAB counts in fermented milks remained high and in accordance with current legislation (BRASIL, 2007) throughout the storage period.

LLSG fermented milk presented values of titratable acidity, moisture and lipids contents in accordance with the Brazilian legislation. Although, the protein content was slightly below the minimum (BRASIL, 2007).

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

From the results presented, it is suggested that LLSG is suitable to be used as a potential probiotic to obtain fermented milk. However, it is necessary to carry out *in vivo* screening tests for its future use as a probiotic and elaboration of functional foods. Also, the present study showed the presence of beneficial bacteria in the microbiota of artisanal cheeses produced in the Serra Geral region.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- Andrade, C.R.G. et al. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. Isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra–MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, 2014.
- Charteris, W.P, et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, 1998.
- SILVA, J.G, et al. *In vitro* assessment of the probiotic potential of lactobacilli isolated from Minas artisanal cheese produced in the Araxá region, Minas Gerais state, Brazil.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 71, n. 2, 2019.

INCIDÊNCIA E NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINA M1 EM QUEIJOS PRODUZIDOS EM PERNAMBUCO, 2022

Isabela Maria de Moura Silva¹, Adriano Gomes da Cruz², Luzianna Macedo Fonseca³, Sher Ali⁴, Lucas Gabriel Dionisio Freire⁴, Carlos Augusto Fernandes de Oliveira⁴, Carlos Humberto Corassin⁴, Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira¹

¹Departamento de Ciências do Consumo, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Pernambuco, Brasil. ²Departamento de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brasil. ³Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil. ⁴Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia dos alimentos (FZEA), Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

Produzir alimentos com a garantia da isenção de substâncias tóxicas, constitui um grande desafio para a indústria, tendo em vista que envolve esforços em toda cadeia produtiva. Diante da grande variedade de produtos lácteos, o queijo se destaca como um dos mais propensos ao acúmulo de aflatoxinas devido à elevada afinidade destes metabólitos tóxicos pelas micelas de caseína. A aplicação de calor durante o processamento do leite não é capaz de eliminar esta micotoxina devido sua elevada estabilidade (Campagnollo et al., 2016).

A incidência de aflatoxinas M1 em produtos lácteos representa um risco potencial à saúde, especialmente nas populações mais vulneráveis como bebês, crianças e idosos. Adicionalmente, essas substâncias podem provocar danos hepáticos, diminuição da imunidade e, em último caso, a morte dos indivíduos. (Claeys et al., 2020).

O queijo é um dos produtos lácteos mais populares do mundo, afinal é consumido por pessoas de todas as idades devido suas excelentes propriedades nutricionais e características sensoriais (Khaneghah et al., 2021). Dessa maneira, esta pesquisa teve o objetivo de investigar a incidência e os níveis de contaminação de aflatoxinas M1 em queijos coalho e mussarela produzidos no Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta investigação foi conduzida entre os meses de março a maio de 2022 através da análise de 28 amostras de queijo coletadas em propriedades rurais (queijo artesanal) e laticínios (queijo industrializado) situados no Agreste e Sertão do Estado de Pernambuco. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos da Universidade de São Paulo Os procedimentos analíticos adotados para detecção e quantificação de AFM1 em queijos seguiram a metodologia proposta por Jager et al. (2013), utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando o cromatógrafo Shimadzu 10VP (Kyoto, Japão) acoplado com detector de fluorescência 10 AXL (excitação a 360 nm e emissão acima de 440 nm). Os resultados foram analisados através de estatística descritiva, comparação das médias pela ANOVA e aplicação do teste de Tukey 5% com utilização do software XLSTAT 2022.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação sobre a incidência de aflatoxinas M1 em queijos produzidos Pernambuco revelou que todas amostras (n=28) estavam contaminadas. Esses resultados reforçam a importância de monitorar continuamente essas micotoxinas nos produtos lácteos tendo em vista a sua importância econômica e para saúde pública.

Os teores de AFM1 nos queijos coalho e mussarela (artesanal e industrializado) produzidos entre os meses de março e maio de 2022 situaram-se entre 0.026 μ g/Kg e 0.132 μ g/Kg. Estas concentrações constataram um baixo nível de contaminação, e estes resultados podem ser reflexo do período de coleta das amostras situado na estação do outono. Segundo Polat & Gul (2014) a colheita e a secagem adequada na estação do outono de culturas vegetais utilizadas como forragem para vacas em lactação apresentam menor risco de contaminação por micotoxinas, consequentemente o leite e queijo produzido apresentam menores concentrações de AFM1.

A comparação entre os níveis de contaminação dos diferentes tipos de queijo demonstrou que o queijo mussarela artesanal possui uma concentração de AFM1 significativamente maior que o queijo coalho industrializado (0.065 e 0.039 μ g/Kg, respectivamente). Essas diferenças podem estar associadas a tecnologia de fabricação e as características físico-químicas desses produtos.

A análise do perfil de distribuição das amostras por nível de contaminação revelou uma predominância na faixa de 0.30-0.50 μ g/Kg (n=21). Adicionalmente, uma amostra de queijo mussarela industrializado apresentou nível de contaminação maior que 0.100 μ g/Kg, entretanto, nenhuma ultrapassou os limites permitidos pela legislação brasileira que estabelece uma concentração máxima de 2.5 μ g/Kg (BRASIL, 2011). O limite permitido no Brasil é maior que o estabelecido em outros países pelo mundo, como por exemplo, no Iran (0.25 μ g/Kg), Itália (0.45 μ g/Kg), Áustria e Suíça (0.25 μ g/Kg) (Oliveira et al., 2011).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elevada taxa de incidência de AFM1 nas amostras de queijo coalho e mussarela produzidas em Pernambuco em 2022 reforçou a necessidade do contínuo monitoramento desta micotoxina de grande relevância para a saúde pública. Entretanto, todas amostras pesquisadas atenderam os limites estabelecidos pela legislação brasileira. Finalmente, diferenças significativas nas médias de concentração de AFM1 nos queijos coalho e mussarela foram constatadas, sugerindo a necessidade de investigação do efeito da tecnologia de processamento

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2011.
- Campagnollo, F. B. et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control*, v. 68, p. 310-329, 2016.
- Claeys, L. et al. Mycotoxin exposure and human cancer risk: a systematic review of epidemiological studies. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, v. 19, p. 1449-1464, 2020.

INCLUSÃO DE *Thymus vulgaris* L. NA DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO E SEU EFEITO NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE CRU

Lívia Castelani¹, Karina Pfrimer², Rodrigo Giglioti¹, Eric Haydt Castello Branco van Cleef³, Márcia Saladini Vieira Salles¹, Adriane Elisabete Costa Antunes⁴, Luiz Carlos Roma Júnior¹

¹Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, São Paulo, Brasil. ²Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. ³Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Iturama, Minas Gerais, Brasil. ⁴Universidade de Campinas, Limeira, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

É crescente o interesse da cadeia produtiva de laticínios em melhorar a qualidade dos seus produtos, visando atender às exigências regulatórias e à demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis e sustentáveis (LOPES et al., 2020). A qualidade e o tempo de prateleira dos derivados lácteos estão diretamente relacionados com as condições de obtenção do leite cru e com a saúde do úbere. A qualidade microbiológica da matéria-prima é determinada pela contagem padrão em placas (CPP) e é influenciada pelas condições higiênico-sanitárias, temperatura de armazenamento e de transporte, nutrição e bem-estar animal, presença de mastite no rebanho, entre outras (Santos; Fonseca, 2019).

A mastite causa redução na produção, alterações na composição centesimal do leite e aumento na CPP, diminuindo a qualidade, o rendimento industrial e o tempo de prateleira dos derivados lácteos (Dias; Antes, 2014). Antibióticos intramamários são empregados para o controle da mastite. Todavia, problemas relacionados ao aumento da resistência bacteriana e a presença de resíduos, somados ao aumento da produção orgânica, pressionam a cadeia produtiva a buscar alternativas para o controle dos microrganismos (Lopes et al., 2020).

Óleos essenciais podem representar uma alternativa promissora, com destaque para o óleo de tomilho (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae). Esse óleo é bastante utilizado na culinária e na medicina devido aos seus efeitos antioxidantes, antimicrobianos, antihelmínticos, entre outros (Abdelli et al., 2017).

Sendo assim, objetivou-se avaliar a inclusão do óleo essencial de tomilho (OET) na dieta de vacas em lactação e seu efeito na qualidade microbiológica do leite cru.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 24 vacas da raça Jersey pertencentes à fazenda experimental APTA Centro Leste, em Ribeirão Preto/SP, com peso vivo médio de $400 \pm 42,9$ kg, com média de 50 ± 10 dias em lactação e produção média diária de leite de $22,05 \pm 4,34$ kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos considerando a homogeneidade de estágio de lactação, raça, peso: Tratamento - 8 mL de OET por vaca/dia; Controle - 8 mL de óleo de soja por vaca/dia. Os óleos foram colocados em cápsulas gelatinosas que foram introduzidas no esôfago dos animais com auxílio de um aplicador de plástico e ponteira de borracha, evitando injúrias no trato digestivo.

As vacas foram ordenhadas três vezes ao dia em ordenhadeira mecânica. As boas práticas de ordenha foram realizadas em todas as ordenhas (teste de Tamis, pré-dipping e pós-dipping).

O experimento teve duração de 28 dias (sete dias de adaptação e 21 dias de tratamento e colheita dos dados experimentais). No 28º dia foram colhidos dois litros de leite de cada animal em garrafas plásticas estéreis. No laboratório, o leite foi homogeneizado, fracionado em frascos estéreis de 50 mL e armazenado sob refrigeração a 4 °C. Durante dez dias de armazenamento, dois frascos de leite cada animal foram encaminhados à Clínica do Leite, para determinação da CPP e composição centesimal.

Os dados de CPP foram transformados em log de UFC (n+1) para aproximação da distribuição normal dos dados e analisados por meio de modelos mistos. As médias foram comparadas pelo teste Tukey, usando níveis de significância de 10% e analisados pelo pacote estatístico SAS. Os resultados da composição do leite foram analisados pelo software SigmaPlot® 11.0. A comparação dos grupos foi realizada pelo teste Tstudent considerando nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de CPP no grupo tratado com OET foram inferiores aos do controle após 168 horas de refrigeração, sendo que após 216 horas a CPP tendeu a ser menor (Tabela 1).

Tabela 1 - Contagem padrão em placa em amostras de leite de vacas com e sem suplementação com óleo de tomilho ao longo de 216 horas após amostragem.

Tempo (h)	Controle			Tratamento			P
	Log UFC/mL	UFC/mL	EPM	Log UFC/mL	UFC/mL	EPM	
0	3,9478	11500	0,2709	4,0626	16000	0,2709	0,6723
24	3,7957	8083	0,2709	3,8255	8917	0,2709	0,9126
48	4,2386	25917	0,2709	3,9960	10583	0,2709	0,3715
72	3,9152	9833	0,2709	3,8950	9417	0,2709	0,9407
96	3,7119	6667	0,2709	3,7666	7417	0,2709	0,8403
120	4,5737	66250	0,2709	4,3460	48083	0,2709	0,4015
144	4,2595	55083	0,2709	4,0140	15917	0,2709	0,3659
168	4,6752	286333	0,2709	4,1105	53333	0,2709	0,0383
192	5,2493	1841333	0,2709	4,6043	317083	0,2709	0,0182
216	5,7050	3474750	0,2709	5,2137	1389583	0,2709	0,0712

EPM: Erro Padrão da Média. Valor significativo: $P < 0,10$, no teste de Tukey.

Com relação a composição do leite, não foram observadas variações ao longo das 216 horas, e não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Observaram-se valores médios de gordura de 1,73%, proteína bruta 2,96%, extrato seco desengordurado 8,69% e lactose 4,75%.

A prevenção e o controle da mastite bovina contribuem para a redução da carga microbiana no leite cru e de doenças transmitidas por alimentos, com consequente aumento da qualidade dos derivados lácteos (Lopes et al., 2020). O uso de óleos essenciais na dieta de vacas em lactação pode contribuir para a melhoria da saúde do úbere. O timol, princípio ativo do tomilho, possui atividade anti-inflamatória e pode aumentar a ação de enzimas antioxidantes que atuam neutralizando as espécies reativas de oxigênio, que são produzidas pelos neutrófilos em um processo inflamatório. Essas espécies reativas de oxigênio podem reagir com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, podendo ocasionar mutações e morte celular (Possenti et al., 2018).

Mais estudos devem ser conduzidos com o intuito de elucidar o efeito da suplementação dietética com OET na qualidade do leite, como estudos sensoriais e de toxicidade e o pH na bioatividade do óleo essencial.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição de 8 mL de OET na dieta de vacas em lactação pode representar uma alternativa promissora para o controle de microrganismos deteriorantes no leite cru, com consequente redução de perdas econômicas na cadeia produtiva, além de suprir a necessidade dos consumidores por alimentos mais seguros e sustentáveis.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP,
Processo nº 2014/01212-4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelli, A. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of algerian *Thymus vulgaris* essential oil. *Natural Product Communications*, v.12, p.611-614, 2017.
- Dias, J.A.; Antes, F.G. Qualidade físico-química, higiênico-sanitária e composicional do leite cru: indicadores e aplicações práticas da IN 62, 2014. LOPES, T.S. et al. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*, v.131, p.186–193, 2020.
- Possenti, C.G.R. et al. Evaluation of oxidative stress in plasma of dairy cows with mastitis. *Ciência Animal Brasileira*, n.19, p.1–9, 2018.
- Santos, M.V.; Fonseca, L.F.L. Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções, 2019.

PASTEURIZATION INFLUENCE ON THE CAPACITY OF EXPRESSION OF DIARRHEA TOXIN PRODUCTION GENES BY *Bacillus cereus* s.s. IN EXPERIMENTALLY CONTAMINATED MILK

Alenia N. Vasconcellos¹, Joyce Aparecida Santos Lima², Danielle C. M. Fonseca¹, Ana Maria C. Vidal¹

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo (FZEA/USP), Pirassununga/SP – Brasil. ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Júlio Mesquita Filho (FMVZ/UNESP), Jaboticabal/SP – Brasil

INTRODUCTION

Bacillus cereus s.s. is a bacterium that produces lipolytic and proteolytic enzymes and not only can cause technological problems in the milk production chain, but is also a threat to public health as it produces that can cause diarrheal syndrome. This bacterium has the characteristic of being resistant to different types of heat treatments used in the processing of milk and dairy products, in addition to synthesizing biofilm and adhering to equipment and utensils. Although the genes related to the toxins produced by the microorganism are already described in the literature, there are no studies that evaluate how the expression of such genes can be affected by the pasteurization of milk contaminated by *Bacillus cereus* s.s. Therefore, the aim of this project was to determine whether the gene expression related to the production of diarrheal toxins can be influenced by the pasteurization of experimentally contaminated milk.

MATERIALS AND METHODS

The refrigerated raw milk was heat treated by tindalization. Subsequently, the experimental contamination of the milk was carried out with an inoculum containing 10⁸ CFU/mL of an isolate with high toxigenic potential (SAMN07414939) due to the presence of *cytK*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblA*, *hblC* and *hblD* genes. From this stage, 30 liters of experimentally contaminated milk was pasteurized by rapid pasteurization, packaged and kept under refrigeration (7°C) for 10 days, and samples were collected at the following times: after tindalization (Tindalized – T), before pasteurization (0h – Tindalized and Contaminated Milk), immediately after pasteurization (6h – Contaminated and Pasteurized Milk with 6h of incubation), 5 days in refrigeration (120h – Contaminated and Pasteurized Milk with 5 days of refrigeration and 6h of incubation) and 10 days in refrigeration (240h – Contaminated and Pasteurized Milk with 6h of incubation). Three replications (R1, R2 and R3) were performed using this experimental model. The samples “6, 120 and 240 hours” were incubated for 6 hours at 30°C in order to give conditions for the surviving spores to germinate and become new vegetative cells. All samples were used for isolation on selective agar and samples at 0, 6, 120 and 240 hours for RNA extraction and qPCR to evaluate the expression of target genes selected by whole genome sequencing of the isolate used in this study (BioSample SAMN07414939). To prepare the primers, the Primer-BLAST online tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Statistics were used according to the method of Pfaffl (2001) and for analysis the control (0h) was defined with contaminated tindalized milk without pasteurization. Subsequently, sample comparisons were made by crossing the times with the control. The genetic activity of diarrheal toxins (*hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK*) produced by *B. cereus* s.s. and statistics were prepared by the GraphPad Prism 6 program using 1-way ANOVA analysis with multiple comparisons.

The amplification plots of different cDNA concentrations using the primers developed in the present study to quantify the expression of the 16S, cytK, nheA, nheB, nheC, hblA, hblC and hblD genes ensured the efficiency of the primers.

Regarding the gene activity of the toxins, for hblA the expression was significant for the sample 0h vs. 120h, as it presented a value above |2| by the analysis of Mean Diff. For the hblC toxin, the expression was not significant in the 6h vs. 240h. For the hblD toxin, the expression was significant in samples 0h vs. 6 am, 0 pm vs. 120h and 0h vs. 240h. For nheA gene activity, it was possible to notice that the expression was not significant in the 6h vs. 8pm and 6pm vs. 240h, since the Mean Diff values are below |2|. For nheB the expression was significant in the sample 0h vs. 120h and for nheC the expression was significant in samples 0h vs. 6 am, 0 pm vs. 120h. For the cytK toxin the expression was significant in samples 0h vs. 6 am, 0 pm vs. 120h, 6h vs. 240h and 120h vs. 240h. Therefore, statistically analyzing the values presented in module by Mean Diff analysis and comparing the results using GraphPad Prism 6 with multiple Tukey comparisons between each treatment for the different toxins, it was observed that in the comparison between the storage time in relation to the control there was a reduction of expression in most genes, demonstrating the importance of pasteurization to the detriment of raw milk consumption, which can carry several microorganisms, as noted by Ramos et al. (2021).

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

It is possible to realize and prove that there is an influence of pasteurization on the genes of diarrheal toxins of *Bacillus cereus* s.s., there was even a reduction in the expression of some genes in comparison of the sample of contaminated milk on relation to the samples of the pasteurized contaminated milk. Therefore, there is a great importance in not consuming raw milk, but heat-treated milk and thereby avoid a foodborne disease, as referred in this present study, a diarrhea caused by *Bacillus cereus* s.s.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 29:2002-2007, 2001.
Ramos, G.L.P.A et al. Quantitative microbiological risk assessment in dairy products: Concepts and applications. **Trends in Food Science & Technology.** v.111, p610-616, 2021.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by FAPESP grant number 2016/23141-7.

INFLUÊNCIA DOS RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO LEITE NA PRODUÇÃO DE IOGURTE

Anselmo Salviano Fonseca¹, Ana Carolina Alves Vieira², Leonardo Borges Acurcio¹, João Paulo Andrade de Araújo², Letícia Matos Mattioli²

¹Centro Universitário de Formiga - UNIFOR-MG – Formiga, MG, ²Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária - Belo Horizonte, MG

INTRODUÇÃO

Iogurte é um leite fermentado produzido com cultivos protosimbóticos de *Streptococcus salivarius thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, as quais, podem ser acompanhados, de forma complementar, por outras bactérias ácido lácticas que, por sua atividade, contribuam para a determinação das características do produto final (Brasil, 2007). São vários os fatores que podem impactar na qualidade desse alimento, alterando sua composição e interferindo no seu processamento (Huijps et al., 2002).

Um dos pontos importantes no padrão de qualidade do leite, refere-se à presença de resíduos antimicrobianos. Os animais são medicados com diversos fármacos, com características e ações distintas, sendo imprescindível que seja respeitado o período de carência determinado na bula de cada medicamento, para que o leite não seja contaminado com resíduos (Novaes et al., 2017).

Além dos diversos efeitos à saúde humana, a presença de resíduos de antibióticos no leite destinado à produção de laticínios, podem causar efeitos tecnológicos negativos. Os antimicrobianos podem atuar como substâncias inibidoras que retardam ou modificam o desenvolvimento de processos bioquímicos durante a produção e maturação dos produtos lácteos e alterar suas características finais (Quintanilla et al., 2021).

Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar o possível impacto dos resíduos de antimicrobianos usados prioritariamente no tratamento de mastite clínica e subclínica, no processo de fermentação do leite pasteurizado, após o período de carência determinado pelo fabricante, a partir dos cultivos *Streptococcus salivarius thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, na produção de iogurte.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras dos leites analisados, foram preparadas a partir de leite pasteurizado, adquiridos aleatoriamente, em embalagem completa e dentro do prazo de validade, de uma única marca (Machadinho) comercializado na cidade de Formiga-MG. Em cada amostra de 1L de leite, foi adicionado 0,001kg de antimicrobiano (Amoxicilina + Clavulanato e Gentamicina), respeitando o período de carência determinado na bula de cada medicamento. Foram analisadas um total de 18 amostras, divididas em três grupos: um grupo com seis amostras contendo antimicrobiano de associação de Amoxicilina + Clavulanato (Mastite Clínica VL-8g, JA Saúde Animal), um grupo com seis amostras contendo Sulfato de Gentamicina (GentamastiL-10g, Agener União Saúde Animal) e um grupo com seis amostras controle, sem adição de medicamento.

Um litro de cada amostra de leite (Amoxicilina + Clavulanato, Gentamicina e Controle), foi aquecido em um Becker de 1000ml a 45°C, adicionados 3% de fermento em cada amostra a partir de produto fermentado comercial (Iogurte Natural Integral, Itambé-170g), e aquecido por quatro horas. A cada 60 minutos, foi realizado a análise de acidez titulável nas três amostras dos leites em fermentação.

A determinação da acidez em graus Dornic (°D) foi analisada de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008). O efeito inibitório dos antibióticos, foi determinado pela diferença do tempo para atingir a acidez titulável, de 0,6 a 1,5, segundo preconizado pelo Instrução Normativa Nº 46 (Brasil, 2007). Para detecção de

resíduos do antimicrobiano e controle do experimento foi utilizado o teste SNAPduo*ST Plus™ (Idexx Laboratories) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a realização de todas as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). O teste realizado foi o teste One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste SNAPduo*ST Plus™ (β -lactâmicos), usado para analisar amostras do leite com adição da Amoxicilina + Clavulanato no momento do experimento foi positivo, mostrando a presença de resíduo do antibiótico no limite do período de carência do medicamento.

Os resultados obtidos nas amostras analisadas com adição do fármaco a base de Amoxicilina + Clavulanato mostraram que o processo de produção a partir do momento final do período de carência determinado na bula do medicamento inibiram a atividade dos microrganismos fermentadores. Como esperado, a maioria das amostras a partir de 120 minutos de fermentação não atingiram resultados da acidez titulável mínima necessária para ser definido iogurte, mas as amostras do grupo controle, de forma superior ($p < 0,0001$) as demais amostras, já apresentavam uma acidificação mais considerável. Outro fato observado, foi que a inibição do processo fermentativo causado pela Amoxicilina + Clavulanato foi superior a Gentamicina ($p < 0,0001$).

As amostras analisadas do grupo controle apresentaram um perfil de acidez esperado para um leite com perfil físico-químico dentro das conformidades, que oferece ambiente propício para atividade das bactérias ácidos lácticas. No período entre 0 a 120 minutos a acidez já se encontrava elevada, podendo ser observado que ocorria fermentação de maneira eficaz. O processo fermentativo a partir da lactose pelas bactérias ácido lácticas, se inicia quando parte da lactose é convertida em ácido láctico, o aumento gradual da sua concentração, começa por desestabilização dos complexos da caseína e proteínas do soro desnaturado por solubilização do fosfato de cálcio e dos citratos, diminuindo o pH, até o ponto em que a caseína torna-se insolúvel, as proteínas coagulam aumentando a viscosidade do leite, e o iogurte começa a adquirir sua característica (Barth, 2014).

Apesar do antibiótico ter sido adicionado ao leite previamente pasteurizado nesse estudo, Roca et al. (2011), confirmaram que a maioria dos tratamentos térmicos utilizados nos laticínios para beneficiamento do leite, a fim de eliminar microrganismos patogênicos e deteriorantes, não eliminam resíduos de antimicrobianos.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inibição das culturas fermentadoras *Streptococcus salivarius thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, na produção de iogurte, refletiram o efeito causado pelos resíduos dos antimicrobianos Amoxicilina + Clavulanato e Gentamicina, usados no tratamento das enfermidades dos rebanhos leiteiros, especialmente no tratamento da mastite, no limite da carência determinado na bula pelo fabricante, o que pode ser explicado por fatores como, a dose e protocolo de tratamento utilizado, a via de administração, o tipo de antibiótico, a formulação do produto e o manejo no tratamento.

REFERÊNCIAS

- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Instrução normativa de nº 46 de 23 de outubro de 2007. Diário Oficial da União, Brasília-DF.
- Novaes, S. F. D. et al. Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. **Ciência Rural**, v. 8, n. 47, 2017.
- Quintanilla, P. et al. Enrofloxacin treatment on dairy goats: Presence of antibiotic in milk and impact of residue on technological process and characteristics of mature cheese. **Food Control**, n. 123, p. 107762, 2021.
- IAL - Instituto Adolf Lutz. Métodos Físico-Químicos Para Análises de Alimentos.

OCORRÊNCIA DE *Listeria monocytogenes* EM QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO EM SERGIPE

Aline Ferreira Barbosa¹, Átila Ferro Goes Junior¹, Débora Andrade Dias¹, Débora Andrade Dias¹, Gabriela Vasconcelos Lima Santos¹, Hawlan Natan Silva Santos¹, Milena Cristina Gomes do Nascimento¹, Gabriel Isaias Lee Tunon¹

¹Universidade Federal de Sergipe

INTRODUÇÃO

A produção de queijo de coalho possui grande difusão e tradição no Nordeste brasileiro. Ela é um importante indicador social e econômico, pois a atividade está concentrada principalmente em pequenas e médias queijarias e movimenta em torno de 10 milhões de reais na região Nordeste (Santana et al., 2008). No entanto, os padrões higiênico-sanitários no processo de fabricação muitas vezes não são aplicados, levando consequentemente à contaminação do alimento e apresentando-se como risco a saúde pública.

De acordo com a Instrução Normativa nº 30 (BRASIL, 2001) o queijo coalho deve ser mantido durante sua comercialização e conservação a temperatura inferior a 12°C. Quando não são aplicadas boas práticas higiênico-sanitárias, o produto apresenta elevadas taxas de microrganismos; tais taxas aumentam quando ele não é mantido sob refrigeração (Santana et al., 2008).

Listeria monocytogenes, causadora da listeriose, tem a contaminação cruzada como principal forma de contaminação. Apesar de poder causar mastites, essa bactéria tem menos chances de estar presente no leite, por conta da pasteurização. A produção de queijo coalho muitas vezes se dá através de leite cru, que não recebeu nenhum tipo de tratamento térmico e não passou por adequada manipulação higiênico-sanitária, facilitando a contaminação cruzada com o ambiente e/ou área de produção.

Com base no exposto, o objetivo da presente pesquisa foi isolar, identificar e caracterizar *L. monocytogenes* de queijo coalho comercializado no estado de Sergipe. A pesquisa está registrada no comitê de ética sob o número 06/2022/CEPAP.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 16 amostras de queijo coalho comercializadas em Sergipe, acondicionadas em embalagens estéreis individuais para transporte e mantidas sob temperatura de refrigeração até o momento da análise. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Sergipe, Campus de São Cristóvão.

Para isolamento de *Listeria*, foram pesados 25 g da amostra, os quais foram homogeneizados com 225 ml de caldo de enriquecimento para *Listeria* tamponado e incubado a 30°C por 24 h. Após a incubação, foi retirada uma alíquota de 0,1 ml, que foi inoculada em tubos de 10 ml de caldo Fraser, sendo estes então incubados a 37°C por 24 h. Passado esse período, o caldo Fraser foi estriado em placas de ágar Oxford e ágar Palcam e as placas foram incubadas por 24-48 h a 37°C. Colônias suspeitas, com diâmetro de 2 a 3 mm e halos acastanhados ou negros, encontradas nas placas incubadas, foram selecionadas e repicadas em placas de ágar TSYEA (ágar tripton extraído de levedura, Difco) para obtenção de colônias isoladas e incubadas a 35°C por 24 h. Os isolados suspeitos foram submetidos a identificação morfo-tintorial e bioquímica pela coloração de Gram e através dos testes de catalase, oxidase, motilidade em ágar SIM, do teste de hemólise sinérgica (CAMP) com *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi* e da fermentação de manitol, ramnose, xilose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nenhuma das 16 amostras de queijo coalho analisadas foram isoladas colônias com características de *Listeria spp.* (Tabela 1).

Tabela 1 - Origem das amostras de queijo coalho e resultado do crescimento para *Listeria spp.*

Amostra	Origem			Crescimento de <i>Listeria spp.</i>
	Município	Feira livre	Padaria	
1	Aracaju	X		Não
2	Aracaju	X		Não
3	Aracaju		X	Não
4	Aracaju		X	Não
5	Aracaju		X	Não
6	Muribeca	X		Não
7	Aracaju			Não
8	Aracaju			Não
9	Feira Nova	X		Não
10	N. Sra. Das Dores	X		Não
11	Aracaju		X	Não
12	Aracaju		X	Não
13	Aracaju		X	Não
14	Aracaju		X	Não
15	Aracaju		X	Não
16	Aracaju		X	Não

A ausência da *Listeria* também foi relatada por Rossi et al. (2010) em 30 amostras de queijo minas frescal comercializadas em Santa Catarina. O resultado negativo na pesquisa da *Listeria* não significa que a bactéria esteja ausente no lote analisado.

Listeria apresenta menor capacidade de competição com coliformes e *Staphylococcus sp* encontrados na maioria das amostras (Brant et al., 2007). Isso foi confirmado no presente trabalho, que observou, em 75% das amostras, o crescimento de colônias com características diferentes da *Listeria* nas placas de Oxford e Palcam, sendo identificadas como membros da família *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus spp.*

Ressaltamos a importância que esse microrganismo tem como indicador de contaminação ambiental e, conseqüentemente, a relevância do estudo para a saúde pública. Os pequenos produtores de leite precisam conhecer as boas práticas de fabricação e os consumidores precisam ser alertados sobre higiene alimentar e doenças transmitidas por alimentos. Existem poucos estudos sobre a ocorrência de *Listeria* em queijo de coalho em Aracaju e é importante continuar esse tipo de pesquisa em alimentos de origem animal como apoio aos órgãos governamentais de fiscalização de alimentos.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Podemos concluir que apesar das más condições higiênico-sanitárias em que o queijo coalho é comercializado nas feiras livres em Sergipe, não observamos crescimento característico de *Listeria*. Portanto, é necessário realizar novas pesquisas com um número maior de amostras e investigar pontos de contaminação na produção e comercialização desses alimentos.

Devido ao crescimento de outras colônias durante a pesquisa, vale reforçar a necessidade de se investigar outros agentes contaminantes que possam estar presentes no queijo coalho. Além disso, é importante incentivar novas pesquisas com alimentos prontos para o consumo que são produzidos sem seguir as boas práticas de fabricação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Brant, L.; Fonseca, L.; Silva, M. Avaliação da Qualidade Microbiológica do Queijo-de-Minas Artesanal do Serro-MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, V.59, N.6, P.1570-1574, 2007.

BRASIL. MAPA. Instrução Normativa Nº30, 26 JUN. 2001. Diário Oficial da União, Brasília, 16 JUN. 2001.

Rossi, E. Et Al. Contagem de Coliformes Fecais a 45°C e *Staphylococcus Aureus* e Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria Monocytogenes* em Queijos Coloniais Comercializados em Feiras Livres de São Miguel do Oeste-SC. **Revista Higiene Alimentar**, V.22, N.166/167, P.112-116, 2008.

Santana, R.; Santos, D. Qualidade Microbiológica de Queijo-Coalho Comercializado em Aracaju-SE. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, V.60, N.6, P.1517-1522, 2008.

PAPEL DAS MICOTOXINAS NO LEITE E SUAS TOXICIDADES

Natylane Eufransino Freitas^{1,2}, Lucyana Vieira Costa^{1,2}, Clarice Gebara^{1,2}, Ana Flávia Machado Botelho¹, Cíntia Minafra^{1,2}

¹Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. ² Centro de Pesquisa em Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

INTRODUÇÃO

Os efeitos tóxicos têm sido observados em plantas, humanos e em animais; variam de acordo com o aparecimento dos sintomas no hospedeiro, tipo de toxina, quantidade ingerida pelo animal, duração da exposição do tóxico no organismo, idade do animal, genética, sexo e suscetibilidade do animal (Prestes et al., 2019).

Alguns relatos demonstraram que uma única espécie de fungo, pode ser capaz de contaminar diferentes substratos no alimento, produzindo uma ou mais toxinas de modo que, após a ingestão, desencadeiam rápida biotransformação no fígado e, em seguida, acometem diversos órgãos-alvo. No caso da glândula mamária, haverá excreção pelo leite (Prestes et al., 2019; Ribeiro Júnior et al., 2020).

O presente estudo tem como objetivo abordar a ocorrência das micotoxinas em alimentos e os passíveis efeitos tóxicos em humanos e animais, identificados em artigos publicados em diversos países e divulgados em bases de dados reconhecidas pela relevância.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta revisão fundamentou-se em levantamento bibliográfico em bases de dados como *Scopus*, *PubMed*, *NCBI*, *Google Scholar* e *Web of Science*, entre os períodos de maio de 2022 a julho do ano de 2022, cujos descritores concentraram-se em “micotoxins, micotoxins in milk, contamination of mycotoxins in products of animal origin, occurrence mycotoxins in milk, contamination of milk by aflatoxins, fumonisins in products of animal origin, trichothecenes e zearalenone in milk”. A abordagem para cadeia produtiva leiteira associou-se à representatividade sobre o risco à saúde animal e humana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aflatoxinas foram as micotoxinas mais presentes. Aflatoxinas B1 foi reportada como a mais tóxica para os mamíferos sendo classificada como carcinogênica para homens.

As aflatoxinas são metabólitos oriundos da produção de cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, estando comumente encontradas no leite em decorrência de sua presença em grãos destinados à alimentação de animais leiteiros. Devido ao alto potencial carcinogênico, corresponde ao grupo de toxinas mais estudadas no mundo, ainda, relaciona-se à casos de hepatotoxicidade significativos, podendo culminar em casos de óbito (Prestes et al., 2019; Savi & Zenaide 2020).

Toxinas como zearalenona (ZEA), fumonisinas (FBs) e ocratoxina (OTA) representaram significativa ocorrência, conforme os estudos analisados. A toxicidade aparente em seres humanos e animais foi bastante diversificada, devido sua especificidade nas células alvo. Destaque deve ser dado à ocratoxina em decorrência de sua facilidade para a transferência no leite; isto por conta da difusão passiva através do plasma e de sua relação com as infecções agudas em humanos (Alshannaq et al., 2017).

No Brasil, a regulamentação das micotoxinas nos alimentos está em vigor desde 2012, entretanto, sua especificidade restringe-se à avaliação das aflatoxinas,

estabelecendo o limite de 0,5 µg/kg. Neste caso, a ampliação da legislação para as demais micotoxinas torna-se bastante necessária.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Micotoxina no leite é ameaça para saúde pública e o risco químico deve ser avaliado. Os processos de processamento e beneficiamento não inativam as toxinas derivadas de fungos. A determinação de monitoramento é desejável e viável quanto ao diagnóstico em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bennett, J.W. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. **Journal of Mycopathologia**; v.100 (1), p. 3-5, 1987.

Prestes, I.D., et al. Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. **Scientia Agropecuaria**, vol.10, n.4, 2019.

Savi, D.S., Zenaide, F.S. Mycotoxins: risks to human health due to daily ingestion of contaminated food and its occurrence in clinical samples. **Research, Society and Development**, v. 9, n.4, 2020.

Ribeiro, J.C., et al. Profile of the Brazilian consumer and consumer habits of milk and dairy products. **Archives of Veterinary Science**, v.25, n.2, p.21-30, 2020.

AGRADECIMENTOS

À FAPEG-Goiás pela concessão de bolsa da primeira autora e aprovação de financiamento do projeto de pesquisa a ser desenvolvido. Ao Centro de Pesquisa em Alimentos pelo financiamento dos ensaios relacionados ao tema do estudo que será iniciado em 2022.

PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Listeria monocytogenes* ISOLADOS DE TANQUES DE EXPANSÃO DE LEITE EM SANTA CATARINA

Ana Karolina Panneitz¹, Leila Schuster¹, Carolina Reck², Vagner Miranda Portes³, Álvaro Menin¹

¹Departamento de Biociências e Saúde Única, Universidade Federal de Santa Catarina.

²VERTA Laboratórios, Instituto de Pesquisa e Diagnóstico Veterinário, ³ Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar – CEPAF/EPAGRI

INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) é uma bactéria Gram-positiva, zoonótica, que causa a listeriose. Em animais, esta doença cursa com quadros de encefalite, meningite, septicemia e aborto. Em humanos ocasiona meningite, encefalite e gastroenterites, sendo que a taxa de mortalidade pode chegar a 75% em indivíduos imunocomprometidos. Frequentemente os casos ocorrem em surtos e estão associados a contaminação de produtos de origem animal, em especial os produtos lácteos.

No caso do tratamento da listeriose, considera-se que os isolados de *L. monocytogenes* são sensíveis aos antimicrobianos utilizados nos protocolos terapêuticos de eleição. Entretanto, nos últimos anos observou-se alterações no padrão de resistência deste patógeno, aumento na taxa de insucessos no tratamento e consequentemente um desafio para o controle da infecção.

Sendo assim, o objetivo do nosso trabalho foi determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de leite de tanque de expansão, no estado de Santa Catarina, Brasil.

MATERIAIS E METÓDOS

Para realização deste trabalho foram coletadas 467 as amostras de leite de tanques de expansão, de diferentes propriedades do estado de Santa Catarina. As amostras foram processadas conforme método AOAC/IDF 993.12 (Association of Analytical Chemists/IDF). Resumidamente, 25mL de leite foram adicionados a 225mL de caldo de enriquecimento de *Listeria* (LEB, Difco) e incubados a 30°C por 48 horas. Em seguida foram plaqueados em ágar Oxford (Difco) e ágar Palcam (Difco) e incubadas a 35°C e examinadas após 24 e 48 horas. Colônias características foram submetidas a confirmação bioquímica conforme Gasanov; Hughes; Hansbro (2005). A confirmação dos isolados de *L. monocytogenes* foi realizado através da detecção por PCR em tempo real, conforme Heo et al. (2014).

A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada pelo método de micro diluição em caldo de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018). Brevemente, foi usado caldo Mueller-Hinton ajustado por cátion (CAMHB, Difco Laboratories) suplementado com 5% de sangue de cavalo lisado. A leitura foi realizada após 24 e 48h de incubação a 35°C. Os antimicrobianos testados (na faixa de concentração de 0,06 - 512 µg/ml) estão descritos na Tabela 1. Bem como os seus respectivos MICs. Para controle de qualidade foram utilizadas as cepas de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Os pontos de corte foram retirados do CLSI VET01S ED5:2020, quando disponível para *Listeria monocytogenes*. Quando esse não era estabelecido utilizou-se referência para *Staphylococcus* não beta-lactâmico e *Streptococcus sp.*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 467 amostras de leite analisadas, 101 (21,63%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Tais achados demonstram a alta prevalência do agente e a importância do monitoramento microbiológico do leite para um agente essencialmente transmitido através do consumo de alimentos contaminados.

Dos 101 isolados de *L. monocytogenes*, 100% (101/101) apresentaram resistência ao menos um antibiótico e 100% (101/101) apresentaram resistência a pelo menos dois grupos de antimicrobianos e 98,02% (99/101) a quatro grupos diferentes, caracterizando um estado de multirresistência (MDRs).

O perfil de suscetibilidade de isolados de *L. monocytogenes* frente a antimicrobianos, bem como, os valores de MIC, MIC 50, MIC90 e perfil de suscetibilidade são apresentados na Tabela 1.

Os maiores níveis de resistência foram observados para os antibióticos ampicilina (100%; 101/101), florfenicol (100% 101/101), ceftiofur (98,02%; 99/101) e enrofloxacina (98,02%; 99/101). Neste contexto, é importante considerar que a ampicilina é um dos fármacos de eleição para o tratamento da listeriose em humanos, demonstrando a relevância do monitoramento do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

Já a maior suscetibilidade foi observada para amoxicilina + clavulanato (100%; 101/101), azitromicina (77,22%; 78/101) e meropenen (77,22%; 78/101). Os maiores MIC90 observados, foram para ampicilina, cefalotina, enrofloxacina, gentamicina e tiamulina (128 µg/mL). Já os menores MIC90 observados foram para meropenen (0,5 µg/mL), amoxicilina + clavulanato (2µg/mL) e eritromicina (4µg/mL).

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (MIC), MIC50, MIC90 e padrão de resistência de *L. monocytogenes* (n=101) isoladas de tanques de expansão de leite frente a 18 antimicrobianos.

ANTIBIÓTICO	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	MIC50	MIC90	MIC Range	%S	%I	%R
Amoxicilina	18	27	5	11	24	11	5						2	8	0,25 – 16	60,4	-	39,6
Amoxicilina + Clavulanato		59		34	8								0,5	2	0,5 – 4	100	0	0
Ampicilina							43	11	24	11	12		16	128	8 – 128	0	-	100
Azitromicina	2	19	33	24	1	22							1	8	0,25 – 8	77,22	0,99	21,78
Cefalexina						23		54	11	13			16	64	4 – 64	0	22,77	77,23
Cefalotina							35	26		16	14	10	16	128	8 – 256	34,65	25,74	39,6
Ceftiofur					2		7	81	11				32	32	4 – 64	0	1,98	98,02
Clindamicina			8	8			29	8	41	7			16	32	1 – 64	0	15,84	84,16
Cloranfenicol						1	23	73	4				16	16	4 – 32	23,76	72,28	3,96
Enrofloxacina				2	34	1	18		29	14	3		16	128	2 – 256	0	1,98	98,02
Eritromicina		55	19	26	1								0,5	4	0,5 – 4	54,45	45,54	0
Florfenicol							77	20	4				8	16	8 – 32	0	0	100
Gentamicina				8	29	2	44		7	11			16	128	2 – 128	36,63	1,98	61,39
Meropenen	71	7	15	8									0,125	0,5	0,125 – 2	77,22	-	-
Penicilina				34	29	21	17						2	8	1 – 8	62,38	-	37,62
Tetraciclina							11	51	10	29			16	64	8 – 64	0	10,89	89,11
Tiamulina						21	15	11	12	28	14		32	128	4 – 128	35,64	-	53,46
Vancomicina				21	17	9	34	8	12				8	32	1 – 32	46,53	41,58	11,88

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecer o perfil de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados bacterianos é fundamental para definição do protocolo de tratamento. A alta taxa de resistência a antimicrobianos demonstrado neste estudo, inclusive para drogas utilizadas no tratamento de eleição, reflete um risco tanto para a saúde animal quanto humana. Como *L. monocytogenes* está presente no ambiente, nossos resultados reforçam a necessidade dos programas de controle e monitoramento do agente na cadeia de produção de leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition.
GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. **FEMS**

Microbiology Reviews, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 851–875, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.002>

HEO, E. J. et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by real-time PCR in processed meat and dairy products. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 453–458, 2014. Available at: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-318>

QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO ARTESANAL CABACINHA DO VALE DO JEQUITINHONHA – MINAS GERAIS: UMA REVISÃO

João Paulo Andrade de Araújo¹, Pedro Henrique de Oliveira Medes¹, Letícia Matos Mattioli², Ana Carolina Alves Vieira¹, Cláudia Freire de Andrade Moraes Penna³, Adréia Marçal da Silva⁴, Bruna Maria Salotti de Souza³, Henrique César Pereira Figueiredo⁵

¹Doutorando (a) do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. ²Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. ³Professor do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. ⁴Professora no Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de São João del-Rei. ⁵Professor na Área de Sanidade de Animais Aquáticos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

INTRODUÇÃO

A produção do queijo Cabacinha iniciou-se em 1952, na região do Vale do Jequitinhonha, em Minas Gerais. As principais características que o difere dos demais queijos artesanais mineiros são a massa filada e a forma de “cabaça”. Embora seu formato se assemelhe ao do queijo italiano *Caciocavallo*, seu processo de produção remete ao queijo tipo muçarela (Santos Filho et al., 2020).

Na atualidade, os municípios de Cachoeira do Pajeú, Comercinho, Divisópolis, Itaobim, Jequitinhonha, Joáima, Pedra Azul, Ponto dos Volantes e Medina foram reconhecidos, em 2014 e 2021, pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) como produtores tradicionais do queijo Cabacinha. A legislação estadual, do ano de 2018, regulamenta a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, tendo sua comercialização estimulada pela Lei do Selo Arte de 2019.

Comercializado *in natura*, defumado, temperado ou recheado com manteiga, o queijo Cabacinha geralmente é armazenado sem embalagem, em temperatura ambiente, por vezes, sob condições de higiene insatisfatórias, às margens de rodovias.

Falhas no controle de sanidade do rebanho, em práticas higiênicas e de padronização no processo de produção dificultam a definição de padrões de identidade desse queijo, podendo comprometer sua qualidade e inocuidade (Furuya, 2010; Santos Filho et al., 2020).

Considerando-se os poucos estudos publicados sobre de qualidade físico-química e microbiológica com a finalidade de que possam auxiliar no direcionamento de pesquisas futuras, que contribuam para a definição dos padrões de identidade e de qualidade sanitária desse queijo artesanal.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre os meses de agosto a dezembro de 2021, foi realizada pesquisa sistemática por trabalhos científicos, compreendendo períodos de tempo específicos e palavras-chave pré-determinadas, relacionadas à produção de queijos artesanais em Minas Gerais, no Brasil e no mundo, direcionados principalmente a queijos artesanais de massa filada. As principais bases de dados utilizadas foram “Google Scholar”, “PubMed” e “Portal CAPES”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando comparadas as características físico-químicas de queijos Cabacinha, produzidos no Vale do Mucuri (Furuya, 2010) e no Vale do Jequitinhonha (Santos Filho et al., 2020), por aplicação do teste t ($\alpha = 5\%$), constataram-se diferenças em relação às respectivas médias de umidade (44,49% e 36,23%), teor de cloretos (0,99% e 0,84%) e pH (5,52 e 5,14). Não foram observadas, respectivamente, diferenças ($p < 0,05$) para

as médias de matéria gorda no extrato seco total (EST) (27,53% e 27,69%) e proteínas (25,78 % e 26,47%). Fatores relacionados a períodos de armazenagem longos, ausência de embalagem e maior tempo de exposição ao ambiente podem justificar a média de umidade inferior nos queijos do Vale do Jequitinhonha.

Todas as variáveis físico-químicas apresentaram baixa instabilidade. Foram observadas diferenças ($p < 0,001$) nos valores dos parâmetros de umidade e de matéria gorda no EST entre as amostras analisadas no Vale do Mucuri e no Vale do Jequitinhonha pela aplicação do teste Exato de Fisher – queijos com média umidade (51,60%) e gordos (51,60%) no Vale do Jequitinhonha; e queijos com média umidade (71,40%) e semigordos (92,86%) no Vale do Mucuri.

Furuya (2010) identificou elevadas contagens de *Escherichia coli* em três (10,0%) amostras de queijo Cabacinha, coletadas nos Vales do Mucuri e Jequitinhonha. Uma (3,3%) amostra apresentou contagem de *Staphylococcus coagulase positivo* (SCP) acima dos padrões estabelecidos para o queijo tipo muçarela (BRASIL, 2018). Em amostras coletadas no comércio no Vale do Jequitinhonha, Santos Filho et al. (2020) observaram contagens reduzidas de *E. coli* (valor máximo de 10^1 UFC/g) em todas as amostras e, em seis (19,4%) queijos Cabacinha, contagens de SCP superiores aos permitidos (Brasil, 2018). Segundo os autores, o aquecimento da massa a 85 °C por 15 min. durante o procedimento de filagem pode ter influenciado na diminuição das contagens desses micro-organismos. Entretanto, as enterotoxinas estafilocócicas são resistentes ao processamento térmico ao qual o queijo Cabacinha é submetido. Não foram detectadas *Salmonella* spp. ou *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante conhecer o modo de elaboração do queijo Cabacinha. Diretrizes relacionadas a definição de parâmetros físico-químicos, microbiológicos e de identidade devem ser promulgadas, considerando-se preceitos de qualidade e de inocuidade.

Notam-se deficiências de higiene tanto nos locais de produção, quanto nos pontos de comercialização do queijo Cabacinha. Embora não tenham sido detectadas *Salmonella* spp. ou *L. monocytogenes*, contagens elevadas de *S. aureus* e *E. coli* em algumas amostras indicam deficiências em práticas higiênico-sanitárias, fato que pode oferecer risco ao consumidor. A falta de padronização do processo pode levar a divergências em aspectos físico-químicos, o que pode descaracterizar o produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 837, de 18 de junho de 2018**. Altera a Portaria MAPA nº 364, de 4 de setembro de 1997. Brasília: Diário Oficial da União, 20 de junho de 2018, 2018.

Furuya, L. B. **Identidade e qualidade do queijo de massa cozida do nordeste mineiro**. Dissertação, Faculdade de Farmácia, UFMG, 2010, 117p.

Santos Filho, A. S. et al. Microbiological and chemical characterization of Cabacinha Cheese marketed in three municipalities in Vale do Jequitinhonha. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. 1-16, 2020.

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LEITE E DERIVADOS INSPECIONADOS PELO SERVIÇO OFICIAL DO ESTADO DE GOIÁS EM 2020 E 2021

Priscilla Vanesa Rodrigues Gonçalves^{1,2}, Aline Barichello Cerqueira^{1,2}, Henricson Nascimento Custódio², Luanne Puglisi Marreto², Hérica Xavier da Costa², Fernanda Pacheco Balestra², Paulo Roberto Lucas Viana Filho², Cíntia Silva Minafra e Rezende³

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás. ²Agência Goiana de Defesa Agropecuária. ³Professora do Departamento de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

INTRODUÇÃO

O Serviço Veterinário Oficial (SVO) é responsável pela proteção e melhoria da saúde pública e animal (Schneider, 2011). Uma de suas principais funções é garantir que todas as partes envolvidas na produção de alimentos cumpram com suas respectivas obrigações sanitárias e higiênicas, a fim de assegurar alimentos saudáveis para o consumidor (Santos et al., 2014). No Brasil, o SVO é representado, em nível estadual, pelos órgãos de defesa sanitária animal das unidades federativas.

Em Goiás, o Serviço de Inspeção Estadual de Produtos de Origem Animal (SIE-POA) é realizado pela Agência Goiana de Defesa Agropecuária (AGRODEFESA). Esta autarquia atua na inspeção industrial, sanitária e tecnológica de toda a cadeia produtiva, desde a produção da matéria-prima até o produto final, com o objetivo de garantir a inocuidade e qualidade dos POA, manipulados e ou fabricados (Goiás, 1993).

A análise fiscal constitui um relevante instrumento regulatório e fiscalizador quando complementa as modalidades de análise prévia e de controle, subsidia ações de inspeção de indústria, quando, como consequência da mesma, são levantadas suspeitas sobre o processo produtivo, qualidades das matérias primas e/ou armazenagem inadequada, e também como parte de programas pré-estabelecidos de monitoramento da qualidade dos produtos (Santos et al., 2014).

A coleta de amostras de POA pelo SIE e a realização de análises microbiológicas fazem parte da rotina oficial. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar e divulgar a qualidade microbiológica de leite pasteurizado e derivados lácteos colhidos pelo SIE nos anos 2020 e 2021.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de 2020 a 2021, o total de 154 amostras fiscais subdivididas em matrizes leite pasteurizado, doce de leite, manteiga, iogurte, requeijão, creme de leite cru e coalhada foram obtidos em indústrias inspecionadas. Durante a coleta, as amostras foram lacradas e acondicionadas sob temperatura adequada, conforme indicação de rotulagem, e encaminhadas ao Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos (LABQUALI) para a realização dos ensaios microbiológicos. No setor de recepção de amostras do laboratório, foi realizada aferição das temperaturas dos produtos e avaliação da integridade da embalagem. No setor de microbiologia, as amostras foram pesadas (alíquota de 25 g ou mL) e analisadas conforme descrito no manual de métodos oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e normas ISO (*International Organization for Standardization*) referenciais quanto às análises (ISO 11133; ISO 7218; ISO 6887; ABNT NBR ISO 4831; ABNT NBR ISO 4832; ANBT NBR ISO 6888-1; ISO 6611/IDF 94; ISO 21528-2; ISO 6579-1). Os resultados obtidos foram interpretados e registrados, sendo classificados qualitativamente como em “acordo” ou “desacordo”, conforme os padrões de referências vigentes na legislação (Port. 146/1996, MAPA; Port. 352/1997, MAPA; Port. 354/1997, MAPA; Port. 357/1997, MAPA; Port. 359/1997, MAPA; Port. 364/1997, MAPA; Res. 4/2000, MAPA; IN 30/2001, MAPA; IN 4/2004, MAPA; IN 16/2005, MAPA; IN 46/2007, MAPA; Port. 837/2018, MAPA; IN 58/2019, MAPA; Res. 1/2019, MAPA; IN 60/2019,

ANVISA; IN 73/2020, MAPA; IN 66/2020, MAPA). A análise dos dados foi realizada de forma descritiva, considerando as frequências das alterações encontradas (%).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram colhidas 154 amostras fiscais em laticínios do SIE, 27 amostras de leite pasteurizado, 77 de doce de leite, 28 de manteiga, 11 de iogurte, cinco de requeijão, quatro de creme de leite cru e duas de coalhada. Do total de amostras analisadas, foi observada frequência de 10,4% de amostras classificadas como desacordo, acima dos padrões de referência. Dentre os produtos lácteos, manteiga e iogurte apresentaram maiores frequências de desacordo, 32,1% e 27,3%, respectivamente. As amostras de requeijão, creme de leite cru e coalhada atenderam aos padrões microbiológicos preconizados pela legislação vigente.

Tabela 1 - Amostras fiscais classificadas em “acordo” ou “desacordo”, segundo padrões microbiológicos vigentes em legislação.

Produto	ACORDO	DESACORDO	Total
Leite pasteurizado	24/27 (88,9%)	03/27 (11,1%)	27
Doce de leite	76/77 (98,7%)	01/77 (1,3%)	77
Manteiga	19/28 (67,9%)	09/28 (32,1%)	28
Iogurte	08/11 (72,7%)	03/11 (27,3%)	11
Requeijão	05/05 (100%)	0	05
Creme de leite cru	04/04 (100%)	0	4
Coalhada	02/02 (100%)	0	2
TOTAL	138/154 (89,6%)	16/154 (10,4%)	154

Tabela 2 - Ensaio microbiológico classificados em “desacordo”.

Produto	Leite Pasteurizado	Doce de Leite	Manteiga	Iogurte	Total
Contagem Coliformes totais	NA	NA	NA	NA	0
Contagem Coliformes 45°C	NA	NA	NA	NA	0
NMP Coliformes totais	NA	NA	5	NA	5/22 (22,7%)
NMP Coliformes 45°C	NA	NA	4	2	6/22 (27,3%)
Contagem <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	NA	0	0	NA	0
Contagem Fungos e leveduras	NA	1	5	2	8/22 (36,4%)
Contagem <i>Enterobacteriaceae</i>	3	NA	NA	NA	3/22 (13,6%)
<i>Salmonella</i> sp.	NA	NA	NA	NA	0

Nota: Algumas amostras foram classificadas em “desacordo” para mais de um ensaio microbiológico. NMP: Número mais provável; NA: não se aplica.

Quanto ao ensaio contagem de *Enterobacteriaceae* em leite, três amostras (11,1%) apresentaram desacordo. Dentre amostras de doce de leite, 1 (1,3%) estava acima dos padrões de referência no ensaio de contagem de fungos e leveduras. Nas amostras, com exceção do leite pasteurizado, verificou-se valores em desacordo tanto para ensaios de NMP de coliformes totais e/ou a 45° C, quanto para contagem de fungos e leveduras, predominando casos de desacordo no ensaio de contagem de fungos e leveduras (36,4%) (Tabelas 1 e 2).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O índice de conformidade dos produtos analisados pelo SIE foi de 89,6% enquanto que o resultado descrito no anuário do Programa de Avaliação de Conformidade de Parâmetros Microbiológicos de POA do Serviço de Inspeção Federal (SIF) foi de 85,15%, no mesmo período. A verificação do índice de conformidade é fundamental para avaliação dos controles de produtos e de processos realizados pelos estabelecimentos, além de subsidiar o gerenciamento de risco pelo serviço oficial. As ações fiscalizatórias vislumbram e corroboram à proteção do consumidor e compõem o conjunto de medidas oficiais para manutenção da saúde única.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Schneider H. Good Governance of National Veterinary Services. **Revue Scientifique Technique/Office International Des Épizooties**, v.30, p. 325-338, 2011.
- Santos D. V, Todeschini B., Christiane M. B. M. A análise de risco como ferramenta estratégica para o serviço veterinário oficial brasileiro: dificuldades e desafios. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V. 34, p. 542-554, 2014.
- Goiás. Lei nº11.904 de 17 fev 1993. Dispõe sobre a inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal no Estado de Goiás e dá outras providências. **Diário Oficial Do Estado De Goiás**, Goiânia, 1993.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Manual de Métodos Oficiais**, Brasil, 2015.

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LEITES PASTEURIZADOS COLETADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Lucas Rodrigues da Silva¹, Lucas da Silva Mendes¹, Cosme Damião Barbosa¹, Isabella Maciel Costa¹, Leorges Moraes da Fonseca¹, Marcelo Resende de Souza¹, Bruna Maria Salotti de Souza¹, Elisa Helena Paz Andrade¹

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

INTRODUÇÃO

Os leites fluidos são produtos populares no Brasil devido às suas características nutricionais e sensoriais. O leite pasteurizado é o leite fluido submetido à pasteurização, envasado automaticamente em circuito fechado e destinado a consumo humano direto.

A pasteurização é o tratamento térmico aplicado ao leite com objetivo de evitar perigos à saúde pública decorrentes de micro-organismos patogênicos eventualmente presentes, e que promove mínimas modificações químicas, físicas, sensoriais e nutricionais. Para a produção de leite pasteurizado destinado ao consumo direto, o leite é submetido a pasteurização rápida, que consiste no aquecimento do leite em camada laminar entre 72°C e 75°C pelo período de 15 a 20 segundos, em aparelhagem própria.

A aplicação incorreta do binômio tempo/ temperatura nos processos de pasteurização, falhas de higiene na obtenção da matéria-prima, nas condições ambientais e de processamento podem comprometer a qualidade microbiológica do produto final. A conservação do leite pasteurizado em temperaturas de refrigeração adequadas após o envase, expedição, transporte e exposição no comércio varejista também representam ponto de atenção e é fator interferente em sua qualidade microbiológica. Para leite pasteurizado e leite pasteurizado tipo A, as enterobactérias são o grupo preconizado para análise e a contagem desses microrganismos deve ser de até 1×10^1 UFC/ mL para amostras coletadas no varejo (Brasil, 2019).

Assim, esse trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica de leites pasteurizados, coletados no estado de Minas Gerais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Em julho de 2022, 29 amostras de leite pasteurizado foram coletadas em diferentes municípios do estado de Minas Gerais. Essa coleta contemplou amostras de 18 marcas distintas e no caso da mesma marca, lotes diferentes. Após as coletas, as amostras foram encaminhadas sob refrigeração ao laboratório de Microbiologia de Leite e derivados do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG para a realização das análises microbiológicas. Todas as amostras permaneceram sob refrigeração até o momento das análises, que ocorreram durante o prazo de validade especificado na embalagem. Foram feitas as contagens de enterobactérias, por meio do ágar VRBA (Ágar bile vermelho violeta), microrganismos aeróbios mesófilos e microrganismos psicrotróficos. As diluições utilizadas para plaqueamento foram 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Foram também realizadas as pesquisas de atividade das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase nas amostras de leites pasteurizado. Para todos os parâmetros analisados foram seguidas metodologias descritas ou referenciadas no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal (Brasil, 2018).

Os resultados obtidos foram tabulados em uma planilha de Excel, juntamente com outros dados relativos a cada amostra como data de fabricação e validade, marca, se inspecionada ou não, teor de gordura. A análise de dados foi feita por meio de estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 29 amostras de leite pasteurizado coletadas, quatro eram de leite pasteurizado tipo A. Do total de amostras, 18 (62,1%) apresentaram contagens para enterobactérias de até 1×10^1 UFC/mL, incluindo as de leite pasteurizado tipo A, o que indica conformidade com o limite estabelecido pela Instrução Normativa (IN) nº 60 de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2019). As demais amostras (11- 37,9%) apresentaram contagens acima de 1×10^1 UFC/mL, estando em desacordo com o padrão estabelecido. As enterobactérias possuem importância clínica, pois alguns desses microrganismos são patogênicos; além disso, podem ser habitantes do trato intestinal de mamíferos. São microrganismos eliminados pela pasteurização, assim sua presença pode indicar contaminação pós-pasteurização. 28 amostras de leite pasteurizado (96,5%) apresentaram contagem de microrganismos aeróbios mesófilos igual ou maiores que $1,7 \times 10^2$ UFC/mL e apenas uma (3,5%) apresentou contagem de $< 1 \times 10^1$ UFC/mL. Embora esse parâmetro não seja exigido para pesquisa pela IN nº 60, o resultado dessa análise é indicativo da higiene global de processos. A falta de refrigeração adequada após o envase pode ter contribuído para elevação dessas contagens. Para microrganismos psicrótrópicos, 18 amostras (62,1%) apresentaram contagens estimadas de $> 1 \times 10^2$ UFC/mL. Essa contagem também não é exigida pela IN nº 60, no entanto, como esse produto permanece em refrigeração, essa condição pode favorecer a multiplicação desse grupo microbiano. As amostras que apresentaram as contagens mais elevadas para enterobactérias, também apresentaram elevadas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos ($> 2,5 \times 10^5$ UFC/mL) e de psicrótrópicos ($> 2,5 \times 10^6$ UFC/mL).

Em relação às pesquisas das atividades das enzimas fosfatase alcalina e lactoperoxidase, 24 amostras foram negativas para a atividade da primeira e positivas para a atividade da segunda, resultado esperado para leite pasteurizado. Em quatro amostras, não foi detectada atividade de fosfatase alcalina e lactoperoxidase, o que indica um superaquecimento do leite. Em uma amostra, foram detectadas atividades de fosfatase alcalina e de lactoperoxidase, sugestivo de pasteurização ineficiente ou contaminação com leite cru. Essa amostra apresentou contagens microbianas elevadas e estava em desacordo com o padrão estabelecido para enterobactérias.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados evidenciam a importância da avaliação da qualidade microbiológica de leites pasteurizado. Foram encontradas em algumas amostras elevadas contagens de enterobactérias, microrganismos aeróbios mesófilos e psicrótrópicos, que, associados aos resultados das pesquisas enzimáticas de fosfatase alcalina e lactoperoxidase, sugerem a ocorrência de contaminação pós-pasteurização. Esses achados demonstram a importância da adoção de medidas de mitigação do risco dessas contaminações por parte da indústria, como procedimentos adequados de higienização. Por sua vez, os órgãos de inspeção devem estar atentos, de forma a reforçar as ações de fiscalização da qualidade desses produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde/ANVISA. **Instrução Normativa nº 60, de 23/12/2019**. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: ANVISA, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal para realização de ensaios em amostras de produtos de origem animal, oriundas dos programas e controles oficiais do MAPA, cuja adoção é compulsória pelos laboratórios integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção a Sanidade Agropecuária. Brasília: MAPA, 2018.

Área Temática 06: FÍSICO-QUÍMICA DE LEITE E DERIVADOS

ANÁLISE DE RESÍDUO DE PENICILINA G, ESTREPTOMICINA E DIHIDROESTREPTOMICINA EM LEITE

Rosângela Silveira Barbosa¹, Maira Balbinotti Zanela¹, Giovana Paula Zandoná², Rosane Lopes Crizel², Isabelle D. Veber Angelo²; Melissa García Méndez²; Marcelo Bonnet Alvarenga¹; Fabiano Barreto³

¹Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. ²Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq, Programa Leite Seguro, Laboratório de Qualidade do Leite, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. ³Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/RS/MAPA), Porto Alegre, Brasil

INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil cresceu substancialmente nas últimas décadas, fazendo com que o país se tornasse o terceiro maior produtor mundial de leite (FAO, 2022). O órgão responsável pela fiscalização do leite é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da IN 76 e 77 (BRASIL, 2018) e, pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), com o objetivo de promover segurança química dos alimentos de origem animal produzidos no Brasil, bem como melhorar a qualidade do leite (BRASIL, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca que a maior ameaça global de saúde pública é a resistência aos antimicrobianos (Rocha, 2019), podendo ser desencadeada pela presença de medicamentos veterinários acima do limite máximo de resíduo (LMR) em alimentos lácteos.

No Brasil são utilizados medicamentos com associação de princípios ativos de antibióticos para o tratamento de vacas leiteiras com doenças infecciosas, ocasionadas por *Streptococcus* spp, *Bacillus* spp, *Escherichia* spp, *Staphylococcus* spp, *Pasteurella* spp e *Corynebacterium* spp. Como exemplo, há a associação de Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica (família dos β lactâmicos), Dihidroestreptomicina e Estreptomicina (família dos aminoglicosídeos), injetável e tempo de carência de 4-5 dias. Este, carece de mais estudos comparando a curva de eliminação no leite, o LMR permitido pela legislação e o tempo de carência recomendado pelo fabricante.

O objetivo do trabalho consistiu em avaliar o LMR, o tempo de detecção no leite em comparação ao recomendado pelo fabricante, a partir da associação de princípios ativos de penicilina, estreptomicina e dihidroestreptomicina.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo piloto foi realizado pelo Programa Leite Seguro, em 2020, no rebanho experimental do Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL). Em etapa prévia, foi selecionada uma vaca da raça Jersey em fase final de lactação, a fim de subsidiar a realização futura de estudo mais robustos. Este animal apresentou produção de leite de 9 L/dia, 306 dias de lactação e 3 partos.

Foi aplicado um antibiótico injetável, com a associação dos princípios ativos penicilina, estreptomicina e dihidroestreptomicina, em aplicação única, com período de carência recomendado em bula de 4-5 dias. Foram coletados 50 mL de leite antes do tratamento (tempo zero), e após o tratamento, nas ordenhas da manhã durante 15 dias. As amostras foram coletadas com um coletor acoplado a ordenhadeira. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em frascos sem conservante e refrigeradas até realização da análise por kits comerciais. Os tempos 0, 1, 2 e 3 foram analisados pelo teste comercial rápido Kit Charm EZ® (QUAD1 – Betalactâmicos - penicilina G, QUAD3 – aminoglicosídeos - estreptomicina) e a partir do tempo 4, pelo Devoltest® T (teste microbiológico) e Charm® Blue Yellow II Test (teste imunológico), ambos teste lentos. Posteriormente, foram realizadas as análises cromatográficas para detecção e

quantificação de Penicilina G, Estreptomina e Dihidroestreptomina, de acordo com o método descrito por Jank et al., (2015), usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS). O método foi validado de acordo com a diretiva 657/CE/2002 para análise quantitativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos (Tabela 1), a partir dos testes realizados para identificação de presença de resíduos de antibióticos, observa-se que o tempo 0 foi negativo, como esperado; os três primeiros dias após a aplicação do antibiótico foram positivos para o QUAD1 e apenas positivo para QUAD3 no primeiro dia após aplicação do medicamento. As amostras apresentaram resultado positivo para Blue-Yellow e Devoltest, mesmo após o período de carência do medicamento.

Preconiza-se que a determinação da capacidade de detecção ($CC\beta$) de um ensaio seja mediante a fixação inicial da concentração equivalente a 50% do LMR ou seja tão baixo quanto razoavelmente possível, garantindo detecção do verdadeiramente positivo (EC, 2021).

Tabela 1 – Análise de detecção e quantificação de resíduo de medicamento com associação de penicilina, estreptomina e diidroestreptomina em leite.

Dias de coleta	QUAD 1	QUAD 3	Blue-Yellow	Devoltest	Penicilina Estr G ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	estreptomina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Dihidro estreptomina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
0	Negativa	Negativa			<LQ	<LQ	<LQ
1	+ (BL)	+ (STP)			37	242,12	188,28
2	+ (BL)				2,92	<LQ	<LQ
3	+ (BL)						
4			Positiva	Positiva	3,09	<LQ	<LQ
5			Positiva	Positiva			
6			Positiva	Positiva			
7			Positiva	Positiva	2,34	<LQ	<LQ
8			Positiva	Positiva			
9			Positiva	Positiva			
10			Positiva	Positiva	1,57	<LQ	<LQ
11			Negativa	Positiva			
12			Negativa	Positiva			
13			Negativa	Positiva	<LQ	<LQ	<LQ
14			Negativa	Negativa	<LQ	<LQ	<LQ
15			Negativa	Negativa			

Nota: Positiva: presença de antibiótico; negativo: ausência de antibiótico; <LQ: abaixo do limite de quantificação.

A quantificação dos compostos estudados na análise por cromatografia, observa-se que no primeiro dia de aplicação, para os três compostos analisados a concentração estava acima do (LMR) de 4, 200 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, com base na IN nº 51, de 19 de dezembro de 2019, da ANVISA (BRASIL, 2019). Isso era esperado, uma vez que a bula informa que o período de eliminação é de 4 a 5 dias. O método possui limite de quantificação de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para a penicilina G e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para estreptomina e diidroestreptomina, permitindo quantificar a penicilina até o décimo

dia. Observa-se que a partir do segundo dia de aplicação, os três compostos estavam abaixo do LMR (BRASIL, 2019).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo piloto, a utilização do medicamento injetável com associação de princípios ativos de penicilina, estreptomicina e dihidroestreptomicina, apresentou resultado positivo além do período de carência máxima de cinco dias para os testes lentos Blue-Yellow e Devotest, enquanto que, no teste confirmatório foi quantificado acima do Limite Máximo de Resíduo permitido apenas no primeiro dia após o tratamento, para todos os princípios ativos. Não se pode fazer inferências sem outros estudos que confirmem os dados apresentados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa nº 76 de novembro de 2018**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, nov. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 77, de 26 de novembro de 2018**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 nov. 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, 19/12/2019**. Publicada no DOU nº 249, 26/12/2019.
- BRASIL, 2017. **Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCR**. 2017. Disponível: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtosanimal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>.
- BRITO; LANGE. Resíduos de antibióticos em leite. Comunicado Técnico 44. **Embrapa Gado de Leite**, 2005.
- EC (European Commission). Commission Implementing Regulation 2021/888/EC of 22 March 2021. on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. **Official Journal of the European Communities**, 2021, L 180/84.
- FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO STAT**. Italy, 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/>.
- MENDES, C. et al. Pesquisa de resíduos de beta-lactâmicos no leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o Delvotest. **Arq.Inst.Biol.**, nº 75, 2008.
- ROCHA. Antibióticos: resistência de microrganismos é grave ameaça à saúde global. 2019. Disponível: <https://portal.fiocruz.brs>.

APLICAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA DETERMINAÇÃO DE OXITETRACICLINA, SULFADOXINA E TILOSINA EM LEITE

Izabelle Christinne Pereira de Brito¹, Henrique Luís da Silva Santos¹, Kristy Ellen Oliveira Santos¹, Janine Lima Soares¹, Ana Amélia Vieira Gonçalves¹, Bruna Carol Oliveira da Silva¹, Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes²

¹Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos e Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Brasil.
²Docente/pesquisador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos

INTRODUÇÃO

O uso inadequado de antibióticos em animais lactantes se tornou problema mundial, causando a presença de resíduos no leite, que representa a principal contaminação química em leite e produtos lácteos (Ramani et al., 2011). Esta condição pode tornar os produtos lácteos impróprios para consumo, pois representam riscos para a saúde; também pode interferir em processos tecnológicos de produção, e envolver aspectos econômicos, como a criação de barreiras sanitárias e às exportações (Oliveira, 2014) além de estar associado a estimulação da resistência antimicrobiana, tornando este impasse, um problema mundial de saúde pública (Panigrahi; Singh Sheoran; Ganguly, 2017). Em função dessa complexidade, a investigação da presença de antimicrobianos em leite é necessária.

Para avaliação da presença de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos, métodos analíticos confiáveis devem ser desenvolvidos, buscando eficiência em todas as fases e menor uso de reagentes químicos. Nesse sentido, Anastassiades et al. (2003) desenvolveram o método de extração QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), destinado para a extração de pesticidas em matrizes alimentícias com baixo conteúdo de lipídios, como frutas e vegetais, para determinação quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência. O método QuEChERS tem sido adaptado para ser aplicado a matrizes alimentícias mais complexas, que contêm alto conteúdo de lipídios e proteínas, como ovos (Choi et al., 2015), tecido animal (Botelho et al., 2018) e leite (Gonzalez-Jartín et al., 2021). Assim, o objetivo da condução deste estudo foi desenvolver extração multirresíduos de medicamentos veterinários (Sulfadoxina, Tilosina e Oxitetraciclina) baseado na metodologia QuEChERS em leite.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de leite de vacas Holandês-Zebu, que não receberam tratamento com antibióticos nos últimos 50 dias. O método QuEChERS foi aplicado de acordo com Anastassiades et al. (2003) e Lehotay et al. (2005) sendo efetuadas algumas adaptações. No desenvolvimento do método, o procedimento analítico consistiu em adicionar 10 mL de amostra de leite em tubo de centrífuga; adicionar os analitos Sulfadoxina, Tilosina e Oxitetraciclina, na concentração requerida, misturar e deixar em repouso por 1 h; adicionar 10 mL de acetonitrila, 4,0 g de MgSO₄ e 1,0 g de NaCl em cada tubo e centrifugar durante 1 min; retirar 4,0 mL⁻¹ do sobrenadante e aplicar 50 mg PSA, 50 mg C18 e 150 mg MgSO₄; misturar e centrifugar durante 1 min. Em seguida foi transferido 2,0 mL⁻¹ do sobrenadante com o uso de seringa que foi filtrado, usando-se filtro de seringa (PTFE 4mm x 0,45µm), acondicionando-os em frascos de vidro de volume 2 mL⁻¹. Nestes frascos foram transferidos 20,00 µL com microagulha injetora de vidro, injetando as amostras em cromatógrafo líquido.

As concentrações dos analitos foram determinadas utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC, marca Shimadzu (Kyoto, Japan), modelo SPD-20A, com

coluna C18 Luna (100 x 4,6 mm, 5µm). O modo de injeção utilizado foi o gradiente (20 min) com vazão de 0,75 mL⁻¹ min⁻¹. A programação de temperatura do forno foi constante de 40 °C. O volume de 20 µL foi injetado no HPLC, utilizando micro agulha injetora de vidro para cromatografia líquida. Foi utilizada uma faixa de comprimento de onda para cada medicamento veterinário, Sulfadoxina (272 nm); Tilosina (450 nm) e Oxitetraciclina (363 nm) para obtenção dos espectros.

Dois parâmetros foram utilizados para medir a eficiência do processo de extração os valores de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo os valores de recuperação e precisão (desvio padrão relativo – DPR) foram determinados por análises em triplicata, de amostras de leite fortificadas com os padrões analíticos, avaliando-se as concentrações de 12,5; 50,0 e 150 mg kg⁻¹. Os valores médios de recuperação variaram de 86 a 120%, com valor máximo de DPR de 14% para o leite (Tabela 1) de modo que todos se encontram na faixa estabelecida de 70 a 120% para a recuperação e até 20% para DPR (European Commission, 2019).

Tabela 1 - Valores de recuperação (%) e desvio padrão relativo (DPR) para sulfadoxina, tilosina e oxitetraciclina, em leite.

Medicamento veterinário	Concentração (mg kg ⁻¹)		
	Leite		
	12,5	50,00	150,00
Tilosina	96±1	102±3	112±8
Sulfadoxina	120±5	95±3	102±3
Oxitetraciclina	86±6	99±7	101±14

Os cromatogramas dos extratos obtidos após extração por QuEChERS, na análise de Sulfadoxina, Tilosina e Oxitetraciclina, em leite, apresentaram-se livres de interferentes na região do cromatograma próxima ao tempo de retenção dos analitos, sendo que o tempo de retenção para Sulfadoxina foi de 4.3 minutos, para tilosina 7.12 minutos e para Oxitetraciclina 8.51 minutos. Observa-se também que a aplicação do método QuEChERS para a extração dos antibióticos foi eficaz, dado que os compostos foram identificados nas amostras fortificadas. Estes resultados indicam que o método de extração QuEChERS foi adequado. Comprovando assim a eficiência do uso do PSA e do C18 na etapa de “clean-up” sugerido por Lehotay *et al.* (2005). Deste modo, para melhorar a eficiência do método de extração, considerando-se as características do analito, alguns procedimentos podem ser necessários; como o ajuste do pH e a adição de C18 e PSA.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o método de extração QuEChERS associado a determinação por cromatografia líquida de alta eficiência foi eficiente, pois permitiu a determinação simultânea dos resíduos de medicamentos veterinários em leite, além de se mostrar uma técnica eficiente, rápida e de baixo custo, podendo ser utilizada como um protocolo para investigar a presença deste tipo de resíduos em amostras de leite.

AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Defesa de Direito Difuso do Consumidor pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo.

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE KITS COMERCIAIS PARA DETECÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM LEITE BOVINO

Rosângela Silveira Barbosa¹, Maira Balbinotti Zanela¹, Fernanda Moreira Oliveira², Renata Dias Dalbann², Joice da Silva Ramson², Rogério Morcelles Dereti³, Fabiano Barreto⁴, Marcelo Bonnet Alvarenga¹

¹Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. ²Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq, Programa Leite Seguro, Laboratório de Qualidade do Leite, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. ³Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil. ⁴Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA-RS/MAPA), Porto Alegre, Brasil

INTRODUÇÃO

As quinolonas são um grupo de antibióticos amplamente utilizados nas fazendas leiteiras para tratamento de várias doenças. Das quinolonas derivam as fluorquinolonas que comparativamente apresentam maior eficácia antimicrobiana, com grande espectro antibacteriano, como a ciprofloxacina (CIP). A CIP é utilizada na medicina veterinária principalmente para tratar da mastite bovina, prevenindo a replicação do DNA bacteriano de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. Isto se deve a ação deste antibiótico como inibidor da DNA girase, uma enzima envolvida neste processo.

O uso de antibióticos, como a CIP, pode eliminar resíduos no leite, que não podem estar presentes em níveis que coloquem em risco a saúde do consumidor de acordo com o Codex Alimentarius. O uso destes medicamentos pode causar reações alérgicas em humanos, aumentar a resistência antibiótica de bactérias, ainda podem induzir problemas na fabricação de produtos derivados (FAO, 2009).

No Brasil, a detecção de resíduos pelo uso de kits comerciais para controle dessas substâncias foi autorizada e aprovada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Os quais, são testes qualitativos de triagem geralmente baseados na inibição do crescimento microbiano, testes imunológicos e enzimáticos com receptores específicos. Porém, nem todos são capazes de detectar quinolonas nos níveis de Limite Máximo de Resíduos (LMR) ou próximos, o que ocorre nos métodos microbiológicos baseados na inibição de *Geobacillus stearothermophilus*, que detectam antibióticos β lactâmicos de forma eficiente e, em alguns casos, tetraciclinas (Roca et al., 2010).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho de kits analíticos para detectar ciprofloxacina em amostras de leite bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido com dados de um experimento do Programa Leite Seguro, em 2022, no rebanho experimental do Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL). O antibiótico Ciprofloxacina (100 mg) foi aplicado via intramamária, conforme protocolo da bula, durante 3 dias consecutivos, aplicado após a ordenha da manhã, em 4 vacas Jersey em lactação. O tempo de carência deste antibiótico é de dois dias posteriores após a última aplicação do tratamento.

Os animais foram selecionados por apresentarem características semelhantes quanto a dias de lactação (200 DEL), produção de leite (15 kg), composição e contagem de células somáticas abaixo de 200 mil cél/mL.

A vacas foram ordenhadas em ordenhadeira balde ao pé, individualmente, sendo coletada uma alíquota de leite de 50 mL nas ordenhas (manhã e tarde) durante 3 dias, sendo uma antes da aplicação do medicamento (D0) e as demais durante o período de tratamento.

As amostras foram armazenadas em frascos sem conservantes e refrigeradas até a realização da pesquisa de resíduos utilizando os kits analíticos Charm® Blue Yellow II Test e o Devoltest® T- métodos de inibição de crescimento microbiano, e o Charm®

ED Brasil - método imunoenzimático com receptor específico para o grupo quinolona, o qual pertence a Ciprofloxacina. Cada um desses kits apresenta uma faixa de sensibilidade a determinados antibióticos, que estão em acordo com o Limite Máximo de Resíduo (LMR), em conformidade com o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCRC). O Charm® Blue Yellow II Test e o Devoltest® T não apresentam sensibilidade à quinolonas de acordo com suas especificações de sensibilidade, já o Charm® ED Brasil pode detectar quinolonas numa faixa de detecção de 10 a 15 ppb, sendo estipulado um LMR de 100 ppb para este antibiótico. Os dados foram avaliados por estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, observa-se que os kits comerciais Charm® Blue Yellow II Test e Devoltest® T detectaram o antibiótico presente no leite ordenhado na tarde, aproximadamente 10 h após sua aplicação, sugerindo uma maior concentração de Ciprofloxacina no leite nesse período, com exceção apenas da amostra B no primeiro dia de coleta na ordenha da tarde. A avaliação com Charm® ED Brasil apontou a presença de quinolona até mesmo na ordenha da manhã sugerindo maior sensibilidade para este antibiótico.

Tabela 1 - Resultados da detecção de ciprofloxacina no leite de animais em tratamento, pelos kits comerciais para pesquisa de resíduos de antibióticos

A*	1	Manhã	N	N	N
B*	1	Manhã	N	N	N
C*	1	Manhã	N	N	N
D*	1	Manhã	N	N	N
A	1	Tarde	P	P	P**
B	1	Tarde	N	N	P
C	1	Tarde	P	P	P
D	1	Tarde	P	P	P
A	2	Manhã	N	N	P
B	2	Manhã	N	N	P
C	2	Manhã	N	N	P
D	2	Manhã	N	N	P
A	2	Tarde	P	N	N
B	2	Tarde	P	N	N
C	2	Tarde	P	N	N
D	2	Tarde	P	N	N
A	3	Manhã	N	N	P
B	3	Manhã	N	N	P
C	3	Manhã	N	N	P
D	3	Manhã	N	N	P
A	3	Tarde	P	P	P
B	3	Tarde	P	P	P
C	3	Tarde	P	P	P
D	3	Tarde	P	P	P

*Antes da aplicação do medicamento. **P = positivo para antibiótico do grupo quinolona.

Portanto, mesmo que os testes Charm® Blue Yellow II Test e o Devoltest® T não sejam indicados para detectar quinolonas nos níveis de LMR, este estudo demonstra a possibilidade de resultados positivos, caso não seja seguido corretamente o período de carência, podendo ter descarte de leite na indústria, conseqüentemente, causando prejuízos aos produtores.

As análises com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) estão sendo realizadas para verificar as concentrações de Ciprofloxacina que foram detectadas nas amostras utilizadas neste trabalho.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Charm® Blue Yellow II Test e Devoltest® T foram capazes de detectar quinolonas em leite bovino no período de tratamento com o antibiótico ciprofloxacina. O que demonstra que mesmo não tendo indicação para detecção deste tipo de antibiótico, podem detectar a presença de resíduo se não for respeitado o período de carência. O Charm® ED Brasil detectou resíduo de ciprofloxacina durante todo o período de tratamento. O estudo cromatográfico complementar irá quantificar o resíduo detectado possibilitando maiores inferências com relação a sensibilidade dos kits utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. **Producción de alimentos de origen animal: código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos – CAC/RCP 57-2004**. 2ª ed. Roma: FAO/OMS; 2009.
Roca, M., Castillo, M., Martí, P., Althaus, R. L., Molina, M. P. Efeito do aquecimento na estabilidade de quinolonas no leite. **Jornal de química agrícola e alimentar**, v.58, n.9, p.5427-5431, 2010.

AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Defesa de Direito Difuso do Consumidor pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo.

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE UHT EM DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

Ana Carolina Martinez de Oliveira¹, Eduarda Pereira Santana¹, Priscila Pereira do Nascimento Batista Cassimiro¹, Antônio dos Santos Neto², Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro¹, Valéria Quintana Cavicchioli¹, Francine Oliveira Souza Duarte¹, Moacir Evandro Lage¹

¹Centro de Pesquisa em Alimentos Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. ² Agência Goiana de Defesa Agropecuária

INTRODUÇÃO

Leites processados termicamente resultam em um produto de maior vida útil, principalmente se armazenados adequadamente, garantindo a hermeticidade da embalagem e proteção apropriada contra contaminação, de acordo com a Instrução Normativa nº 62, de 16 de junho de 2020. Todavia, desde seu processamento, até sua estocagem, podem ocorrer alterações físico-químicas que inviabilizam o consumo do produto.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite foram coletadas de uma marca comercial, em um laticínio sob inspeção estadual (SIE). Foram coletadas em casualidade seis lotes amostrais de leite cru e seis lotes amostrais de leite ultrapasteurizado (145°C /2-4s). As características físico-químicas dos lotes foram analisadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 e armazenados sob refrigeração a 4°C. As análises físico-químicas realizadas foram de determinação de lipídios totais, determinação de lactose, determinação de caseína, determinação de proteína, extrato seco total e extrato seco desengordurado, umidade e cinzas. Também passaram por análises de densidade relativa 15/15°C g/mL, pH a 25°C, crioscopia (°C), fosfatase e peroxidase em ambas as amostras, feitas no Laboratório de Físico-Química (CPA/EVZ/UFG).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos (Tabela 1) mostram que todas as amostras foram negativas para fosfatase alcalina, o que indica completa ultrapasteurização e condições adequadas. Além disso, as análises para peroxidase também foram positivas para leite cru e não detectável para as amostras processadas termicamente, o que caracteriza que o tratamento térmico ocorreu dentro dos padrões corretos de temperatura. Se a peroxidase resultasse positiva significaria que houve falha no tratamento térmico, uma vez que a fosfatase e a peroxidase devem estar ausentes no leite UHT. Rodrigues e Souza (2018) analisaram leite UHT no Distrito Federal e também encontraram resultado negativo para todas as 30 amostras analisadas.

Houve leve alteração de acidez do leite cru e ao longo de sua vida útil. Essa diminuição no pH pode ser atribuída ao aumento da produção de ácido láctico a partir das bactérias que crescem continuamente durante o armazenamento ou em decorrência atividade enzimática (lipases) que depreciam a qualidade do leite. Alterações semelhantes foram observadas em Neves et. al. (2021). Apesar das modificações, acidez e pH seguem dentro dos padrões, pois segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, a acidez do leite UHT deve estar entre 0,14 (quatorze centésimos) e 0,18 (dezoito centésimos) expressa em gramas de ácido láctico/100mL.

Tabela 1 - Análises físico-químicas dos leites cru e ultrapasteurizado (média \pm dp n= 6).

Composição	Cru	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Dia 120
------------	-----	-------	--------	--------	--------	---------

Gordura (g/100g leite)	4.12±0.10 ^a	3.12±0.02 ^b	3.13±0.04 ^b	3.11±0.02 ^b	3.13±0.04 ^b	3.01±0.02 ^c
Proteína (g/100g leite)	3.10±0.04 ^a	3.11±0.05 ^a	3.14±0.05 ^a	3.13±0.05 ^a	3.14±0.04 ^a	3.13±0.03 ^a
Lactose (g/100g leite)	4.58±0.13 ^a	4.50±0.06 ^a	4.46±0.09 ^b	4.51±0.08 ^a	4.45±0.03 ^b	4.43±0.04 ^b
Caseína (g/100g leite)	2.66±0.02 ^a	2.68±0.16 ^a	2.63±0.13 ^a	2.55±0.03 ^b	2.54±0.03 ^b	2.54±0.02 ^b
Umidade (g/100g leite)	88.06 ±0.23 ^b	88.6 ±0.08 ^a	88.68 ±0.14 ^a	88.62 ±0.19 ^a	88.51 ±0.10 ^a	88.62 ±0.07 ^a
Cinzas (g/100g leite)	0.729 ±0.05 ^b	0.773 ±0.03 ^b	0.774 ±0.01 ^b	0.777 ±0.05 ^b	0.806 ±0.04 ^a	0.827 ±0.04 ^a
EST (g/100g leite)	12.04 ±0.15 ^a	11.66 ±0.21 ^a	11.70 ±0.22 ^a	11.63 ±0.15 ^a	11.72 ±0.19 ^a	11.45 ±0.14 ^b
ESD (g/100g leite)	7.93±0.41 ^b	8.31±0.13 ^b	8.49±0.15 ^b	8.66±0.16 ^a	8.73±0.10 ^a	8.65±0.21 ^a
Densidade (15/15°C g/mL)	0.1031 ±0.00 ^b	0.1032 ±0.00 ^a	0.1032 ±0.00 ^a	0.1032 ±0.00 ^a	0.1032 ±0.00 ^a	0.1032 ±0.00 ^a
Crioscopia (°C)	-532.3 ±3.92 ^c	-536.3 ±2.41 ^a	-536.7 ±3.78 ^a	-535.3 ±2.72 ^b	-537.2 ±1.87 ^a	-537.5 ±2.00 ^a
pH	6.78±0.05 ^b	6.92±0.04 ^a	6.88±0.03 ^a	6.88±0.02 ^a	6.88±0.02 ^a	6.87±0.02 ^a
Acidez (g ácido láctico/100 mL)	0.146 ±0.00 ^a	0.145 ±0.00 ^a	0.144 ±0.00 ^b	0.144 ±0.00 ^b	0.144 ±0.00 ^b	0.142 ±0.00 ^b

*As médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.

A umidade do leite também sofreu alterações proporcionais devido à padronização da gordura, apresentando-se mais elevada em comparação ao leite cru.

Houve também uma mudança nos teores de caseína após 30 dias de armazenamento, provavelmente, ocasionada pela sua degradação por proteases bacterianas e leucocitárias.

Apesar das alterações, todas as amostras apresentaram-se dentro dos parâmetros físico-químicos estabelecidos pela legislação.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram observadas alterações nos índices de caseína e acidez, devido, provavelmente, a ação enzimática (lipases e proteases), aumento da umidade e consequente diminuição do extrato seco, principalmente, devido a padronização da gordura. Os dados obtidos permitem concluir que o processamento de ultrapasteurização não influenciou física ou quimicamente as amostras, havendo apenas alterações mínimas de composição ocasionadas pelos períodos de armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Neves, Ariane Corrêa Das; Moreira, Paula Isabelle Oliveira; Ribeiro, Laryssa Freitas. Avaliação físico-química de diferentes marcas de leite ultra high temperature (UHT). Revista GeTeC, v. 10, n. 26, 2021.
- Rodrigues, N.O.; Souza, S. M. O. Detecção de adulterações, conservantes e reconstituintes de densidade no leite UHT da região do Distrito Federal por meio de provas oficiais. Anais do 13o Simpósio de TCC e 6o seminário de IC da Faculdade ICESP. 2018 (13); 2425-2435.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal/Ministério da Agricultura, Pecuária

e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 2017; 140 p. ISBN 978-85-7991-111-8.

AOAC International. Métodos oficiais de análise. AOAC International , Gaithersburg, MD. 2012;19.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) vinculado à Escola de Veterinária e Zootecnia e à Universidade Federal de Goiás.

AVALIAÇÃO DE INDICADORES DE OXIDAÇÃO EM LEITE UHT EM DIFERENTES PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO

Eduarda Pereira Santana¹, Ana Carolina Martinez de Oliveira¹, Priscila Pereira do Nascimento Batista Cassimiro¹, Antônio dos Santos Neto², Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro¹, Valéria Quintana Cavicchioli¹, Francine Oliveira Souza Duarte¹, Moacir Evandro Lage¹

¹Centro de Pesquisa em Alimentos, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. ²Agência Goiana de Defesa Agropecuária

INTRODUÇÃO

O leite UHT é considerado um dos produtos mais completos do ponto de vista biológico. É prático, seguro, de fácil armazenamento e boa durabilidade, também chamada de tempo de prateleira.

O que garante o considerável tempo de armazenamento seguro desse produto é o seu método de processamento. O leite UHT (Ultra High Temperature, ou longa vida) é condicionado a um tratamento térmico e envazado de maneira asséptica em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. Essa tecnologia garante um produto estéril e seguro. Entretanto, o processamento térmico por qual passa esse produto pode provocar alterações indesejáveis como o fenômeno da oxidação. Essa consequência é preocupante para as indústrias, pois é um conjunto de reações químicas responsáveis por diversas alterações no produto como sabor e odor desfavoráveis, diminuição do valor nutricional e segurança do alimento, culminando num menor tempo de prateleira. O processo oxidativo pode estar ligado ao processo tecnológico ou ao tempo de armazenamento do produto e depende de inúmeros fatores como: quantidade e tipo de ácido graxo e proteína, umidade, presença de agentes pró-oxidantes e antioxidantes. As modificações promovidas no leite são responsáveis por diversas alterações físicas e químicas.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações oxidativas provocadas em leite cru e UHT de mesma origem. Foi considerado o método de processamento adotado, embalagem utilizada e diferentes tempos de armazenamento. A finalidade foi verificar a qualidade físico-química, tendo como base os processos oxidativos, no intuito de possibilitar maiores tempos de prateleira para os produtos.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Foram utilizadas, de uma mesma marca comercial de leite UHT, duas amostras de cada estágio do processamento e estocagem, sendo coletadas, armazenadas e analisadas nos intervalos de tempo de 0, 30, 60, 90 e 120 dias, bem como duas amostras de leite cru de origem.

Foram realizadas análises microbiológicas de rotina, para garantir que o leite amostrado estivesse em condições de higiene preconizadas para consumo.

Para análises de oxidação foram determinadas as Carbonilas em um procedimento realizado em duas fases diferentes: (I) conteúdo de carbonila e (II) quantificação de proteína, e a absorbância da solução final, que foi mensurada a 370 nm. A concentração de carbonila é calculada usando coeficiente de extinção de 21,0 mM cm⁻¹ e a concentração de proteína das amostras (determinada a 280 nm), sendo expressa em nmol carbonila/mg proteína. Também foi realizado a determinação de Thiol (Sulfidrilas), mensurada a 420 nm com espectrofotômetro. O conteúdo de sulfidrilas foi calculado usando um coeficiente de extinção molar de 13600 M⁻¹ cm⁻¹ e os resultados expressos em nmol de sulfidrilas/g de amostra. Além disso quantificou-se a concentração de TBARs, processando com ácido tricloroacético e etanol, e o filtrado obtido adicionado de solução de ácido tiobarbitúrico. Se determinou a densidade óptica em 532 nm em

espectrofotômetro, usando água destilada como referência, sendo os resultados expressos em nmol MDA/ml de amostra de leite.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, sendo os ensaios realizados em triplicatas e com seis repetições. Os resultados foram expressos com as médias e erro-padrão. Foi realizada uma análise variância (ANOVA) e um pós-teste, Scott-Knott, para comparar as médias. Para cálculos estatísticos utilizou-se o software R Studio.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas estavam de acordo com a legislação vigente (IN76/2018; IN 77/2018), portanto considerou-se que não influenciaram em alterações oxidativas das amostras.

Os resultados das análises oxidativas podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados das análises oxidativas de amostras de leite cru e UHT.

Tratamentos (armazenamento em dias)	Análises		
	TBARS (nmol MDA/mL)	Carbonila (nmol/mg)	Sulfidrina (nmol/mg)
Cru	0,097±0,028	2,032±0,187	20,395±2,444 ^c
0	0,107±0,028	1,572±0,187	51,520±2,444 ^a
30	0,135±0,028	1,597±0,187	38,199±2,444 ^b
60	0,127±0,028	1,658±0,187	34,841±2,444 ^b
90	0,142±0,028	2,013±0,187	34,882±2,444 ^b
120	0,125±0,028	2,123±0,187	30,132±2,444 ^b

Segundo a literatura, somente concentrações maiores que 2 nmol/L em quantificação de TBARS geram alterações no leite, como sabor rançoso, o que não ocorreu nas amostras testadas. Com isso conclui-se que não houve oxidação lipídica significativa, provavelmente pelo processamento UHT que diminui algumas lipases e proteases e anula micro-organismos responsáveis pela oxidação dos compostos lipídicos do leite.

No que diz respeito a oxidação proteica, índices acima de 2 nmol/mg de carbonila indicam processo oxidativo, o que não foi observado no estudo, bem como não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Tal fato indica que o tratamento e a embalagem são capazes de suspender reações químicas de proteólises que promovem a oxidação do produto.

Ademais, os compostos sulfidrílicos são responsáveis pelo sabor cozido do leite, possuindo relação direta com aparecimento de compostos sulfurosos voláteis. No presente estudo observou-se que os valores foram maiores no leite processado em comparação ao cru, com um decréscimo entre os dias 0 e 30 de armazenamento (tabela 1). Esse padrão, segundo literatura, deve-se ao aquecimento térmico e pode estar ligado tanto a oxidação do produto quanto reações não enzimáticas de desnaturação proteica, que tem decréscimo em valores de acordo com o avançar da estocagem do leite.

Em geral, observa-se que o processamento térmico freia algumas reações químicas ao passo que contribui para outras. As reações de oxidação lipídica e carbonilação são significativamente ($p < 0,05$) diminuídas, o que tem grande contribuição do ambiente proporcionado pelas embalagens hermeticamente fechadas. Ao passo que

as reações com compostos sulfidrílicos tem relação direta com o processamento térmico.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tecnologia de processamento UHT se mostrou eficiente, pois no período de 120 dias, proposto pela legislação como tempo de validade para esse produto, não houve significativo teor de oxidação lipídica e desenvolvimento de compostos carbonílicos. Lembrando que esses produtos foram armazenados em condição de temperatura adequada assim como orientado pelas indústrias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Centro de Pesquisa em Alimentos vinculado à Escola de Veterinária e Zootecnia e à Universidade Federal de Goiás.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Neves, Ariane et al. Avaliação Físico-Química de Diferentes Marcas de Leite Ultra High Temperature (UHT). **GETEC**, [S. l.], p. 119-125, 2021.
- Li YH, Wang WJ, Zhang F, Shao ZP, Guo L. Formation of the oxidized flavor compounds at different heat treatment and changes in the oxidation stability of milk. **Food Sci Nutr**. 2019;07(01):238–46.
- Zhu H, Poojary MM, Andersen ML, Lund MN, Lund MN. Trapping of Carbonyl Compounds by Epicatechin: Reaction Kinetics and Identification of Epicatechin Adducts in Stored UHT Milk. **J Agric Food Chem**. 2020;68(29):7718–26.

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE BOVINO

Rosângela Silveira Barbosa¹, Maira Balbinotti Zanela¹, Rosane Lopes Crizel², Giovana Paula Zandoná², Denise Prates², Amanda Alfonso Lemos², Fabiano Barreto³, Marcelo Bonnet Alvarenga¹

¹Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. ²Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial do CNPq, Programa Leite Seguro, Laboratório de Qualidade do Leite, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brasil. ³Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/RS/MAPA), Porto Alegre, Brasil

INTRODUÇÃO

O leite é um dos principais alimentos consumidos pela população brasileira sendo um importante componente nutricional, principalmente no grupo de crianças e idosos. Quando consumido, o leite fornece vários nutrientes (proteínas, gorduras, carboidratos e minerais) essenciais à dieta (Marangoni et al., 2018).

A demanda por produtos de origem animal com elevada qualidade é cada vez maior, tornando-se necessário a aplicação de medidas para garantir a inocuidade, idoneidade e certificação da qualidade de produtos de origem animal. Nesse contexto, o Programa Nacional de Qualidade do Leite (PNQL), tem o intuito de promover a melhoria da qualidade do leite no país, e consequentemente aumentar a competitividade do leite e seus produtos. A legislação determina um Limite Máximo de Resíduos (LMR) que é a concentração máxima de resíduos resultante da utilização de um medicamento veterinário que se pode aceitar (Brasil, 2019).

Vários são os fatores que podem provocar alterações na qualidade do leite, dentre eles, a utilização de medicamentos. O monitoramento da aplicação de antibióticos é de grande importância, visto que a resistência a antimicrobianos é atualmente considerada um dos maiores problemas para a saúde pública global.

Dentre os princípios ativos empregados para tratamento de caso de mastite, encontram-se a penicilina (cloxacilina benzatínica) e a cefalosporina (cefoperazone).

Assim, o objetivo do trabalho consistiu em avaliar a eliminação de resíduo dos de penicilina e cefalosporina sódica em vacas da raça Jersey em fase final de lactação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado pelo Programa Leite Seguro, em 2020, no rebanho experimental do Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL). Em etapa prévia, foram selecionadas duas vacas da raça Jersey em fase final de lactação. As vacas apresentavam produção de leite média de 12 L/dia, 280 dias de lactação, 2,5 partos.

No animal A foi aplicada penicilina (cloxacilina benzatínica) indicada para vaca seca e não recomendada para vacas em lactação e no animal B foi feita aplicação com cefalosporina (cefoperazona sódica), indicado para vacas em lactação com período de carência de 84 horas. Ambos os tratamentos foram administrados por via intramamária, em aplicação única. As amostras foram coletadas após a ordenha da manhã. Foram coletados 50 mL de leite dos animais antes do tratamento (tempo zero), e durante o tratamento, com coletor acoplado à ordenhadeira. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em frascos sem conservante e refrigeradas até pesquisa de resíduo de antibiótico, utilizando os kits comerciais Blue-Yellow (teste imunológico), Devoltest (teste microbiológico) e teste Charm® ED (teste imunológico) Foram coletadas amostras até obtenção de resultados negativos para resíduo de antibiótico por dois dias consecutivos.

A quantificação de cloxacilina e cefoperazona foi realizada de acordo com o método descrito por Jank et al (2015), usando cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massa (LC-MS). O método foi validado de acordo com a diretiva 657/CE/2002 para análise quantitativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos do experimento onde foi utilizado antibiótico cloxacilina observou-se que as amostras dos dias 1 e 2 apresentaram resultado positivo para o teste Charm® ED. As demais coletas apresentaram resultados negativos para os 3 testes lentos avaliados (Tabela 1).

Esses resultados foram confirmados por LC-MS onde se observou a presença de cloxacilina nos dias de coleta 1 e 2. O LMR para a Cloxacilina é de 30 µg/L. Assim, apenas o valor quantificado no dia 1 encontra-se acima do LMR, no entanto observe-se resultado positivo no kit também no dia 2. A partir do dia 3 o leite apresentou resultados negativo nos testes avaliados apesar do medicamento não ser indicado para vacas e lactação.

Tabela 1 - Detecção de antimicrobianos utilizando os testes Blue-Yellow e Delvotest e quantificação por LC-MS de cloxacilina e penicilina G em leite bovino.

Dias de Aplicação/coleta	de Blue-Yellow/ Delvotest	Charm® ED	Cloxacilina (µg/L)
D0		Negativo	<LQ
D1		Positivo	1983,97
D2		Positivo	10,22
D3		Negativo	
D4	Negativo		<LQ
D5	Negativo		

A Tabela 2 apresenta os resultados do experimento realizado com medicamento cefoperazona sódica, onde se observa resultado positivos nos testes lentos para os dias 1, 2 e 3 (D1, D2 e D3). Esse resultado foi confirmado pela quantificação do composto cefoperazona sódica. No entanto, o LMR Cefoperazona sódica é de 50 µg/L, indicando que apenas a amostra do dia 1 (D1) encontra-se fora do limite máximo permitido.

Segundo Tasci et al. (2021), os testes de triagem de inibição imunológica e microbiana apresentam detecção de resultado positivo com quantidades de antibióticos abaixo dos limites de segurança estabelecidos pela legislação. No estudo verificou-se resultado negativo após o período de carência do medicamento, conforme o esperado.

Tabela 2 - Detecção de antimicrobianos utilizando os testes Blue-Yellow e Delvotest e quantificação por LC-MS de cefoperazona em leite bovino.

Descrição da amostra	Blue-Yellow	Delvotest	Cefoperazona (µg/L)
D0	Negativo	Negativo	<LQ
D1	Positivo	Positivo	7480,64
D2	Positivo	Positivo	41,07
D3	Positivo	Positivo	13,14
D4	Negativo	Negativo	<LQ
D5	Negativo	Negativo	

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cloxacilina utilizada no estudo apresentou resultados negativos nos testes avaliados apesar do medicamento não ser indicado para vacas em lactação. A Cefoperazona apresentou resultado negativo após o período de carência do medicamento, conforme o esperado. O Programa Leite Seguro realizará estudo com um maior número de animais para avaliar a curva de eliminação dos resíduos destes antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil, Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 51, DE 19 DE DEZEMBRO DE 2019.**

Commission Decision 2002/657/EC. The Commission of the European Communities. 2002; p 29.

Marangoni, F., et al. Cow's Milk Consumption and Health: A Health Professional's Guide. **Journal of the American College of Nutrition**, v.38, n.3, 2018.

Jank L. et al. High-throughput method for the determination of residues of β -lactam antibiotics in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants**, v.32, n. 12, 2015.

Tasci, F. et al. Determination of antibiotics and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. **Food Control**, v.127, 2021.

AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Defesa de Direito Difuso do Consumidor pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo.

IMPACTO DAS CÉLULAS SOMÁTICAS DO LEITE NA REDUÇÃO DOS TEORES DE SÓLIDOS NÃO GORDUROSOS NA REGIÃO NORTE DO RIO GRANDE DO SUL

Jéssica Aneris Folchini¹, Carlos Bondan², Renato Serena Fontaneli³, Manuele Zeni¹, Diógenes Cecchin Silveira

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo. ²Professor do Departamento de Agronomia da Universidade de Passo Fundo. ³Pesquisador na Embrapa Trigo

INTRODUÇÃO

As células somáticas são células de defesa produzidas naturalmente pelo animal e são secretadas no leite durante o curso normal da ordenha; são compostas pelas células inflamatórias e células de descamação do epitélio mamário (Alhussien, Dang, 2018; Ebrahimie et al., 2018). A concentração da lactose está ligada à integridade do epitélio mamário e, dessa maneira, à sanidade do úbere (Costa et al., 2019). Esse teor depende da contagem de células somáticas e número de lactações, e varia de acordo com as estações do ano (Alessio et al., 2016). Na região norte do Rio Grande do Sul, a produção e a composição do leite oscilam em determinadas épocas do ano influenciadas por fatores intrínsecos ao animal, ao manejo, à nutrição e às mudanças ambientais. A variação dos componentes lácteos faz com que em determinadas épocas do ano os teores de sólidos não gordurosos (SNG) se encontrem abaixo dos valores estabelecidos pela Instrução Normativa 76 (IN 76) de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece um limite máximo de 500.000 céls/mL para CCS e de mínimo de 4,3% para a lactose. O objetivo desse estudo foi observar o impacto das células somáticas (CCS) na redução dos teores dos sólidos não gordurosos do leite produzido na região norte do Rio Grande do sul.

MATERIAL E METODOS

A presente pesquisa foi motivada pelo problema identificado pelas indústrias processadoras e encomendado pelo Sindicato de Indústrias Leiteiras do Rio Grande do Sul (SINDILAT/RS). As análises foram realizadas no laboratório de Serviços de Análises de Rebanhos Leiteiros (SARLE), da Universidade de Passo Fundo (UPF) que faz parte da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), órgão credenciado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Foram analisados 1.281.234 registros obtidos de amostras de leite cru refrigerado coletadas em tanque de expansão e enviadas para análise no SARLE no período de 1 de janeiro de 2014 a 31 de dezembro de 2018. Esta análise da composição do leite é feita com a tecnologia do infravermelho proximal Transformada de Fourier (FTIR) utilizando Equipamentos com Sistema Delta. Os dados foram submetidos a análises descritivas para estimar a probabilidade de ocorrência dos fenômenos em estudo em relação às variáveis dependentes destes fenômenos, em função das variáveis explicativas inseridas nos respectivos modelos, fez-se uso da estatística descritiva. A avaliação da condição de normalidade foi realizada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e para a avaliação da homogeneidade entre as variâncias foi aplicado o teste de Levene. O nível de significância utilizado nos testes para rejeitar H₀, quando a hipótese nula for verdadeira, foi de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foram analisados médias de CCS e lactose quando as amostras de leite cru apresentaram médias com valores acima e abaixo de 8,4% separadamente. 81,7% dos resultados observados (1.021.222 análises) obtiveram valores acima de 8,4%, com média de CCS e lactose de 645,23 céls/mL e 4,41%. Conseqüentemente, 18,2% dos resultados observados (228.317 análises) apresentaram resultados fora dos padrões estipulados da IN/76 e com média de CCS e

lactose de 782,81 céls/mL e 4,2%. O aumento da CCS no leite provoca alterações maiores na composição do leite quando comparadas às mudanças na composição sanguínea do animal. A diminuição dos teores de SNG, por exemplo, pode acontecer tanto pela ocorrência de mastite subclínica como clínica e está relacionada diretamente à redução de lactose (Alessio et al., 2016). Foi possível observar que com o aumento da CCS, houve redução nos teores de lactose, apresentando médias abaixo do preconizado na legislação. A correlação entre CCS e lactose ($P < 0,001$) foi negativa e moderada em todas as estações do ano observadas, com valores de -0,36 no outono, -0,37 na primavera, -0,32 no verão e -0,40 no inverno. Para os teores de CCS, a primavera, verão e outono apresentaram maior probabilidade de os seus teores estarem iguais ou acima dos padrões estabelecidos na legislação (500.000 céls/mL), enquanto que para a lactose a maior probabilidade de estarem abaixo de 4,3% foi observado no verão e outono. A correlação negativa entre CCS e lactose sugere a causa da diminuição dos SNG principalmente no verão e outono. O efeito da contagem de células somáticas sobre a composição do leite e indicadores de higiene do leite de tanques de refrigeração é observado nos componentes químicos do leite, uma vez que rebanhos com CCS mais elevadas apresentam maiores concentrações de gordura e proteína, e, conseqüentemente, redução nos teores de SNG decorrentes da diminuição da lactose (Arruda Jr et al., 2019). Deste modo, quanto maior a CCS no tanque, maior será a variação dos sólidos não gordurosos do leite, principalmente a lactose.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com estes achados é possível atribuir como causa da diminuição dos SNG e lactose provavelmente motivadas pela CCS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alhussien, M. N; Dang, A. K. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 562-577, 2018.
- Alessio, D. R. M. et al. Multivariate analysis of lactose content in milk of Holstein and Jersey cows. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 2641-2652, 2016.
- Arruda Junior, L. C. et al. Variation in the content of defatted dry extract in cooling tanks milk samples of dairy farms. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 203-215, 2019.
- Costa, A.; et al. Invited review: Milk lactose: Current status and future challenges in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 102, n. 7, p. 5883-5898, 2019.
- Ebrahimie, E. et al. A large-scale study of indicators of sub-clinical mastitis in dairy cattle by attribute weighting analysis of milk composition features: highlighting the predictive power of lactose and electrical conductivity. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 02, p. 193–200, 2018.

INFLUENCE OF SEASON, PHYSIOLOGICAL AND RACIAL VARIABLES AND SOMATIC CELLS COUNT ON MILK PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS IN COWS IN PASTURE SYSTEMS

Roberto Kappes¹, Deise Aline Knob², Angélica Leticia Scheid¹, Gadriéli Cristina Gheno¹, Thiago Resin Niero¹, Carlos Mader³, Vagner Miranda Portes³, André Thaler Neto¹

¹ Departamento de Produção Animal e Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC-CAV). ² Justus Liebig University Giessen. ³ Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)

INTRODUCTION

Milk production in southern Brazil is mainly based on grazing systems. The quantity and quality of forage produced vary according to the season of the year, which impacts the productivity of the animals and the physicochemical quality of the milk. In addition, in pasture systems, cows are more susceptible to climatic variables, which have a direct effect on milk production, composition, and physical attributes. In periods of nutritional deficit due to poor forage quality, it is common to observe physicochemical changes in milk, such as the occurrence of unstable non-acid milk (UNAM), for example (Fischer et al., 2012)

Another variable that influences milk production and quality is somatic cell count (SCC). Reductions in milk lactose contents and increases in milk chloride concentrations are observed due to increased permeability of the tight junctions of the mammary gland (Alessio et al., 2016). Changes in the physicochemical parameters of milk are also observed in cows with higher parity and cows with higher days in milk (DIM), mainly increases in fat and protein contents in milk and reduced stability to the alcohol test (González et al. 2011).

The objective of this study was to determine the interrelation between climatic and physiological variables, breed, SCC, and the physicochemical parameters of milk in pasture based farms.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out in the West, Serra, and South regions of the State of Santa Catarina, in August and September (cold season), December 2021, and January 2022 (hot season). Information was collected from 17 dairy farms assisted by the Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina (EPAGRI). All farms used a grazing system with corn silage and concentrate supplementation. Perennial pastures of Tifton (*Cynodon* spp.), Kurumi grass (*Pennisetum purpureum* Schum), and Jiggs (*Cynodon dactylon*) were used in the summer with oat (*Avena sativa*) and ryegrass (*Lolium multiflorum*) oversown in the winter. There was natural shade on the paddocks and water *ad libitum*. The herds were composed of Holstein, Jersey, and crossbred Holstein x Jersey cows.

Daily milk yield and a composed milk sample of the morning and afternoon milking of each cow were collected. Milk composition (fat, protein, lactose, total solids, and urea) were evaluated by infrared Fourier transform spectrometry with the Dairy Spec equipment (Bentley instruments), somatic cell count (SCC) by flow cytometry, chloride levels by modified Mohr method and physical parameters of milk (stability to alcohol test, titratable acidity, and cryoscopy) were also determined. SCC data were transformed to somatic cell score (SCS) (\log_2) to obtain data normality, $SCS = \log_2 (SCC/100) + 3$. On the day of collection, information on parity, DIM, and breed were obtained. (Holstein, Jersey, and crossbred Holstein x Jersey cows).

Data were submitted to multivariate factor analysis using the PROC FACTOR procedure of the SAS statistical package. For factor analysis, nominal variables were

transformed into numerical variables; season: summer (1) and winter (2), breed: Holstein (1), crossbred (2), and Jersey (3).

RESULTS AND DISCUSSION

In the factor analysis, four factors were formed (Table 1). Factor 1 shows the positive relationship between higher parity, SCS, and chlorides, with negative relation with titratable acidity and lactose. Cows with higher parity have higher SCS, which can damage the tight junctions allowing greater passage of chlorides from blood to milk, reducing the milk's titratable acidity. In cases of high SCS, there is a reduction in lactose synthesis, or its passage from milk to blood, reducing the lactose content in milk (Alessio et al., 2016). Factor 2 shows that Jersey and crossbred Holstein x Jersey cows produce milk with higher fat and protein contents.

Table 1 - Factor loadings and communalities for energy corrected milk yield (ECM), composition, somatic cell score (SCS), and physiological milk attributes.

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Communalities
Chloride (%)	0.83418	-0.1734	0.03707	0.1904	79.2
Parity	0.8002	0.10228	0.09141	-0.3519	67.6
SCS	0.44092	0.27244	0.0242	0.20206	35.7
Titratable acidity (°D)	-0.6008	0.37899	0.07778	0.1092	52.5
Lactose (%)	-0.7411	-0.0774	0.11438	-0.2753	73.5
Fat (%)	-0.0167	0.84561	0.06204	0.01969	72.6
Breed	0.01938	0.84481	-0.313	-0.1983	76.8
Protein (%)	-0.052	0.8153	0.23705	0.2001	82
Season	0.04605	0.1505	0.83675	-0.1398	75.1
Urea (mg/dL)	0.06495	0.03315	0.71362	0.0724	50.4
Alcohol (%)	-0.252	-0.2685	0.57722	-0.0185	49.7
DIM*	0.13811	-0.0241	0.15387	0.81167	69.9
ECM	0.11125	-0.0571	0.31646	-0.7284	67.9
Variance (%)	26.4	25.5	19.1	18.5	

*DIM = days in milk

Factor 3 shows the positive relationship between season, urea, and alcohol stability. In winter, there was a higher concentration of urea in milk, possibly related to the better quality of the diet offered to cows composed mainly by oat and ryegrass pastures. Sweetsur and Muir (1981) report that the highest concentrations of urea are transformed into cyanate, reacting with the protein increasing the negative charges of the casein micelle, giving greater repulsion force and consequently greater stability of the milk. In factor 4, cows with higher DIM, in the final stage of lactation, have already passed the physiological peak of the milk production curve and at this stage produce a lower volume of ECM.

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

We conclude that cows in grazing systems with higher parity and high SCS have lower levels of lactose and titratable acidity in milk and higher concentrations of chlorides. In winter, the urea concentrations and milk stability were higher.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

Alessio, D.R.M. et al., 2016. Multivariate analysis of lactose content in milk of Holstein and Jersey cows. **Semina Agrária**. 37, 2641–2652.

Fischer, V. et al. Leite instável não ácido: Um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saude e Producao Animal**, v. 13, n. 3, p. 838–849, 2012.

González, F. D. et al., qualidade do leite bovino no trópico e subtropical. UPF editora, 2011.

Sweetsur, A.W.M. & Muir, D.D. Role of cyanate ions in the urea-induced stabilization of the caseinate complex in skim-milk. **Journal of Dairy Research**. V. 48, p. 163-166, 1981.

INFLUENCE OF THE HOT AND COLD SEASONS ON PRODUCTION, COMPOSITION, AND PHYSICAL ATTRIBUTES OF MILK IN HERDS WITH PRODUCTION BASED ON PASTURE SYSTEM

Roberto Kappes¹, Deise Aline Knob², Angélica Leticia Scheid¹, Gadriéli Cristina Gheno¹, Thiago Resin Niero¹, Carlos Mader³, Vagner Miranda Portes³, André Thaler Neto¹

¹ Departamento de Produção Animal e Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC-CAV). ² Justus Liebig University Giessen. ³ Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)

INTRODUCTION

The occurrence of heat stress in dairy herds has increased in recent years. This occurs both because of the increase in the average annual temperature and because of the genetic improvement in milk production, due to the difficulty in combining productive and adaptive traits in a single animal. High-yielding cows, due to their higher energy metabolism, are more susceptible to higher temperatures.

In cases of thermal stress by dairy cows, physiological and behavioral mechanisms are observed to reduce the generation of endogenous heat or increase the dissipation of this heat. One of the main behaviors observed is the reduction in dry matter intake, increased water intake, reduced activity, increased respiratory rate, and, in more severe cases, salivation and panting (Bernabucchi et al., 2010).

Regardless of the severity of heat stress, important reductions in milk yield, fat, protein, and lactose contents, changes in the physical parameters of milk, especially in stability to the alcohol test, and increases in somatic cell count (SCC) are observed. This can result in milk that non-compliance with milk standards for quality, which is discarded and generated penalization to the farmer and the industry.

The objective of this work was to determine the effect of the hot and cold season on milk yield, composition, stability of milk to the alcohol test, titratable acidity, and milk cryoscopy in farms with pasture based systems in Santa Catarina State.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was carried out in the West, Serra, and South regions of the State of Santa Catarina, in August and September (cold season), December 2021, and January 2022 (hot season). Information was collected from 17 dairy farms assisted by the Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina (EPAGRI). All farms used a grazing system with corn silage and concentrate supplementation. Perennial pastures of Tifton (*Cynodon* spp.), Kurumi grass (*Pennisetum purpureum* Schum), and Jiggs (*Cynodon dactylon*) were used in the summer with oat (*Avena sativa*) and ryegrass (*Lolium multiflorum*) oversown in the winter. There was natural shade on the paddocks and water ad libitum. The herds were composed of Holstein, Jersey, and crossbred Holstein x Jersey cows.

Daily milk yield and a composed milk sample of the morning and afternoon milking of each cow were collected. Milk composition (fat, protein, lactose, total solids, and urea) were evaluated by infrared Fourier transform spectrometry with the Dairy Spec equipment (Bentley instruments), somatic cell count (SCC) by flow cytometry, chloride levels by modified Mohr method and physical parameters of milk (stability to alcohol test, titratable acidity, and cryoscopy) were also determined. SCC data were transformed to somatic cell score (SCS) (\log_2) to obtain data normality, $SCS = \log_2 (SCC/100) + 3$.

Data were analyzed by ANOVA using the PROC MIXED procedure of the SAS statistical package, with $P < 0.05$ being considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Milk yield (kg/cow/day), fat, protein, lactose, and urea contents were higher in cold season compared to hot season (Table 1). These results are mainly related to the lower dry matter intake in periods of high temperatures. As a result, there is less energy available for the synthesis of milk, fat, protein, and lactose content (Bernabucci et al., 2010). Another factor that can influence the production and composition is the quality and supply of pastures, being different in the two seasons. In winter, the farms used oat + ryegrass, which have higher nutritional value, as crude protein, neutral detergent fiber, and total digestible nutrients.

Table 1 - Mean \pm standard error of the mean for milk production and composition variables, somatic cell score (SCS), and physical attributes of milk in the cold and hot seasons.

	Season		P-value*
	Cold	Hot	
Observation number	400	496	-
Milk Kg/cow/day	23.1 \pm 0.6a	20.2 \pm 0.6b	<0.0001
Fat (%)	4.0 \pm 0.07a	3.7 \pm 0.07b	<0.0001
Protein (%)	3.46 \pm 0.03a	3.24 \pm 0.03b	<0.0001
Fat + protein kg/cow/day	1.67 \pm 0.04a	1.39 \pm 0.03b	<0.0001
Lactose (%)	4.43 \pm 0.02a	4.34 \pm 0.02b	<0.0001
Total solids (%)	12.8 \pm 0.10a	12.3 \pm 0.09b	<0.0001
Urea (mg/dL)	17.6 \pm 0.4a	13.0 \pm 0.4b	<0.0001
SCS (log ₂)	4.0 \pm 0.1	4.0 \pm 0.1	0.9502
Chlorides (%)	0.105 \pm 0.0	0.105 \pm 0.0	0.8998
Alcohol (%)	73.7 \pm 0.7a	69.6 \pm 0.7b	<0.0001
Titrateable acidity (°D)	16.6 \pm 0.2a	16.2 \pm 0.2b	0.0027
Cryoscopy (°H)	-0.534 \pm 0a	-0.539 \pm 0b	<0.0001

Milk stability was lower in the hot season, below 72%, which is the minimum recommended by Normative Instruction 76 of the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (MAPA). In previous study, Kappes et al. (2022) observed that in periods of thermal comfort, milk stability was higher when compared to periods of thermal stress. Abreu et al. (2020) also observed that cows under heat stress had lower milk stability when compared to cows under thermal comfort. These results can be related to the lower dry matter intake in this period, or the highest milk titrateable acidity. Titrateable acidity and cryoscopy were also higher in winter, however, both variables are following MAPA IN 76.

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

Milk yield, fat, protein, lactose, urea, and milk stability to the alcohol test are negatively affected during the hot season when compared to the cold season.

The efforts of the studies should focus mainly on management strategies to reduce the negative effects of heat stress on milk production and physicochemical attributes of milk, especially in cows in grazing systems that are more exposed to climatic variables.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- Abreu, A. S. et al. Natural tree shade increases milk stability of lactating dairy cows during the summer in the subtropics. **Journal of Dairy Research**, v. 87, n. 4, p. 444–447, 2020.
- Bernabucci, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1167–1183, 2010.

Kappes, R. et al. Rumination time, activity index, and productive performance of Holstein and crossbred Holstein x jersey cows exposed to different temperature-humidity indexes. **International Journal of Biometeorology**, v. 66, n. 4, p. 791–801, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00484-021-02237-3>>.

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO DA SILAGEM DE COLOSTRO BOVINO NA COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Rosana Basso Kraus¹, Pedro Rassier dos Santos¹, Marília Pollnow Bonini², Diane Leston Rodrigues², Giniani Carla Dors³, Patrícia da Silva Nascente⁴

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas. ²Mestranda Profissional do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas. ³Professora do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas. ⁴Professora do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas

INTRODUÇÃO

O colostro bovino é o primeiro alimento fornecido aos animais recém-nascidos, sendo essencial o consumo nas primeiras horas de vida para transferência de imunidade. Sua composição físico-química é alterada no decorrer do tempo, após o parto (Marnila e Korhonen, 2011), além do volume produzido ser superior ao consumido pelo bezerro, acarretando no descarte do excedente (Ferreira et al., 2013a).

Uma alternativa para evitar o desperdício e permitir a conservação do colostro é a utilização de processo fermentativo anaeróbico, denominado silagem. A fermentação ocorre em garrafas plásticas de 500 mL, em temperatura ambiente, pelo período mínimo de 21 dias e pode ser armazenada por até dois anos, não havendo necessidade de congelamento, refrigeração ou uso de aditivos (Saalfeld et al., 2013).

Além de ser um procedimento simples e de fácil aplicabilidade aos produtores de leite, estudos têm demonstrado que a silagem proporciona ganho de peso e auxilia na transferência de imunidade aos animais (Ferreira et al., 2013b; Saalfeld et al., 2014). O objetivo deste trabalho foi determinar e comparar a composição físico-química de quatro amostras de colostro e suas respectivas silagens.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de colostro bovino (n=4) foram coletadas de animais da raça Jersey em uma propriedade localizada na cidade de Pelotas, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Parte do colostro foi utilizado para a elaboração da silagem e o restante foi armazenado em garrafas plásticas de 500 mL e congelado.

A silagem de colostro (n=4) foi elaborada a partir do colostro em garrafas plásticas de 500 mL fechadas anaerobicamente. As amostras foram armazenadas verticalmente em temperatura ambiente, sem incidência do sol, mas com acesso a 12 h claro/escuro por 67, 200, 262 e 306 dias, (silagens D, A, B e C, respectivamente). Após decorrido o tempo, as garrafas foram abertas, homogeneizadas em blender durante 30 s e congeladas até a realização das análises.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: acidez em ácido láctico (n.º 426/IV), sólidos totais (n.º 429/IV), cinzas (n.º 437/IV) e proteína (n.º 037/IV), de acordo com as metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). As análises foram realizadas em triplicata e calculadas em percentual (m/v).

A análise estatística foi realizada no software BioEstat e no ambiente R, com nível de significância de 95% (P<0,05), utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados da composição do colostro e da silagem de colostro. Comparando o colostro A com a silagem A, os teores de cinzas (P=1,00), proteínas (P=0,12), acidez (P=0,07) e sólidos totais (P=0,07), não apresentaram diferença significativa. O colostro B quando comparado com a silagem B teve diferença significativa para os teores de cinzas (P=0,04), proteína (P=0,04) e acidez (P=0,04). O

colostro C e a silagem C apresentaram diferença significativa para os teores de proteína ($P=0,05$), acidez ($P=0,05$) e sólidos totais ($P=0,05$). E o colostro D e a respectiva silagem todos os parâmetros foram significativos ($P=0,05$).

Tabela 1 – Composição físico-química do colostro e silagem de colostro bovino.

Amostras	Cinzas (%)*	Proteínas (%)*	Acidez (%)*	Sólidos totais (%)*
Colostro A	0,9±0,00	5,5±0,03	0,3±0,01	12,3±0,10
**Silagem A	0,9±0,02	12,3±0,63	5,3±0,08	17,4±0,00
Colostro B	0,9±0,07	5,3±0,48	0,2±0,03	13,9±1,00
Silagem B	0,8±0,04	3,8±0,09	3,2±0,07	9,5±0,00***
Colostro C	0,9±0,03	15,7±0,09	0,2±0,03	20,1±0,81
Silagem C	0,9±0,02	11,1±0,18	2,8±0,03	14,5±0,41
Colostro D	1,1±0,01	13,6±0,50	0,4±0,01	21,6±0,32
Silagem D	0,9±0,06	10,7±0,50	1,7±0,06	19,4±0,55

*média ± desvio padrão. **todas as análises foram realizadas em duplicata. ***amostra sem repetição (triplicata).

Ao avaliar a influência do tempo de fermentação na composição observou-se que o teor de cinzas e sólidos totais não apresentaram diferença significativa ($P=0,10$; $P=0,06$). O teor de proteína da silagem B foi significativamente ($P=0,03$) menor, quando comparado com a silagem A. A silagem D obteve acidez significativamente ($P=0,03$) menor em relação a silagem A, e isso pode estar relacionado ao menor tempo de fermentação da silagem D.

Analisando os colostros, pode-se observar que a concentração de proteína do colostro C foi significativamente ($P=0,03$) maior que o colostro B e que o teor de sólidos totais do colostro D foi significativamente ($P=0,01$) maior do que o colostro A, enquanto as análises de cinzas ($P=0,07$) e acidez ($P=0,07$) não foram significativas. Essas diferenças na composição do colostro podem estar relacionadas a idade do animal, número de partos e a raça dos animais (PUPPEL et al., 2019).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição do colostro sofre variações em virtude da raça dos animais, idade, número de partos, alimentação entre outros. A composição da silagem depende das características iniciais do colostro e do tempo de fermentação. A silagem mesmo com diferentes tempos de fermentação, manteve as características da composição físico-química do colostro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferreira, L. S.; Silva, T. S.; Paula, M. R.; Soares, M. C.; Bittar, C. M. Colostrum silage: fermentative, microbiological and nutritional dynamics of colostrum fermented under anaerobic conditions at diferente temperatures. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 35, n. 4, p. 395-401, 2013a.
- Marnila, P.; Korhonen, H. **Colostrum**. Encyclopedia of Dairy Sciences. 2 ed, p. 591-597, 2011.
- Saalfeld, M. H.; Pereira, D. I. B.; Silveira, K. R. K.; Schramm, R.; Valente, J. S. S.; Borchardt, J. L.; Gulate, M. A.; Leite, F. P. L. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1636-1641, 2013.

INTERFERÊNCIA DO PH, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E CONDIÇÕES DE ESTOCAGEM NO TESTE DE TRIAGEM DE RESÍDUOS DE INIBIDORES MICROBIANOS EM LEITE CRU

Katheryn Merz¹, Lucyana Vieira Costa¹, Natylane Eufansino Freitas¹, Francine Oliveira Souza Duarte¹, Cíntia Minafra¹, Valéria Quintana Cavicchioli¹, Clarice Gebara¹

¹Laboratório de Inovação e Pesquisa, Centro de Pesquisa em Alimentos, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

INTRODUÇÃO

A qualidade e inocuidade do leite e seus derivados têm sido alvo de grande atenção da população, que têm buscado produtos seguros, sustentáveis e livres de contaminantes. Dentre os parâmetros de qualidade do leite, a presença de resíduos de medicamentos de uso veterinário é de especial interesse, considerando o risco à saúde pública e os potenciais prejuízos à cadeia de produtos lácteos.

O uso indiscriminado de algumas substâncias na bovinocultura leiteira, particularmente os antibióticos, sem orientação profissional, sem conhecimento de suas especificidades, desrespeitando os períodos de carência determinados pelo fabricante e observações contidas na bula, podem levar à presença de resíduos tanto na matéria-prima, quanto nos produtos lácteos. A longo prazo, a ingestão destes resíduos pode provocar reações alérgicas, hipersensibilidade, choque anafilático, desequilíbrio da microbiota intestinal, além de favorecer os mecanismos de resistência bacteriana (Sachi et al., 2019).

Considerando a importância de assegurar que o leite cru refrigerado produzido no Brasil não contenha resíduos de antibióticos, é estabelecido em legislação a obrigatoriedade do controle diário deste perigo químico nas plataformas de recepção (BRASIL, 2017; BRASIL, 2018a, BRASIL 2018b). Usualmente, os testes utilizados para esta finalidade baseiam-se na inibição de culturas de micro-organismos específicos, sendo necessária a avaliação de fatores interferentes que possam influenciar nos resultados destes testes. Deste modo, o presente trabalho objetivou avaliar a influência do pH, Contagem de Células Somáticas (CCS) e condições de armazenamento do leite cru no teste de triagem de resíduos de antibióticos do kit comercial Delvotest T®.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite cru foram obtidas na Fazenda Escola, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG). O leite proveniente do tanque foi coletado após a ordenha completa de todos os animais do rebanho, já homogeneizado e refrigerado, enquanto o leite individual dos animais mastíticos foi coletado de forma manual, coado e refrigerado.

As amostras de leite foram adicionadas de 200 pb de oxitetraciclina e divididas em três grupos para avaliação dos fatores: CCS, pH e condições de armazenamento. Para isso, amostras com alta CCS foram coletadas individualmente de vacas com mastite, fora do período de tratamento e/ou carência do medicamento, com CCS acima de 1.000.000 células/ mL. Para avaliação do efeito do pH, as amostras de leite adicionadas de antibiótico permaneceram em temperatura ambiente (22°C ± 2°C) para acidificação, obtendo-se valores entre 5,2 a 7,1. Por fim, para avaliação das condições de estocagem, as amostras foram submetidas à refrigeração em câmara fria (4°C ± 1°C) por 4 dias e congelamento (-15°C ± 2°C) por 10 dias. Paralelamente, foram preparados controles negativos e positivos, consistindo respectivamente de leite em pó reconstituído, e leite cru adicionado de 200 ppb de oxitetraciclina.

Alíquotas de 0,1 mL das amostras foram submetidas à detecção de resíduos de inibidores microbianos com o teste comercial Delvotest T, incubadas em banhomaria a 64°C (± 2°C) por 3h 15min. Todas as amostras foram avaliadas em duas repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 - Detecção de resíduos de inibidores microbianos em leite cru adicionado de oxitetraciclina 200 ppb, utilizando Delvotest T®, em amostras armazenadas sob refrigeração (4°C±1°C).

Fatores de interferência	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
Amostra 1	-	--	--	--
Controle negativo*	-			
Amostra 2				
Amostra 1	+	+	+	+
Controle positivo*	+	+	+	+
Amostra 2				
Amostra 1	+	+	+	+
CCS**	+	+	+	+
Amostra 2				

**CCS - 461.000 (célus./mL) ** CCS - 2.944.000 (célus./mL)

Tabela 2 - Detecção de resíduos de inibidores microbianos em leite cru adicionado de oxitetraciclina 200 ppb, utilizando Delvotest T®, em amostras submetidas ao congelamento.

Fatores de interferência	Dia 01	Dia 02	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07	Dia 08	Dia 09	Dia 10
Amostra 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle negativo*										
Amostra 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amostra 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle positivo*										
Amostra 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amostra 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CCS**										
Amostra 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**CCS - 461.000 (célus./mL) ** CCS - 2.944.000 (célus./mL)

A acidez das amostras, por outro lado, interferiu no teste, uma vez que em condições de pH entre 5,2 a 5,5, constataram-se resultados falso-negativos (Tabela 3).

Tabela 3 - Detecção de resíduos de inibidores microbianos em leite cru adicionado de oxitetraciclina 200 ppb, utilizando Delvotest T®, em amostras com diferentes valores de pH

	pH								
	6,0	5,9	5,8	5,7	5,6	5,5	5,4	5,3	5,2
Amostras	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que o princípio analítico do Delvotest T, é baseado na mudança de coloração do indicador de pH Púrpura de bromocresol, variações específicas próximas da faixa de transição colorimétrica podem influenciar a acurácia do teste. O controle das condições das amostras utilizadas na rotina de detecção de resíduos de antibióticos, especialmente quanto ao pH torna-se fundamental para evitar erros de leitura e resultados falso-negativos na rotina de análises, que podem interferir diretamente no processamento industrial de lácteos e constituir riscos à segurança dos consumidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil, 2018a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Seção 1; Página 9.

Brasil, 2018b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 77, de 26 de novembro de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, DF. Seção 1. Página 10.

Sachi S, Ferdous J, Sikder MH, Hussani SA. Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *Journal of advanced veterinary and animal research*. 2019 Sep;6(3):315.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Centro de Pesquisa em Alimentos vinculado à Escola de Veterinária e Zootecnia e à Universidade Federal de Goiás.

OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS NO LEITE E PRODUTOS LÁCTEOS PRODUZIDOS NO BRASIL

Laura Soares Magalhães¹, Dálila Ferrão da Silva¹, David Ramiro Vales de Oliveira¹, Janaína Tavares Mendonça², Marília Cristina Sola¹

¹Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Unaí, Minas Gerais, Brasil. ²Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos, sendo considerados contaminantes naturais de difícil controle nos alimentos. Apesar de serem descritas com maior frequência em produtos de origem vegetal, estas substâncias também podem comprometer os alimentos de origem animal.

A maioria dos produtos animais podem ser contaminados a partir da ingestão das micotoxinas presentes nas rações, gerando assim um resíduo tecidual. A contaminação do leite, por exemplo, ocorre após a metabolização da toxina através de enzimas hepáticas. No fígado, a aflatoxina B1, ingerida pelo animal através de rações contaminadas, ao alcançar o fígado, sofre uma biotransformação, resultando em aflatoxina M1, que é excretada junto ao produto lácteo.

Atualmente, no Brasil, há grande oferta e demanda de produtos de origem animal. O país é um dos maiores produtores de leite do mundo, mantendo-se em sexto lugar no ranking mundial. Em 2021, a produção leiteira industrializada atingiu 25 bilhões de litros, tendo Minas Gerais como estado de destaque, produzindo 24,71% do total.

Além do leite, as micotoxinas podem ser encontradas em outros produtos de origem animal, como derivados lácteos, produtos cárneos e ovos. Desse modo, o estudo a respeito da ocorrência de micotoxinas nesses alimentos, bem como no leite e seus derivados, apresenta grande importância para a sociedade por apresentar risco à saúde humana e animal, acarretando em perdas econômicas, devido à desvalorização e descarte dos alimentos contaminados.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste estudo foi a revisão bibliográfica, realizada entre os meses de fevereiro e abril de 2021 a fim de avaliar a ocorrência de aflatoxinas no leite e produtos lácteos produzidos no Brasil.

As principais bases de dados online consultadas foram *Scientific Electronic Library Online* (<https://scielo.org/>), *Pubmed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ministério da Saúde (<http://bvsmms.saude.gov.br/>) e *Google Scholar* (<https://scholar.google.com/>) por meio da busca pelos termos “*aflatoxin bovine milk*”, “*mycotoxins present in products of animal origin*”, “*presença de aflatoxinas em produtos lácteos*”, “*aspergillus flavus*”, “*timely conditions for the production of mycotoxins*”, “*effects of mycotoxins in animals*”, “*fungi characterization*”, “*zearalenone in dairy products*”, “*ochratoxins in dairy cows*” e “*fumonisin in milk*”.

Foram analisados 16 trabalhos entre os anos de 1989 e 2018 que realizaram a quantificação de micotoxinas no leite e derivados lácteos no país.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de cromatografia foi o mais utilizado na detecção das micotoxinas nos estudos avaliados entre os anos de 1980 e 2021, com destaque à cromatografia líquida de alta eficiência. Esta metodologia apresenta alta resolução, sensibilidade e eficiência de separação.

A concentração dos metabólitos variou entre 0,009 µg/L e 1,68 µg/L para leite in natura; 0,02-4,64 µg/L em amostras de leite pasteurizado; 0-1,05 leite UHT; 0,08-1,19 µg/kg leite em pó e de 0,06-6,6 µg/kg em queijos.

Dos treze estudos que avaliaram diferentes tipos de leite, como in natura, pasteurizado, em pó e UHT, cinco ultrapassaram a concentração máxima permitida de aflatoxina M1 conforme estabelecido pela legislação brasileira (0,5µg/L) (BRASIL, 2021), sendo os estudos realizados por Sabino et al. (1989), Gonzalez et al. (2005), Oliveira et al. (2010), Gonçalves et al. (2016) e Gonçalves (2018), que apresentaram valores entre 0,645 µg/L e 4,64 µg/L.

Três estudos também avaliaram a presença de aflatoxina M1 em queijos, sendo que somente Prado et al. (2008) constataram valores superiores ao estabelecido pela legislação (2,5µg/kg) (BRASIL,2021), obtendo valores entre 2,7 µg/kg e 6,6 µg/kg, o que resultou em 46,4% das amostras contaminadas.

Há diferenças significativas na regulamentação de micotoxinas em nível nacional e internacional, como por exemplo a União Europeia que possui legislação mais rigorosa, apresentando um nível máximo de 0,05 µg/L para leite in natura e 0,03µg/L para leite em pó, divergindo dos parâmetros nacionais que determinam 0,5µg/L e 5µg/kg respectivamente (BRASIL, 2021).

Com base nos estudos avaliados, foi possível observar que, mesmo após o leite ter passado por processamento térmico, como a pasteurização e ultrapasteurização, esses métodos não foram eficientes na eliminação destes metabólitos, demonstrando a dificuldade em controlá-los uma vez que já estejam presentes nos alimentos, o que amplia a preocupação quanto à saúde dos consumidores.

Apesar da escassez de informações quanto à detecção de micotoxinas como a fumonisina, zearalenona e ocratoxina no leite e derivados quando comparado às aflatoxinas e da ausência de limites máximos tolerados na legislação brasileira, esses metabólitos podem impactar negativamente a saúde humana e animal, sendo necessário seu monitoramento.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da avaliação de estudos publicados no Brasil, entre os anos de 1989 e 2018, as aflatoxinas M1 estiveram presentes em amostras de leite e derivados, sendo detectadas principalmente por métodos cromatográficos, indicando a necessidade de monitoramento constante destas substâncias nos produtos de origem animal, diante da ocorrência natural e elevada toxicidade das aflatoxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brasil. Ministério da Saúde. Instrução Normativa n. 88 de 2021. **Dispõe sobre os limites máximos de tolerados de contaminantes em alimentos.**
- Gonzalez, J.F. et al. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado no estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.4, 2005.
- Gonçalves K. D. M. **Ocorrência de aflatoxinas B1 e M1 em leite em pó e UAT, consumido em Cabo Verde e região sul do Brasil.** Dissertação. FURG, 2018.
- Gonçalves, L. et al. Determinação de aflatoxina M1 em leite bovino in natura. **Anais. Gramado/RS**, 2016.
- Oliveira, M. S. **Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina M1 e sua ocorrência no leite bovino comercializado no sul do Brasil.** Dissertação. UFSM, 2010.
- Prado, G. et al. Ocorrência de aflatoxina M₁ em queijo parmesão consumido em Minas Gerais. **Ciênc. agrotec.** v.32, 2008.
- Sabino, M. et al. Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in São Paulo. **Food Additives and Contaminants**, v.6, n.3, 1989.

OCORRÊNCIA DE LINA NO LEITE DE VACAS JERSEY DO REBANHO EXPERIMENTAL DO SISPEL, DE 2011 A 2019

Maira B. Zanella¹, Rosângela S. Barbosa¹, Amanda A. Lemos², Joice S. Ramson², Marta E.B. Oyarzabal², Micheli B. Wachholz², Alcio A. Azambuja¹, Christiano F. Weissheimer¹

¹Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS. ²Bolsista CNPq, Programa Leite Seguro

INTRODUÇÃO

O LINA (Leite Instável Não Ácido) é uma alteração na qualidade do leite resultante do desequilíbrio no sistema de produção. A principal alteração identificada é a perda da estabilidade da caseína ao teste do álcool, resultando em precipitação positiva, sem haver acidez elevada. No Brasil, os trabalhos iniciaram no ano 2002 no Rio Grande do Sul, sendo que o diagnóstico do LINA já foi confirmado em diversos estados do País (Zanella et al., 2018).

Vários fatores interferem de forma complexa na qualidade do leite, entre os quais: fator genético (espécie, raça dos animais, individualidade animal), fatores intrínsecos do animal (idade, estágio e número de lactações), fatores nutricionais (tipo de alimento e disponibilidade, forma de conservação, adequação da dieta às exigências do animal), fatores ambientais (condições ambientais, estresse, estação do ano, manejo), fatores extrínsecos (sanidade, contaminação bacteriana), etc. (Zanella et al., 2018). Com relação a instabilidade do leite, a maioria dos estudos de ocorrência foi realizada a partir de amostras de leite de rebanho, sendo que a influência de fatores intrínsecos aos animais individuais ainda não foi bem estabelecida.

O presente trabalho tem como objetivo apresentar a ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA), no leite de vacas individuais do rebanho experimental do Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento.

MATERIAS E MÉTODOS

O Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL), conta com um rebanho experimental de aproximadamente 150 vacas da raça Jersey, utilizados para pesquisa em qualidade do leite.

Mensalmente, foi realizado o controle leiteiro das vacas em lactação, para avaliação da qualidade do leite. O controle mensal consistiu na coleta de dados dos animais em lactação, sendo coletados dados relacionados a características intrínsecas aos animais como dias de lactação (DEL), produção diária de leite (L/dia) e número de partos. Adicionalmente, são coletadas amostras de leite das vacas individuais para avaliação da qualidade do leite (teores de gordura, proteína bruta, lactose, sólidos totais) e contagem de células somáticas (CCS). Os resultados de composição, CCS e características intrínsecas não serão apresentados nesse trabalho.

Para avaliação dos casos de LINA foram coletadas amostras de leite de vacas individuais com auxílio de um coletor acoplado na ordenhadeira. As amostras foram coletadas mensalmente no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2019. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em refrigeração, em frascos de vidro sem tampa, durante pelo menos quatro horas. Foram realizadas as seguintes análises: teste de álcool em diferentes concentrações (72, 74, 76, 78, 80 e 82%) e avaliação da acidez titulável em graus Dornic (°D). A ocorrência de LINA foi estabelecida como resultado positivo ao teste do álcool 72%, e o nível de instabilidade foi definido como a menor concentração de álcool necessária para se obter resultado positivo (precipitação). Esse teste baseia-se no fato de que quanto maior a concentração de álcool utilizada na mistura, mais rígido se torna o teste e mais estável será o leite. Ao mesmo tempo que quanto menor a concentração em que o leite precipita, menor é sua estabilidade.

Foi calculada a ocorrência média de LINA nos animais do rebanho, nos diferentes meses do ano (variação sazonal), sendo que a porcentagem apresentada a

média mensal dos anos avaliados. O nível de instabilidade mensal foi calculado conforme a média mensal dos anos avaliados. Os resultados serão avaliados por estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período estudado, foram coletadas 2.462 amostras de leite, de janeiro de 2011 a dezembro de 2019. A Tabela 1 apresenta os resultados da média mensal de ocorrência do LINA e o nível de instabilidade do leite individual dos animais do rebanho experimental, nos anos de 2011 a 2019.

Tabela 1 - Médias mensais da ocorrência de LINA e nível de instabilidade ao teste do álcool do leite de vacas Jersey individuais do rebanho experimental do SISPEL (janeiro de 2011 a dezembro de 2019).

Meses	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
LINA (%)	48,8	47,9	59,9	49,2	37,1	38,6	16,7	19,1	14,5	35,6	31,1	37,2
Nível de instabilidade (média)	73,3	73,8	72,0	73,4	74,9	75,3	77,8	76,6	77,3	75,1	75,6	74,8

N = 2.462 observações.

Observou-se que a maior ocorrência de LINA aconteceu nos meses de março e abril, e as menores, nos meses de julho a setembro. Esses resultados coincidem com as variações sazonais observadas nas avaliações de leite de rebanhos na Região Sul do Brasil (Zanela, 2009), o que sugere que a instabilidade do leite do rebanho está diretamente relacionada à maior ocorrência de LINA nos animais individuais. Os fatores que influenciam essa ocorrência podem estar relacionados ao manejo dos animais (alimentação), e características intrínsecas (tempo de lactação, número de lactações, etc). Os dados estão sendo avaliados para melhor estabelecimento dessas relações.

A média geral da ocorrência mensal de LINA no rebanho foi de 36,2% e o nível de instabilidade ao teste do álcool de 75% para o total de amostras analisadas.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de LINA no leite de animais individuais foi mais elevada no outono, e mais baixa no inverno, semelhante às variações sazonais observadas nos estudos com leite de rebanhos. Estudos complementares para avaliação da influência das características intrínsecas dos animais na ocorrência de LINA estão sendo conduzidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Zanela, M. B.; Machado, S. C. Incidência do Leite Instável Não Ácido (LINA) no RS, Brasil In: Ribeiro, M. E. R.; Zanela, M. B.; Schafhauser Jr, J. (Ed.). Leite instável: avanços científicos e caminhos para inovações na América Latina. 1 ed. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2009, v.1, p. 111-124.

Zanela, M. B.; Kolling, G. J.; Ribeiro, M. E. R.; Fischer, V. Análises de composição e estabilidade do leite ao álcool. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE LECHE INESTABLE, 2., 2011, Montevideo. **Anais...** Montevideo - UY: Universidad de la Republica. p. 2-5. 2011. 1 CD ROM

PROBABILIDADE DE OS SÓLIDOS NÃO GORDUROSOS APRESENTAREM VALORES IGUAIS E/OU ACIMA DE 8,4% DE ACORDO COM A IN 76 NA REGIÃO NORTE DO RIO GRANDE DO SUL

Jéssica Aneris Folchini¹, Carlos Bondan², Renato Serena Fontaneli³, Manuele Zeni¹, Diógenes Cecchin Silveira¹

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo. ²Professor do Departamento de Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

³Pesquisador na Embrapa Trigo

INTRODUÇÃO

Os sólidos não gordurosos (SNG) são formados pela soma da proteína, lactose e minerais e sofrem variação conforme as alterações na dieta, genética, doenças, dias em lactação, temperatura e a sazonalidade (Reis et al., 2004). Alterações que ocorrem nos teores de SNG do leite são atribuídas principalmente, à variação na proteína e lactose pois estes componentes constituem o maior percentual no teor.

A variação dos componentes lácteos faz com que em determinadas épocas do ano os SNG se encontrem abaixo dos valores estabelecidos pela Instrução Normativa 76 (IN 76) de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O Serviço de Análises de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da Universidade de Passo Fundo (UPF), em um trabalho retrospectivo de cinco anos, constatou que 18,2% dos resultados de SNG em leite cru, oriundo de amostras do norte do RS encontravam-se abaixo de 8,4%. Tal fato concorda com relatos da indústria e dos órgãos de inspeção sanitária, que identificam diminuição da concentração de SNG em determinadas épocas do ano e regiões do estado principalmente nos meses mais quentes, podendo ocasionar a condenação do leite devido ao não atendimento da legislação e penalidades à indústria processadora devido à suspeita de fraude.

O objetivo desse estudo foi observar em quais estações há maiores probabilidades de se produzir SNG iguais e/ou acima de 8,4% de acordo com a IN 76 na região norte do estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi motivada pelo problema identificado pelas indústrias processadoras e encomendado pelo Sindicato de Indústrias Leiteiras do Rio Grande do Sul (SINDILAT/RS). As análises foram realizadas no laboratório de Serviços de Análises de Rebanhos Leiteiros (SARLE), da Universidade de Passo Fundo (UPF) que faz parte da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), órgão credenciado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Foram analisados 1.281.234 registros obtidos de amostras de leite cru refrigerado coletadas em tanque de expansão e enviadas para análise no SARLE no período de 1 de janeiro de 2014 a 31 de dezembro de 2018. Esta análise da composição do leite é feita com a tecnologia do infravermelho proximal Transformada de Fourier (FTIR) utilizando Equipamentos com Sistema Delta.

Os dados foram submetidos a análises descritivas para estimar a probabilidade de ocorrência dos fenômenos em estudo em relação às variáveis dependentes destes fenômenos, em função das variáveis explicativas inseridas nos respectivos modelos, fez-se uso da estatística descritiva. A avaliação da condição de normalidade foi realizada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e para a avaliação da homogeneidade entre as variâncias foi aplicado o teste de Levene. O nível de significância utilizado nos testes para rejeitar H₀, quando a hipótese nula for verdadeira, foi de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSÃO

Observou-se que a probabilidade de se produzir SNG iguais ou acima de 8,4% na região norte do Rio Grande do Sul ocorreu apenas durante as estações do outono e inverno (81,4%). Também houve maior probabilidade dos teores de proteína estarem iguais ou acima de 2,9% nas mesmas estações (96,4%). A maior probabilidade dos teores de lactose estarem iguais ou acima de 4,3% ocorreram durante a primavera e inverno (75,5%). No outono e inverno, registrou-se médias de 8,6% e 8,7% para SNG, 3,5% e 3,6% para proteína e 4,5% e 4,4% para os teores de lactose para as amostras com valores de SNG iguais ou acima de 8,4%.

A sazonalidade desempenha um papel importante na produção e composição do leite no sul do Brasil, uma vez que os maiores teores de proteína e lactose são detectados nos meses mais frios fato atribuído à melhor composição da forragem nessa época (Bondan et al., 2018). Presume-se que o potencial de alteração do teor de proteína no leite por meio da nutrição não é elevada e fica em torno de 0,1 a 0,2 pontos percentuais, uma vez que a principal necessidade dos ruminantes é pelos aminoácidos e não por proteína bruta.

A alteração nos teores de lactose pode ser atribuída à energia presente na dieta, mudanças no suprimento de energia afetam a produção e composição do leite e podem sofrer modificações de acordo com o potencial produtivo de cada animal, estágio de lactação e fornecimento de ração. Ainda, as elevadas CCS correlacionam-se negativamente com a lactose (Bondan et al., 2018). Todos esses fatores devem ser analisados quando buscamos entender o motivo dos teores de lactose apresentarem uma probabilidade maior de estarem acima de 4,3% somente na primavera e no inverno. Mudanças nos teores de lactose ainda podem indicar uma deficiência nos carboidratos digestíveis provenientes da dieta (Arruda Jr et al., 2019).

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

Na região norte do Rio Grande do Sul, há oscilações sazonais para os teores de SNG, havendo maior probabilidade de estes se encontrarem dentro do padrão instituído pela Instrução Normativa 76, apenas no inverno e outono.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- Arruda Junior, L. C. et al. Variation in the content of defatted dry extract in cooling tanks milk samples of dairy farms. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 203-215, 2019. doi: 10.5433/1679-0359.2019v40n1p203.
- Bondan, C. et al. Milk composition of Holstein cows: a retrospective study. **Ciência Rural**, v. 48, n. 12, p.1-8, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180123>.
- Reis, R. B. et al. Manipulação da composição do leite pela nutrição da vaca. In: I SIMPÓSIO DO AGRONEGÓCIO DO LEITE: produção, gestão e qualidade, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: EV-UFMG, 2004.

Área Temática 07: TECNOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS

IMPACTO DAS ESTAÇÕES DO ANO E TEMPERATURA MÉDIA SOBRE OS TEORES DE SÓLIDOS NÃO GORDUROSOS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU NO NORTE DO RIO GRANDE DO SUL

Jéssica Aneris Folchini¹, Carlos Bondan², Renato Serena Fontaneli³, Manuele Zeni¹, Diógenes Cecchin Silveira¹

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo. ²Professor do Departamento de Agronomia da Universidade de Passo Fundo.

³Pesquisador na Embrapa Trigo

INTRODUÇÃO

A cadeia láctea está estruturada na comercialização de diversos insumos e serviços, se destacando gradativamente no agronegócio brasileiro. Desse modo, produzir leite de forma competitiva, atendendo aos parâmetros de sustentabilidade socioeconômica, ambiental e segurança alimentar, são requisitos básicos e essenciais para que haja crescimento sustentável na atividade.

A produção da matéria-prima de qualidade impacta na produção de derivados lácteos como queijo, manteiga e iogurte, que estão presentes diariamente na mesa do consumidor que prioriza cada vez mais produtos de elevada qualidade. No entanto, a produção e a composição do leite oscilam em determinadas épocas do ano influenciadas por fatores intrínsecos ao animal, ao manejo, à nutrição e às mudanças ambientais.

Assim, a variação dos componentes lácteos faz com que em determinadas épocas do ano haja uma oscilação nos sólidos não gordurosos (SNG) do leite. O objetivo desse estudo foi estudar o impacto das estações do ano x temperatura sobre SNG no norte do Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi motivada pelo problema identificado pelas indústrias processadoras e encomendado pelo Sindicato de Indústrias Leiteiras do Rio Grande do Sul (SINDILAT/RS). As análises foram realizadas no laboratório de Serviços de Análises de Rebanhos Leiteiros (SARLE), da Universidade de Passo Fundo (UPF) que faz parte da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), órgão credenciado no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Foram analisados 1.281.234 registros obtidos de amostras de leite cru refrigerado coletadas em tanque de expansão e enviadas para análise no SARLE no período de 1 de janeiro de 2014 a 31 de dezembro de 2018. Esta análise da composição do leite é feita com a tecnologia do infravermelho proximal Transformada de Fourier (FTIR) utilizando Equipamentos com Sistema Delta. Os dados foram submetidos a análises descritivas para estimar a probabilidade de ocorrência dos fenômenos em estudo em relação às variáveis dependentes destes fenômenos, em função das variáveis explicativas inseridas nos respectivos modelos, fez-se uso da estatística descritiva. A avaliação da condição de normalidade foi realizada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e para a avaliação da homogeneidade entre as variâncias foi aplicado o teste de Levene. O nível de significância utilizado nos testes para rejeitar H₀, quando a hipótese nula for verdadeira, foi de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve impacto do binômio estação do ano x temperatura sobre a composição dos SNG do leite no norte do Rio Grande do Sul. O percentual de observações para SNG abaixo do estabelecido pela legislação vigente foi de 18,2%. O estudo demonstrou que os constituintes do leite apresentaram diferenças entre as estações do ano. O outono e inverno foram os períodos em que os constituintes se mantiveram iguais ou

superiores aos exigidos pela legislação vigente (8,7 e 8,6%), enquanto que a primavera e o verão foram os períodos com os menores valores de SNG (8,5%).

A maior probabilidade de os SNG estarem abaixo de 8,4% ocorreu durante a primavera e verão. Na primavera e verão, houve maior probabilidade de se obter teores de proteína abaixo da IN 76 (<2,9%), enquanto que na primavera e inverno houve maiores probabilidades de se produzir lactose abaixo do esperado (<4,3%). Na primavera, verão e outono ocorreram os maiores índices de contagem de células somáticas que também foram influenciadas pelas estações do ano apresentando valores iguais ou maiores aos estabelecidos pela legislação (>500.000 céls/mL). O Exp (B) é conhecido como a chance de ocorrência de um evento ou *odds* e explica a magnitude da probabilidade de variação que ocorre quando houver o aumento de 1 grau na temperatura média (Favero; Belfiore, 2017). Sendo assim, o que os modelos de equações logísticas propostos estimam não são os valores que serão assumidos pelos componentes do leite e sim, a probabilidade de ocorrência do evento em estudo estar de acordo com a IN/76 para cada observação (BRASIL, 2018).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estações do ano juntamente com as temperaturas impactam nos teores de SNG do leite na região norte do Rio Grande do Sul. O outono e inverno foram os períodos em que os constituintes se mantiveram iguais ou superiores aos exigidos pela legislação, enquanto que na primavera e o verão foram os períodos com os menores valores de SNG no leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2019. CAPÍTULO I REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITE CRU REFRIGERADO. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 de novembro de 2018.

Favero, L.P.L; Belfiore, P.P; **Manual de análise de dados: estatística e modelagem multivariada com excel, SPSS e stata**. Elsevier; Rio de Janeiro, 2017.

OHMIC HEATING TREATMENT IN HIGH-PROTEIN VANILLA FLAVORED MILK: PROCESSING PERFORMANCE AND PHYSICAL ASPECTS

Ramon Silva Rocha^{1,2}, Ramon Silva^{1,2}, Maria Eduarda Marques Soutelino¹, Erick Almeida Esmerino¹, Patrícia Blumer Zacarchenco Sá³, Marcia Cristina Silva², Monica Queiroz Freitas¹, Adriano Gomes da Cruz²

¹Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Veterinária, Niterói, Brasil.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Departamento de Alimentos, Rio de Janeiro, Brasil. ³ Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Centro de Tecnologia de Laticínios, Campinas, São Paulo, Brazil

INTRODUCTION

Emerging technologies are gaining increasingly prominence due to their various advantages compared to conventional heat treatment, such as more remarkable nutritional and sensory preservation and greater sustainability (Ribeiro et al., 2022). Among them, Ohmic Heating (OH) is an emerging thermal technology consisting of an electrical current passing through a food product, which shows several benefits, such as rapid and uniform generation of heating in the product and preservation of nutritional value (Waziroh et al., 2022).

The use of OH as an alternative method for pasteurizing dairy foods has been reported for several dairy foods, as whey beverages, desserts, infant formulas. However, the application of OH to high-protein liquid dairy products has not been reported so far.

Therefore, this study assessed the impact of OH treatment at different electric field strengths on the physicochemical, microbiological, technological, and biological properties of high-protein vanilla-flavored milk.

MATERIALS AND METHODS

The processing of flavored milk was based on El Khoury et al. (2019), with modifications using the ohmic heating apparatus described in Rocha et al (2020). 10% w/w industrial whey protein isolate (90% total protein, Sooro Renner Nutrição S/A, Paraná), 3% sucrose (União, São Paulo) and 0.5% w/w vanilla flavor. The concentration of WPI was defined to obtain a product with 12 g of protein per 100 mL, classifying it as a high-protein drink (Brasil, 2012). The samples were then processed by conventional heat treatment or OH. The same time/temperature binomial was used for both processes.

Six formulations were prepared: raw product (CONTROL, no conventional heat treatment or OH), conventional pasteurization (72 °C/15 s; PAST), ohmic heating at 5.22 V/cm (OH6), ohmic heating at 6.96 V/cm (OH8), ohmic heating at 8.70 V/cm (OH10), and ohmic heating at 10.43 V/cm (OH12). All samples submitted to OH followed the same binomial time/temperature that the PAST sample, and for both processes the parameters were controlled by a clock and bookmarks to voltage, current, and/or temperature. Process parameters were recorded and stored for energy parameters calculations during OH. The OH performance (Energy expenditure (KJ), electrical conductivity, heat and volumetric heat generation were calculated according with Balthazar et al. (2022). Gross composition (Brasil, 2006). In addition, Optical parameters (L^* , a^* , and b^*) and rheology aspects (flow curves) were also performed.

The experiment was repeated three times following a completely randomized design. The data were submitted to the Analysis of variance (ANOVA) and Tukey test (significance level of $p < 0.05$) using the XLSTAT software version 2020 (Adinsoft, Paris, France).

RESULTS AND DISCUSSION

OH12 and PAST presented shorter times (4.16 and 4.58 min, respectively) to achieve the processing temperature than OH6, OH8, and OH10 (20, 12, and 6 min, respectively). In addition, the increase in the electric fields (OH12: 10.43V/cm and OH10: 8.70V/cm) resulted in shorter processing times, in the same proportion that heat generation increased (10.8mV (OH12) and 5.3mV (OH10), respectively).

Electrical conductivity increased in all samples processed by OH. At the beginning of processing, all formulations showed similar values, ranging from 0.31 (OH6) to 0.41 S/m (OH12, $p > 0.05$). The energy expenditure of OH samples ranged from 121.3 KJ (OH10) to 166.9 KJ (OH8). OH8 also showed the highest energy consumption (166.9 KJ), followed by OH 12 (155.4 KJ). Finally, the heat generation of the OH treatments increased in parallel with the applied electric field strength. Overall, PAST sample presented the highest energy consumption (503.5 KJ), emphasizing the advantage of using OH, regardless of the electric field strength.

No differences in the moisture, protein, and fat contents among the studied formulations ($p > 0.05$). The protein content in all samples was over 12 g/100 mL, which was expected since the addition of WPI was intended to increase the amount of this nutrient in the drink, allowing the denomination of "product of high-protein value".

Conventional heating (PAST) and OH resulted in changes in the color parameters of the products compared to CONTROL, with increases in luminosity (L^*), red color (a^*), and whiteness index (WI), and decreases in yellow color (b^*), C^* , h^* and YI ($p < 0.05$). Regards the rheological aspects, the data showed an excellent adjustment to the Power-law model ($0.9781 < R^2 < 0.9940$). The conventionally heated sample (PAST) exhibited the highest shear stress and viscosity profiles, numerically expressed by the highest consistency index ($0.9985 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$), implying a well-structured protein network with low mobility. On the other hand, ohmically-heated samples (OH) have lower consistency indexes ($0.0144\text{-}0.4585 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$, $p < 0.05$).

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

OH seems an interesting technology to be used to process high-protein vanilla flavored milk. Lower energy expenditure, absence of difference in gross composition and improvement of color and rheological parameters were observed which can be interesting for consumers, more white color and similar to a liquid beverage.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- Balthazar, C. F., Cabral, L., Guimarães, J. T., Noronha, M. F., Cappato, L. P., Cruz, A. G., & Sant'Ana, A. S. (2022). Conventional and ohmic heating pasteurization of fresh and thawed sheep milk: Energy consumption and assessment of bacterial microbiota during refrigerated storage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 76, 102947.
- Rocha, R. S., Silva, R., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Pimentel, T. C., Neto, R. P., Cruz, A. G. (2020). Possibilities for using ohmic heating in Minas Frescal cheese production. **Food Research International**, 131, 109027.

ACKNOWLEDGES

The authors are grateful to IFRJ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) financing code 001, in Brazil, for their financial support and the productivity grants.

OVERRUN DE SORVETE FUNCIONAL SIMBIÓTICO PRODUZIDO COM LEITELHO E POLPA DE CAGAITA (*Eugenia dysenterica*)

Renata Teixeira Pfrimer¹, Clarice Gebara¹, Karyne Oliveira Coelho², Cintia Minafra¹, Lucyana Vieira Costa¹, Natylane Eufransino Freitas¹, Katheryn Merz¹, Edmar Soares Nicolau¹

¹Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA), Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Brasil. ²Universidade Estadual de Goiás – Campus Oeste, São Luís de Montes Belos, Brasil

INTRODUÇÃO

Indústrias inovadoras do mercado de sorvetes buscam agregar valor ao produto, explorando o desenvolvimento na área de ingredientes funcionais para atender a demanda crescente do mercado. No que tange à produção de alimentos e quanto ao contexto da otimização dos processos de produção, bem como da utilização de recursos anteriormente descartados, como o soro lácteo e leiteiro, destaca-se a inovação tecnológica bioinspirada de produtos potencialmente já nutritivos, como por exemplo, os sorvetes.

Incrementar esses produtos explorando o uso de saborizantes naturais e regionais faz com que a produção sustentável de frutos nativos do Cerrado como a cagaita (*Eugenia dysenterica*) ganhe incentivo, tendo como alvo a proteção e recuperação de ecossistemas terrestres.

A fabricação de sorvetes funcionais simbióticos fomenta a inovação de derivados lácteos e objetivou-se por meio deste, analisar o overrun de sorvete funcional simbiótico produzido com leiteiro e polpa de cagaita *Eugenia dysenterica*, já que este influencia diretamente na textura e na velocidade de derretimento dos sorvetes.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (CPA/EVZ/UFG).

Foram elaboradas seis formulações de sorvetes funcionais simbióticos com diferentes concentrações de leite pasteurizado/creme de leite pasteurizado, soro lácteo em pó e leiteiro em pó. Sendo destes, três formulações com adição de polpa de cagaita.

Utilizou-se leite pasteurizado padronizado e creme de leite com 35% de gordura; açúcar cristal e emulsificante Marvi Gel Plus. O soro lácteo em pó utilizado nas formulações foi cedido pelo Laticínio Lactosul Indústria de Laticínios (Piranhas/Goiás). O leiteiro em pó foi adquirido junto à Cooperativa Agroindustrial de

Londrina – Cativa (Londrina/Paraná). A cultura probiótica liofilizada da cepa de *Lactobacillus acidophilus* – La 3 foi cedida pela empresa Sacco (Campinas/São Paulo). O prebiótico utilizado nas formulações, Orafiti® Inulin foi adquirido junto a empresa SweetMix (Sorocaba/São Paulo). A polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*) foi adquirida através da Cooperativa Central do Cerrado (Sobradinho/Distrito Federal).

A medição do overrun, que é a taxa de incorporação de ar à calda, na etapa de congelamento e batimento do sorvete, foi realizada com a pesagem inicial da calda em relação à pesagem do produto após bateção e congelamento. Este foi determinado utilizando a fórmula: $\text{Overrun (\%)} = (\text{Pc} - \text{Ps} / \text{Ps}) * 100$; em que: Pc = peso da calda, em gramas; Ps = peso do sorvete, em gramas.

Os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), com delineamento experimental inteiramente casualizado. A comparação de médias foi realizada utilizando o teste Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, através do software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, observa-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre sorvetes para a análise de overrun. No entanto, a taxa de incorporação de ar resultou das características de composição das formulações, pois na fabricação em batelada é difícil controlar esta característica. Maior overrun propicia textura mais leve e pode influenciar no derretimento e textura do produto (Faresin, 2019).

Formulações ¹	Ingredientes				Overrun (%)
	Leite/Creme pasteurizado (%)	Soro (%)	Leitelho (%)	Polpa Cagaita (%)	
1	62,30	26,70	0	0	26,64 ± 0,02 ^b
2	62,30	0	26,70	0	28,30 ± 0,01 ^a
3	62,30	13,35	13,35	0	25,84 ± 0,04 ^c
4	48,30	20,70	0	20,00	24,64 ± 0,91 ^d
5	48,30	0	20,70	20,00	25,51 ± 0,03 ^d
6	48,30	10,35	10,35	20,00	24,76 ± 0,22 ^d

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P > 0,05$).

¹Todas as formulações continham 5% de açúcar cristal e 5% de prebiótico.

A adição de inulina pode provocar modificações na taxa de overrun, ao melhorar a viscosidade e propiciar textura mais suave (Faresin, 2019) e, conseqüentemente, o aumento do valor de overrun. No presente trabalho, todos os sorvetes foram adicionados 5% deste prebiótico.

De forma semelhante ao observado por Faresin (2019), no presente trabalho, os sorvetes com maior teor de leite/creme (62,30%), apresentaram maior valor de overrun e formulações com adição de polpa de cagaita apresentaram valores menores. Essa relação ocorreu provavelmente em virtude da adição da polpa promover redução proporcional na concentração do teor de gordura dos sorvetes. Assim, a quantidade de gordura disponível para promover a formação da microestrutura coloidal através do aprisionamento e estabilização das bolhas de ar incorporadas, estava reduzida (Goff, 2019).

Dentre as formulações avaliadas, o sorvete com maior concentração de leite (2) apresentou maior taxa de overrun (28,30% ± 0,01), provavelmente relacionado com a presença de grande quantidade de fosfolípidos que constituem o leite. De igual modo foi observado por Ramos et al. (2021), ao desenvolver sorvetes com adição de leite.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sorvetes funcionais simbióticos sem adição de polpa de cagaita, assim como os com maior teor de leite/creme apresentaram maiores valores de overrun. Dentre estes, o sorvete com maior concentração de leite apresentou a maior taxa de incorporação de ar, devido possivelmente à maior concentração de gordura. É importante salientar que os valores baixos de overrun podem ser associados ao equipamento e método de fabricação utilizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Faresin L da S. **Desenvolvimento de sorvete funcional com redução de açúcar e gordura**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2019.
- Goff H. The Structure and Properties of Ice Cream and Frozen Desserts. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 47-54, 2019.
- Ramos I et al. Development of ice cream with added buttermilk. **Brazilian Journal of Food Technology [Internet]**. vol. 24, 2021.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (CPA-EVZ-UFG) por ter cedido suas instalações e equipamentos para a realização deste trabalho, além do financiamento dos materiais e reagentes necessários. Ao Laticínio Lactosul Indústria de Laticínios pela doação do soro lácteo em pó. À empresa Sacco pela doação da cultura probiótica liofilizada da cepa de *Lactobacillus acidophilus*.

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE IOGURTES TIPO GREGO COM DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DE COLOSTRO

Rhaabe Dayane da Silva Gomes¹, Adriano Henrique do Nascimento Rangel¹, Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro², Idiana de Macedo Barbosa³, Emerson Gabriel dos Santos Oliveira Silva¹, Katya Anaya Jacinto⁴, José Geraldo Bezerra Galvão Júnior⁵, Marco Antonio Sundfeld da Gama⁶

¹Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Macaíba, Brasil. ²Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil. ³Unidade de Processamento de Laticínios, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Macaíba, Brasil. ⁴Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Santa Cruz, Brasil. ⁵Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN), Ipangaçu, Brasil. ⁶Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil

INTRODUÇÃO

O leite é um líquido secretado por fêmeas mamíferas como principal função a nutrição dos recém-nascidos, enquanto o colostro é o primeiro componente secretado pelas fêmeas lactantes para nutrição e transferência de imunidade para o bezerro.

As concentrações dos ácidos graxos (AG) do colostro são diferentes quando comparadas ao leite, possuindo maiores níveis de AG polinsaturados e ácido palmítico (O'Callaghan et al., 2020). Os AG presentes no colostro bovino podem desempenhar importantes funções no organismo, como auxílio na mobilidade intestinal, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, dentre outras.

O aumento da demanda por produtos nutracêuticos tem crescido rapidamente, sendo o colostro um componente com alto potencial para produção de suplementos, fórmulas infantis, bebidas e alimentos funcionais inovadores. A adição do colostro bovino ao iogurte proporciona aumento dos valores nutricionais e da qualidade do produto, o que torna uma opção para produção deste alimento e consumo humano.

O iogurte tipo grego se diferencia pela filtração do soro, o que aumenta o teor de sólidos totais e torna o iogurte mais cremoso e saboroso. Ele possui maior quantidade de AG saturados, sendo os ácidos esteárico e palmítico predominantes, enquanto os ácidos oleico e linoleico são os principais ácidos insaturados (Sumarmon et al., 2015). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de ácidos graxos em iogurtes tipo grego com diferentes níveis de inclusão de colostro.

MATERIAIS E MÉTODOS

O leite cru e o colostro de vacas da raça Jersey foram obtidos em uma propriedade comercial no município de São Gonçalo do Amarante, Rio Grande do Norte. A alimentação das vacas era constituída por silagem de milho, farelo de soja e mix de minerais. As amostras de leite e de colostro foram obtidas mediante ordenha mecânica. Considerou-se colostro a secreção dos três primeiros dias após o parto e, para a elaboração do iogurte, foi utilizado o colostro da terceira ordenha.

As etapas de produção do iogurte estiveram de acordo com as normas da Instrução Normativa Nº 46 (Brasil, 2007). Foram elaboradas quatro formulações de iogurte grego: C0 - 0% de adição de colostro; C10 - 10% de adição de colostro bovino; C20 - 20% de adição de colostro bovino e C30 - 30% de adição de colostro bovino. Portanto, a formulação C0 continha 1L de leite, a C10 com 900ml de leite e 100 ml de colostro, a C20 continha 800 ml de leite e 200ml de colostro e a C30 com 700 ml de leite e 300 ml de colostro. Para cada um dos tratamentos foi adicionado 10% (m/v) de sólidos solúveis (leite em pó integral) e 8% de sacarose. De cada uma das formulações foram

separadas alíquotas de 100 gramas, as quais foram submetidas à liofilização para posterior análise de composição de AG por cromatografia gasosa.

Uma análise de regressão foi realizada para testar o efeito da inclusão de colostro sobre as concentrações dos principais ácidos graxos no iogurte. Utilizou-se o programa SAS e a significância foi declarada quando $P \leq 5\%$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O principal AG observado no colostro foi o C16:0, seguido pelo C18:1c9 (Tabela 1), corroborando com O'Callaghan et al. (2020).

Tabela 1 - Concentração (g/100g) de ácidos graxos nas amostras de colostro bovino coletadas nos 3 primeiros dias pós-parto

Ácido Graxo	Média ± Desvio Padrão
C16:0	36,6±4,86
C18:0	8,99±1,19
C18:1 c9	18,4±4,69
C18:2 n6	2,06±0,44
CLA	0,30±0,015
C18:3 n3	0,15±0,06
C20:4 n6	0,42±0,05
n3	0,56±0,23
n6	2,51±0,46
AGS	64,5±4,31
AGI	35,4±4,31

n3: ácidos graxos ômega-3; n6: ácidos graxos ômega-6; AGS: ácidos graxos saturados; AGI: ácidos graxos insaturados; CLA: Ácido linoleico conjugado *cis*-9, *trans*-11.

O perfil de AG dos iogurtes tipo grego foi influenciado pelos níveis de inclusão de colostro e a respectiva concentração de AG (Tabela 2). Não se observou efeito da inclusão de colostro sobre a concentração dos principais AG no iogurte, com exceção para o ácido araquidônico, o qual aumentou juntamente com a inclusão de colostro. O teor do somatório dos ácidos n6 também aumentou linearmente com a inclusão do colostro, enquanto os ácidos n3 obtiveram uma resposta quadrática.

Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos de iogurtes com diferentes níveis de inclusão de colostro bovino na produção de iogurtes tipo grego.

Ácidos Graxos	Nível de inclusão de colostro, %				P ¹	
	0	10	20	30	L	Q
C16:0	28,0	26,8	28,5	28,9	0,368	0,413
C18:0	13,59	12,56	12,41	12,68	0,368	0,247
C18:1 c9	20,06	19,34	20,34	20,05	0,689	0,686
18:2 n6	1,68	1,66	1,82	1,80	0,078	0,918
CLA ³	0,444	0,470	0,476	0,453	0,570	0,425
C18:3 n3	0,182	0,193	0,201	0,192	0,303	0,565
C20:4 n6	0,123	0,128	0,144	0,150	0,050	0,645
n3	0,246	0,272	0,285	0,266	0,359	0,024
n6	1,804	1,818	1,961	1,952	0,048	0,097

¹Probabilidade da regressão linear (L) e quadrática (Q).

Para a fabricação dos iogurtes foram utilizados os microrganismos *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Durante o processo de fermentação, alguns AG podem ser produzidos ou hidrogenados. Os resultados mostram que esses processos foram mínimos ou inexistentes nesse experimento e que as principais

diferenças nos teores de ácidos graxos entre o leite e o colostro são mais evidentes para os AG n^o6, principalmente o araquidônico.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão de colostro na fabricação de iogurte tipo grego está associada a um aumento nos teores do ácido graxo araquidônico e, conseqüentemente, dos ácidos graxos essenciais. A utilização de colostro, em substituição ao leite, parece ser uma ferramenta eficaz para melhorar a qualidade de produtos lácteos como alimento funcional. Formulações contendo colostro podem ser soluções inovadoras para se aumentar o valor agregado de produtos voltados para a alimentação humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil. Instrução Normativa n^o 46. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade De Leites Fermentados**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. p.4, 2007.
O'Callaghan, T. F., et al. Evolution of the bovine milk fatty acid profile - From colostrum to milk five days post parturition. **International Dairy Journal**, v.104, p.1-8, 2020.
Sumarmono, J., et al. Fatty Acids Profiles of Fresh Milk, Yogurt and Concentrated Yogurt from Peranakan Etawah Goat Milk. **Procedia Food Science**, v.3, p.216–222, 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

RESISTÊNCIA À DIGESTÃO SIMULADA DE CULTURA PROBIÓTICA ADICIONADA À BEBIDA LÁCTEA

Celina Martins Decol¹, Thais Priscila de Jesus¹, André Augusto Bessas de Campos², Deborah Raquel Pereira de Souza², Lorena Dávalo de Figueiredo², Thálita Cristina da Silva Conceição², Vitor Benachio Trevisan², Edivaldo Sampaio de Almeida Filho².

¹Faculdade de Arquitetura e Engenharia, Universidade do Estado de Mato Grosso, Barra do Bugres, MT. ²Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brasil

INTRODUÇÃO

A procura por alimentos saudáveis e nutritivos vem aumentando mundialmente, o que proporciona vários estudos na área de produtos lácteos. A percepção do consumidor sobre certos tipos de alimentos, principalmente os funcionais e saudáveis faz com que as indústrias trabalhem em novos produtos ou aperfeiçoem os já existentes. A utilização de espécies microbianas probióticas visa aumentar efeitos benéficos principalmente na microbiota intestinal e tem crescido gradativamente, principalmente em alimentos destinados a crianças, como bebidas lácteas e em produtos fármacos.

No Brasil o aproveitamento do soro de leite se destaca na elaboração de bebidas lácteas como o conteúdo fundamental para a sua elaboração. As bebidas lácteas são uma forma lógica de proveito do soro, onde passa por diferentes processamentos, podendo ter sabores diferenciados. Nos últimos anos a elaboração de bebidas lácteas cresceu gradativamente pelo uso de fermentos DVS (Direct Vat Set), que contribui na inoculação direta e agrega valores ao produto como o valor nutritivo, vitaminas, proteínas e aprimoramento de sabor e textura.

Os alimentos funcionais são caracterizados como alimentos sólidos ou líquidos que, quando ingeridos, resultam em algum efeito benéfico, fisiológico ou (redução de algum tipo de doença) no corpo humano. O trato gastrointestinal humano possui funções fisiológicas onde é possível aumentar o número de micro-organismos que melhoram a saúde através de probióticos proporcionando um equilíbrio da microbiota intestinal e reduzindo os riscos de algumas doenças.

MATERIAIS E MÉTODOS

O soro doce foi obtido através da coagulação de leite pasteurizado integral por meio da ação da enzima quimosina comercial e, posteriormente, misturado ao leite pasteurizado na proporção de 60% leite e 40% soro, mantendo o mínimo de 51% de base láctea. Os ingredientes foram homogeneizados e em seguida submetidos a pasteurização a 85°C seguido de resfriamento imediato a 10°C e acondicionados em recipientes. Antes do acondicionamento adicionou-se suplemento probiótico de *Lactobacillus reuteri*. Os produtos foram armazenados sob refrigeração a 10°C durante 15 dias.

A contagem de *L. reuteri* foi realizada nos dias 0, 1, 5, 10, e 15 dias de estocagem por plaqueamento por profundidade em Ágar LB (Ágar Lactobacillus) seguido de incubação a 37°C. A contagem foi realizada em contador eletrônico de colônias em duplicata para cada diluição, em alíquotas coletadas antes e após o processo de digestão simulada.

Para avaliar a resistência e sobrevivência da cultura probiótica adicionada à bebida láctea às condições gástricas e entéricas utilizou-se porções da bebida láctea misturados solução de NaCl, a essa solução adicionou-se solução de NaCl 0,85%; HCL e pepsina seguido de incubação a 37 °. Posteriormente foi adicionado NaCl 0,85%, solução tampão de fosfato e bile bovina seguido de reincubação nas mesmas condições anteriores. Alíquotas da amostra foram coletadas ao final do processo simulado e submetidas a contagem em placas, cada ensaio in vitro foi realizado em duplicata.

Os resultados das contagens microbianas foram computados em planilha eletrônica e analisados estatisticamente por meio do programa ASSISTAT, utilizando-se análise da variância (ANOVA) e aplicando-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para a comparação das médias dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A população microbiana manteve-se, durante o período estudado, acima do mínimo de 10⁶ células que determinado pela legislação vigente para alimentos probióticos. Estatisticamente, a população de *L. reuteri* não se alterou durante o período estudado. Essa estagnação da população não interferiu na sua condição de alimento probiótico por manter-se acima do determinado pela legislação. O não aumento populacional registrado no período pode ser decorrente do fato da população de probióticos já ser grande demais, não havendo recursos suficientes (substrato) para o seu aumento. É importante ressaltar que estes resultados de viabilidade correspondem a um período de armazenamento de 15 dias. Talvez se o experimento durasse mais tempo, seria possível observar um declínio da população, decorrente do desgaste de nutrientes e acúmulo de produtos do metabolismo, porém, esta situação não se aplica no referido experimento uma vez que, para a elaboração da bebida láctea foi usado leite pasteurizado, cujo prazo de validade comercial é bastante reduzido.

A sobrevivência da cultura probiótica à digestão simulada, independente do dia de estocagem, foi baixa, com contagem cerca de 6 ciclos logarítmicos menor que a média da contagem microbiana antes do processo digestivo simulado. Isso significa que praticamente não houve resistência ao processo digestivo em nenhum dia de armazenamento, pois a população se manteve significativamente menor que a população inicial em todos os dias avaliados. Apenas no décimo dia de armazenamento observou-se a presença de células bacterianas viáveis após a digestão simulada, isso pode ter acontecido por resistência adquirida da cultura, ou melhor adaptação desta ao meio (bebida láctea), tornando-a mais capaz de resistir às variações de pH e enzimas decorrentes do processo de digestão.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura probiótica comercial estudada apresentou-se viável durante 15 dias de estocagem refrigerada quando adicionada em bebida láctea não fermentada achocolatada. No entanto a mesma mostrou-se pouco resistente ao processo digestivo simulado, com redução média de 6 ciclos logarítmicos.

VELOCIDADE DE DERRETIMENTO DE SORVETES FUNCIONAIS PROBIÓTICOS COM E SEM ADIÇÃO DE POLPA DE CAGAITA

Natylane Eufransino Freitas¹, Renata Teixeira Pfrimer¹, Clarice Gebara¹, Lucyana Vieira Costa¹, Cíntia Minafra¹, Valéria Cavicchioli¹, Francine Oliveira¹, Edmar Soares Nicolau¹

¹Centro de Pesquisa em Alimentos, ¹Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

INTRODUÇÃO

A utilização de leite e derivados lácteos pela população mundial tem se tornado cada vez mais expressiva. A criação de produtos funcionais com adição de probióticos como o *Lactobacillus acidophilus* e de prebióticos como a inulina, e outros ingredientes como o soro e leitelho, tem sido uma opção na produção de sorvetes devido ao seu valor nutricional melhorando o sistema imune e modulando a microbiota saudável intestinal, aumentando cada vez mais os benefícios à saúde e bem-estar dos consumidores (Zhao et al., 2020).

A adição de polpas de frutas tem sido uma prática rotineira nas indústrias produtoras de sorvete. A Cagaita (*Eugenia dysenterica*), por exemplo, tem se constituído uma excelente alternativa, devido ao alto rendimento da polpa, baixo valor calórico, além de apresentar aspectos nutricionais, tornando-a favorável para uso comercial.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo investigar a velocidade de derretimento de diferentes formulações de sorvete probiótico utilizando concentrações variáveis de soro e leitelho com adição da polpa da Cagaita (*Eugenia dysenterica*).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram elaboradas nove formulações de sorvetes funcionais probióticos a partir do delineamento *simplex centroide* e duas formulações-controle, com diferentes concentrações de leite padronizado, creme de leite pasteurizado com 35% de gordura, açúcar cristal, emulsificante Marvi – Marvi gel plus e aroma artificial de baunilha Kodilar, adquiridos em comércio varejista de Goiânia-GO. O soro lácteo em pó e o leitelho em pó utilizados nas formulações foram cedidos, respectivamente, pelo Laticínio Lactosul Indústria de Laticínios (Piranhas/GO) e pela Fonterra Brasil (São Paulo/SP).

A pesquisa e as análises foram desenvolvidas no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (CPA/EVZ/UFG). As formulações de sorvete foram produzidas seguindo rigorosamente as Boas Práticas de Fabricação.

O teste de derretimento das amostras foi adaptado da metodologia descrita por Koxholt et al., 2020. Os testes foram realizados em temperatura ambiente, com 50g da amostra que era colocada em uma peneira de aço inox 8x2 tyler 12, abertura de 1.4 mm apoiada na parte superior da balança analítica (AUY220 - Shimadzu, Kyoto, Japão). Uma placa de Petri identificada e previamente seca e tarada para cada amostra, foi colocada embaixo da peneira de inox para coletar e pesar as perdas por derretimento do sorvete ao longo de 70 minutos, com pesagens a cada 10 minutos. O derretimento é definido como a perda de massa por gotejamento dividida pela massa total da amostra de sorvete em relação ao tempo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o comportamento de derretimento dos sorvetes. Observou-se boa estabilidade e baixa taxa de derretimento nas formulações durante os primeiros 20 minutos de análise. As formulações com polpa de cagaita, apresentaram derretimento considerável somente após 30 minutos de análise.

É possível observar que a formulação com maior teor de leite/creme e leitelho (BM26.70) é também a formulação que apresenta maior velocidade de derretimento

estando diretamente relacionado com o maior teor de gordura encontradas nas formulações.

Tabela 1 - Comportamento dos sorvetes funcionais probióticos durante o teste de velocidade de derretimento (g/min, a cada 10 minutos).

Tempo (min.)	Derretimento das formulações (g/min)					
	W26.70	BM26.70	WBM13.35	WC20.70	BMC20.70	WBMC10.35
10	0,11	0,08	0,21	0,07	0,01	0,05
20	0,74	0,60	0,82	0,11	0,04	0,09
30	1,71	2,18	2,10	0,38	0,21	0,35
40	3,20	3,99	3,40	0,70	0,96	1,04
50	4,00	5,14	4,18	0,98	1,99	2,00
60	4,19	—	4,37	1,17	3,03	2,81

W26.70: 62.30% leite/creme e 26.70% de soro; **BM26.70:** 62.30% de leite/creme e 26.70% de leite; **WBM13.35:** 62.30% de leite/creme, 13.35% de soro e 13.35% de leite; **WC20.70:** 48.30% de leite/creme, 20.70% de soro e 20% de polpa de cagaita; **BMC20.70:** 48.30% de leite/creme, 20.70% de leite e 20% de polpa de cagaita; **WBMC10.35:** 48.30% de leite/creme, 10.35% de soro, 10.35% de leite e 20% de polpa de cagaita.

Todas as formulações continham cultura de *Lactobacillus acidophilus*

As altas concentrações de soro nos sorvetes funcionais deste estudo foram capazes de influenciar diretamente sobre a capacidade de retenção de água nas fórmulas estudadas, levando assim a uma maior estabilidade das lamelas entre as bolhas de ar e por consequência, um maior tempo de derretimento do produto.

Dados semelhantes foram encontrados por Meneses et al. (2020), onde foi possível observar menores taxas de derretimento/minuto nas amostras de sorvetes que apresentaram em sua composição uma concentração maior de soro e leite, corroborando assim com os achados neste estudo. As taxas de velocidade de derretimento dos sorvetes simbióticos deste trabalho foram menores do que os trabalhos descritos por Di Criscio et al., 2010, onde obtiveram taxas de derretimento variando de 1,98 a 2,50 g/min.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os sorvetes funcionais probióticos com e sem adição de polpa de cagaita apresentaram grande estabilidade para carrear cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus*, sendo que, as formulações com adição de polpa de cagaita apresentaram menores velocidades de derretimento, diferentemente da formulação com maior concentração de leite e sem adição de polpa, que apresentou maior velocidade de derretimento. A avaliação da velocidade de derretimento de sorvetes é importante para o armazenamento adequado do produto e a manutenção de sua qualidade, bem como a manutenção de suas características sensoriais e funcionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Koxholt MMR, Eisenmann B, Hinrichs J. Effect of the Fat Globule Sizes on the Meltdown of Ice Cream. **Jounal Dairy Science**. 2001; 84(1):31–7.
- Meneses RB, Silva MS, Monteiro MLG, et al. Effect of dairy by-products as milk replacers on quality attributes of ice cream. **Jounal Dairy Science**. 2020;103(11):10022–35
- Zhao W, Liu Y, Kwok LY, et al. The immune regulatory role of *Lactobacillus acidophilus*: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. **Food Bioscience**. 2020; 36:100656.
- Di Criscio T, Fratianni A, Mignogna R, et al. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. **Jounal Dairy Science**. 2010, 93(10):4555–64.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (CPA-EVZ-UFG) por ter cedido suas instalações e equipamentos para a realização deste trabalho, além do financiamento dos materiais e reagentes necessários. Ao Laticínio Lactosul Indústria de Laticínios pela doação do soro lácteo em pó. À empresa Sacco pela doação da cultura probiótica liofilizada da cepa de *Lactobacillus acidophilus*.

Área Temática 08: PROGRAMAS DE
AUTOCONTROLE

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA CLOREXIDINA E DETERGENTES NEUTRO, ÁCIDO E ALCALINO-CLORADO SOB BIOFILME BACTERIANO EM MATERIAL DE SALA DE ORDENHA

Pedro Rassier dos Santos¹, Rosana Basso Kraus¹, Silvia Leal Ladeira², Giselda Maria Pereira³, Kamila Furtado da Cunha¹, Helenice Gonzalez de Lima⁴, Natasha Deboni Cereser⁴, Patrícia da Silva Nascente¹

¹Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil. ²Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil. ³Instituto de Física e Matemática, Departamento de Matemática e Estatística, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil. ⁴Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão

INTRODUÇÃO

O leite coletado no Brasil tem apresentado alguns problemas na sua qualidade, como a alta contagem de micro-organismos (Carvalho et al., 2018). Entre outros fatores, a capacidade das bactérias em formarem biofilme nas plantas de processamentos do leite e dentro das salas de ordenha, acaba trazendo um efeito negativo na economia da produção, pois os biofilmes conferem uma maior resistência às bactérias frente a agentes de desinfecção e limpeza, favorecendo a contaminação cruzada pós processamento e reduzindo a vida útil do produto (Anand et al., 2014).

Segundo Paschoal (2014) os equipamentos que auxiliam na ordenha podem contribuir com cerca de 10% da carga microbiana do leite em condições experimentais, podendo este valor aumentar caso a estrutura ou a limpeza dos equipamentos sejam precárias. Uma alternativa para minimizar os riscos de contaminação microbiana dentro da bovinocultura leiteira é a aplicação de Boas Práticas de Produção (BPP) nas diferentes etapas do processo (Vallin et al., 2009). De acordo com Gleeson et al. (2009) as teteiras da ordenhadeira mecânica são tidas como a maior causa de contaminação entre as vacas, o que pode ser reduzido através do adequado manejo pré-ordenha.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade dos detergentes neutro, ácido e alcalino-clorado, utilizados na higienização dos equipamentos e de solução à base de clorexidina 2%, comumente utilizados nas técnicas de pré e pós-dipping sob o biofilme de bactérias isoladas de teteiras em salas de ordenha.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas *Enterococcus faecalis* (10), *Enterococcus faecium* (4), *Staphylococcus intermedius* (1), *Streptococcus uberis* (1), *Streptococcus dysgalactiae* (1) e as ATCC's 25904, 12600 e 51299.

Cada inoculo foi preparado em água destilada estéril a uma concentração de 1,5x10⁸ Unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Para o teste de formação de biofilme, foram confeccionados corpos de prova a partir de fragmentos PVC de 1cm de comprimento, a fim de deixá-los suspensos em placas de 24 poços (Peralta et al., 2015). Adicionou-se 1,8 mL de caldo BHI a cada poço da placa, seguido por 180 µL de cada inoculo. O material foi incubado a 37°C por 72h e o meio de cultura foi trocado a cada 24 horas. A ação da clorexidina e dos detergentes foi avaliada nas 48 horas, entre as trocas de meio de cultura, onde os corpos de prova ficaram por 10 minutos.

Ao final de 72h, cada PVC foi retirado cuidadosamente, lavadas em solução de NaCl 0,9%, transferidas para um eppendorf com 1mL de solução de NaCl 0,9% e sonicadas por 30s a 30W. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas das suspensões até a diluição 10⁻⁷. Todas as amostras foram semeadas em ágar BHI com duas alíquotas de 10µL de cada eppendorf e posteriormente incubadas a 37°C por 24h

para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), aplicando a seguinte equação: $UFC = (n^{\circ} UFC/volume \text{ de inóculo}) \times \text{diluição}$. O experimento foi realizado em triplicata, cada placa possuía um controle negativo sem inóculo. A concentração de 104 foi utilizada como padrão para a estatística.

Para avaliar a ação dos detergentes e da clorexidina, foi utilizado um controle de cada isolado testado, sem exposição aos produtos, para posterior comparação. Os dados obtidos foram não-paramétricos e por isso foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, indicado para amostras independentes, considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média obtida entre todos os isolados com relação a formação do biofilme em UFC/cm² de biofilme foi de 0,1183 (DP: 0,1616) para os controles (sem ação de produto), 0,1140 (DP: 0,1639) após a ação do detergente neutro, 0,0823 (DP: 0,1014) para o ácido e 0,1116 (DP: 0,1306) para a ação do detergente alcalino-clorado. A média obtida após a ação da clorexidina foi de 0,0031 (DP: 0,0220).

Após análise estatística observou-se que somente as amostras avaliadas com a clorexidina tiveram redução na formação do biofilme. A clorexidina é recomendada para a realização do pré-dipping e com esses resultados podemos salientar a importância desta etapa dentro da sala de ordenha, visto que após os micro-organismos se instalarem nos equipamentos, há uma maior dificuldade de eliminação, já que nenhum dos detergentes testados neste experimento foram eficazes. Por isso, salienta-se a importância de uma rotina de procedimentos sanitários de todos os equipamentos dentro da sala de ordenha e a avaliação periódica da eficácia dos produtos utilizados, visto que as despesas com tratamento preventivo, representaram, no máximo, 9,2% do impacto econômico gerado pela mastite (Demeu et al., 2011). Dos Santos et al., avaliaram em 2018 a ação de desinfetantes em *Staphylococcus spp.* e também observaram que a clorexidina 2% foi a que obteve melhores resultados sendo superiores a 95% de eficácia.

Com relação a ação dos detergentes neutro, ácido e alcalino-clorado, não obtivemos resultados satisfatórios mesmo seguindo as indicações dos fabricantes quanto ao modo de aplicação e isso pode estar relacionado a grande quantidade de exopolissacarídeos que são encontrados nos biofilmes e que acabam dificultando o acesso às células (Boari, et al., 2009). Mesmo que os detergentes possam ter desintegrado em parte os biofilmes, nossa leitura foi realizada 24h após o contato com os mesmos, o que pode ter permitido a multiplicação bacteriana e reestruturação do biofilme.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados aqui reforçam a importância de uma boa estratégia sanitária dentro dos rebanhos que diminua as chances de contaminação dos tetos e equipamentos dentro da sala de ordenha, visto que os biofilmes após estabelecidos, dificultam a ação dos produtos aqui testados, sendo reduzidos apenas pela ação da clorexidina 2%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boari C.A., Alves M.P., Tebaldi V.M.R., Savian T.V. & Piccoli R.H. 2009. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 29(4): 886-895.

Demeu, Fabiana Alves et al. Influence of involuntary of matrices culling on the economic impact of mastitis in dairy herd. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 195-202, 2011.

Dos Santos, Isabela Carvalho et al. Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados no pré-dipping frente a amostras de *Staphylococcus spp.* **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 3, n. 1, p. 4, 2018.

RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE BRASILEIRO: REVISÃO

Lucyana Vieira Costa¹, Clarice Gebara¹, Natylane Eufransino Freitas¹, Valéria Quintana Cavicchioli¹, Francine Oliveira¹, Moacir Evandro Lage¹, Osana Zacaroni², Cintia Minafra¹

¹Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA), Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Brasil. ²Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Brasil

INTRODUÇÃO

Antibióticos são utilizados na produção animal na terapêutica, como método profilático e como promotores de crescimento (Ram et al., 2017). Resíduos de antimicrobianos correspondem à fração que foi acumulada nas células, tecidos ou órgãos e que permanecem farmacologicamente ativos (*Codex Alimentarius Commission*, 2018). Estes resíduos podem ocasionar desenvolvimento de bactérias resistentes que quando expostas à tríade animal, ambiente e homem os expõe a risco (Hanna et al., 2018).

Para definir a presença máxima de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal, utiliza-se o valor de “limite máximo de resíduos” (LMR), sendo este estabelecido por diferentes órgãos reguladores (*Codex Alimentarius Commission*, 2018). Dentre várias consequências do consumo de produtos alimentícios com valores acima do LMR permitido, ressalta-se o desenvolvimento de reações carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas, além de distúrbios reprodutivos e reações alérgicas (Bacanli & Başaran, 2019).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Instrução Normativa nº 76 (Brasil, 2018) estabeleceu critérios de avaliação da qualidade do leite e dentre eles, a verificação de resíduos de medicamentos veterinários, como os antibióticos. Deste modo, considerando a importância de produção de leite e produtos lácteos seguros e a utilização de antimicrobianos em vacas leiteiras, muitas vezes empregados de forma errônea, procedeu-se pesquisa bibliográfica sobre a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada nos portais de pesquisa Scielo e no Portal de Periódicos da Capes, entre os meses de junho e julho de 2022. Foram utilizados artigos científicos, artigos de revistas, dissertações e teses. Como mecanismo de busca de artigos foram utilizadas palavras-chave como: “milk”, “antibiotic residues” e “Brazil”. Essas palavras foram interligadas através do operador booleano “AND”, com o propósito de expandir o escopo de artigos a serem encontrados. Para organização da revisão, utilizou-se a seguinte questão norteadora: “Qual a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite produzidos no Brasil?”. Foram adotados os seguintes critérios de inclusão para seleção dos artigos: ano de execução da pesquisa, ano de publicação, região do Brasil que foi realizado o trabalho, método de análise dos resíduos e relevância do estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Novaes et al. (2017) observaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite pasteurizado com concentrações superiores ao LMR nas cinco regiões brasileiras, sendo 17% das amostras com resíduos de enrofloxacin, 25% com ciprofloxacina e 15% com norfloxacina. Para as tetraciclinas, detectou-se 12% de clortetraciclina, 31% de oxitetraciclina, 14% de tetraciclina e 9% de doxiciclina.

Na Tabela 1, estão descritos alguns trabalhos realizados nos últimos sete anos no país. Destaque para os que foram realizados com leite pasteurizado e encontraram

resíduos, confirmando que a pasteurização e a ultrapasteurização (UHT) não são capazes de neutralizar os antimicrobianos (Tian et al., 2017).

Tabela 1 – Estudos que avaliaram a presença de resíduos de antimicrobianos em estados do Brasil.

Autores	Estado	Resultado		Método	Amostra de leite
		Estado positivo (%)			
Motta et al. (2015)	SP	59,0		Inibição bacteriana	Cru
Silva et al. (2015)	GO	5,3		Inibição bacteriana	Cru
		1,9			Pasteurizado
		1,2			UHT
Galvani (2016)	RS	24,7		Cromatografia	Cru
Picinin et al. (2017)	MG	30,3		Cromatografia	Cru
Schlemper e Sachet (2017)	PR	17,0		Imunoenzi- mático	Pasteurizado
		10,1			Cru

Fonte: Elaborada pelos autores (2022)

Silva (2020) avaliou leite integral, semidesnatado e desnatado e foram encontrados resíduos de monensina em 32,5% das amostras, contudo em valores inferiores ao LMR (2 µg kg⁻¹). Neste estudo não foram encontrados resíduos de antibiótico em leite desnatado, demonstrando a natureza apolar dos antibióticos e a necessidade da gordura como carreador. Nos demais tipos de leite, 78% das amostras detectadas com monensina era de leite integral e 22% de leite semidesnatado.

Mais recentemente, Valença et al. (2021) encontraram resíduos de tetraciclina e β-lactâmicos em leite inspecionado em Pernambuco, inclusive, com concentrações superiores ao limite de detecção. Em Roraima, Silva et al. (2022) ao avaliarem leite cru e pasteurizado, encontraram 14,0 e 50,0%, respectivamente, das amostras com resíduos de antimicrobianos. Diante disso, deve-se contar com assistência de médicos veterinários para o uso racional de antimicrobianos, evitando o uso excessivo e respeitando o período de carência, afim de não haver resíduos acima do limite permitido por lei. Ressalta-se também a necessidade da avaliação periódica de tais resíduos no leite cru, conforme estabelecido pela IN 76/2018.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resíduos de antimicrobianos podem ser encontrados em leite cru, pasteurizado e UHT, produzidos nos diferentes estados brasileiros. São necessários mais estudos e investigações acerca da real ocorrência de resíduos em lácteos, a fim de se estabelecer medidas de controle, garantindo assim, a eficácia no tratamento dos animais doentes com uso de antimicrobianos, a proteção a saúde humana e a limitação da resistência bacteriana. O uso racional de antimicrobianos é uma medida indispensável para reduzir a ocorrência destes resíduos nos alimentos de origem animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bacanli, M.; Başaran, N. Importance of antibiotic residues in animal food. **Food and Chemical Toxicology**, n. 125, p.462–466, 2019.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. **Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018**. Diário Oficial da União: p.9, seção 1.

Codex Alimentarius Commission. **Veterinary drugs**, 2018. Acesso em: 25 junho 2022. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimenta>

Tian L, Khalil S, Bayen S. Effect of thermal treatments on the degradation of antibiotic residues in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2017, 57: 3760–3770.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (CPA-EVZ-UFG) pela concessão da bolsa de doutorado e apoio à realização do trabalho.

Área temática 9: PQFL

AVALIAÇÃO DA CONFORMIDADE DOS REQUISITOS DE QUALIDADE DO LEITE BUBALINO PRESENTE EM LEGISLAÇÃO ESTADUAL PAULISTA

Lisangela Veiga Trevisan¹, Tamiris Alves dos Santos¹, Marcelo Giuliani Ament dos Santos², Lívia Castelani³, Rodrigo Giglioti³, Lenira El Faro³, Luiz Carlos Roma Júnior³

¹Mestranda, Instituto de Zootecnia APTA, Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Nova Odessa, SP. ²Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - CATI, Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Itapetininga, SP. ³Professor, Instituto de Zootecnia APTA, Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Nova Odessa, SP

INTRODUÇÃO

A produção leiteira mundial envolve bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, entre outras espécies. Dentre estas, o leite bubalino está em segundo lugar no aspecto de consumo, atrás apenas do leite bovino. O leite bubalino tem valor nutricional superior e por isso é muito utilizado para produção de derivados lácteos como manteiga, iogurte, queijos e sorvetes.

Para a produção de derivados, a qualidade do leite torna-se fundamental para garantir o processamento e o produto final. Para isso, a legislação nacional aborda os aspectos de produção e qualidade do leite bovino com suas instruções normativas e legislações. Porém, para o leite bubalino os aspectos de qualidade são abordados na resolução estadual, SAA 03 da Secretaria da Agricultura e Abastecimento, de 2008 (SÃO PAULO, 2008). Com relação aos outros países, a União Europeia possui regulamentação para leite bubalino, determinando parâmetros mínimos de qualidade (UNIÃO EUROPEIA, 2004).

A padronização da qualidade é ponto fundamental para sustentabilidade da cadeia produtiva, além de contribuir para a variedade de produtos e produção de alimentos seguros para o consumidor. Devido à escassez de dados sobre os padrões de qualidade do leite bubalino, se faz necessário conhecer sobre os parâmetros do leite produzido e assim identificar aspectos que merecem mais estudos e melhorias para atingir qualidade igual ou superior à de países de referência em produtos lácteos bubalinos. Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar se o atendimento aos requisitos de qualidade interfere na quantidade e qualidade do leite bubalino captado.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 19 propriedades de produção de leite bubalino localizadas na região de Sarapuí, no Estado de São Paulo, com produção média de 110 litros/dia, rebanho médio de 61 cabeças e área média de 35,5 ha. A qualidade do leite de cada propriedade foi avaliada mensalmente no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019. As amostras de leite do tanque de resfriamento foram colhidas em frascos contendo conservante Azidiol® para contagem padrão em placa (CPP) e conservante Bronopol® para determinação da composição centesimal do leite e contagem de células somáticas (CCS). Os frascos foram mantidos sob refrigeração e encaminhados para realização das análises no laboratório Clínica do Leite.

Para avaliar a conformidade, foram utilizados como parâmetros mínimos de qualidade do leite de búfala presentes na Resolução 03 da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SÃO PAULO, 2008), que estabelecem o teor mínimo de gordura de 4,5%, Extrato Seco Desengordurado mínimo de 8,57%, CPP de no máximo 500 x10³ UFC/mL. Para a CCS, foi utilizado o padrão referenciado na legislação da União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2004) com valor máximo de 400 x10³ cs/mL para leite bubalino.

Para análise estatística, foi realizada média da qualidade do leite de todas as amostras ("Grupo 1") comparadas em relação a média da qualidade do leite apenas das

amostras que atenderem todos os requisitos de qualidade citados (“Grupo 2”). Cada variável foi analisada individualmente por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o procedimento PROC MIXED do pacote estatístico SAS, sendo que para as variáveis CCS e CPP tiveram os valores transformados em escala logarítmica para garantir a distribuição normal dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 703 amostras analisadas, 60% delas não atenderam a resolução paulista, que determina padrões de qualidade de leite, demonstrando necessidade do desenvolvimento de metodologias de extensão rural e transferência de conhecimento técnico, com auxílio das indústrias para melhoria da qualidade do leite cru obtido.

Comparando o leite total obtido ao leite que atende a legislação, houve diferença significativa para CPP. A alta CPP é indicativa de problemas de higiene no processo de obtenção do leite cru e/ou falhas na temperatura de armazenamento do leite. Isso diminui a qualidade microbiológica do leite e o tempo de prateleira, interferindo no processamento dos derivados (Godinho et al, 2020).

Neste estudo observamos que o leite bubalino que atende a legislação possui qualidade superior às exigências da resolução, igualando as características a países que produzem leite e produtos há mais tempo e possuem descrição de qualidade. Na tabela 1, observa-se que para o atendimento da resolução, a indústria deixaria de captar mensalmente média de 16.762 litros (30%). Esse volume, 30% do leite necessitam de atenção, melhorias e capacitação dos produtores para gerar produtos de qualidade com uma matéria prima adequada.

Tabela 1 - Médias dos parâmetros de qualidade do leite de búfalas para os grupos estudados no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2019.

	Grupo 1	Grupo 2	P
Número de amostras	703	276	
Contagem Padrão em Placas, 1000 UFC/mL	1110	118	0,0001
Gordura, %	5,88	5,97	0,1505
Proteína, %	4,09	4,12	0,3090
Lactose, %	4,99	4,99	0,3358
Extrato Seco Desengordurado, %	10,04	10,08	0,9009
Contagem de Células Somáticas, 1000 cs/mL	165	146	0,3964
Nitrogênio Uréico do Leite, mg/dL	12,77	12,81	0,8340

Produção de Leite, litros/mês

56.230

39.416

Grupo 1: média do total de amostras analisadas; Grupo 2: média das amostras que atendem os requisitos de qualidade.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O leite bubalino estudado apresentou qualidade do leite adequada nos aspectos de composição centesimal, porém mostrou deficiência no aspecto higiênico em atendimento a legislação estadual em questão. Para que ocorra melhoria dos produtos ao mercado consumidor se faz necessário garantia da qualidade da matéria prima e seguir normas e leis atualizadas e adaptadas para o cenário brasileiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Godinho, F. M. S.; Krug, M.; Figueiredo, R. P.; Muller, A.; Jank, L.; Tomaszewski, C.; Hillesheim, D. R.; Kinast, É. J.; Frazzon, A. P. G.; Motta, A. S. Microbiological and physicochemical [...]. **Journal of [...]**, First View , p. 1 – 6, 2020;
SÃO PAULO. Resolução SAA-03 de 10 de jan. de 2008. Que baixa normas técnicas sobre [...]. **Diário Oficial do [...]**, n. 118, v. 7, cap. 31, 11 jan. 2008;
UNIÃO EUROPEIA, regulamento (CE) N° 853/2004. Estabelece regras específicas de [...]. Parlamento europeu e [...]. **Jornal Oficial da [...]**, n.L 139/55, 30 de abril de 2004, p. 226/22-226/82.

DIAGNÓSTICO INICIAL DO NÍVEL DE BOAS PRÁTICAS AGROPECUÁRIAS NAS UPL DO PROGRAMA LEITE SEGURO

Rogério M. Dereti¹, Maira B. Zanela², Isabelle D. V. Angelo³, Eduarda P. Damian³, Michele B. Wachholz³, Marta E. B. Oyarzabal³, Adriana Hauser³, Waldyr Stumpf Junior²

¹Analista da Embrapa Gado de Leite. ²Pesquisador da Embrapa Clima Temperado.

³Bolsista do CNPq no Programa Leite Seguro da Embrapa Clima Temperado

INTRODUÇÃO

O Plano de Qualificação de Fornecedores de Leite (PQFL) tem como objetivo capacitar os produtores rurais, aprimorando a adoção de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) nos sistemas produtivos. Isso resultará no aumento da produtividade e na profissionalização da pecuária leiteira, na melhoria da qualidade da matéria-prima e em maior eficiência dos processos e rendimento dos produtos lácteos, o que tornará a cadeia leiteira nacional mais competitiva.

A Ferramenta Protambo é um instrumento de abordagem semiológica, desenvolvido e validado pela Embrapa (Dereti et al., 2019), que permite o conhecimento do nível de adoção das BPA nas Unidades de Produção de Leite (UPL) por meio da avaliação de grupos de indicadores associados em áreas-chaves, baseada no Guia de BPA na Pecuária de Leite da FAO/IDF (2013), podendo ser utilizada como modelo para os laticínios no PQFL.

O objetivo desse trabalho é apresentar o diagnóstico das práticas adotadas e o nível de conformidade frente aos indicadores de BPA utilizados na Ferramenta Protambo na etapa inicial do acompanhamento das UPL participantes do Programa Leite Seguro.

MATERIAL E MÉTODOS

Dez técnicos de campo vinculados ao Programa Leite Seguro foram capacitados para aplicar a Ferramenta Protambo de diagnóstico de Boas Práticas Agropecuárias (BPA). Foram selecionadas 169 unidades de produção de leite (UPL) na região Sul do País segundo os seguintes critérios de elegibilidade: vínculo a uma instituição parceira do projeto; disposição dos produtores em participar de um programa de boas práticas e de adotar as práticas/mudanças pactuadas com os técnicos; garantia de acesso às fazendas sempre que necessário; disposição quanto à cessão dos dados obtidos; e não participação em outro programa concomitante.

No período de fevereiro a julho de 2022, cada UPL foi visitada mensalmente por um técnico de campo que observou aspectos objetivos (indicadores), referentes às práticas agropecuárias adotadas, e divididos em seis áreas-chave: Saúde Animal; Higiene de Ordenha e Qualidade do Leite; Alimentos e Água; Bem-Estar Animal; Meio Ambiente; e Gestão Socioeconômica. Os grupos de indicadores foram avaliados segundo a metodologia desenvolvida por Dereti et al. (2019) seguindo escala estratificada: abaixo do esperado (-2); abaixo do esperado (-1); dentro do esperado (0); acima do esperado (1); e acima do esperado (2). A avaliação foi registrada em aplicativo de dispositivo móvel (ODK Collect).

Após a avaliação de cada grupo de indicadores, foi aplicado um modelo matemático para obter-se um resultado único para cada área-chave, dado em uma escala de 0 a 10, a fim de definir o nível de adoção de boas práticas conforme a seguir: práticas precárias (0 a 2,0), práticas insuficientes (2,1 a 5,0), padrão de conformidade (5,1 a 7,0), padrão de referência (7,1 a 9,0) e padrão de excelência (9,1 a 10,0). Os dados foram analisados por estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o percentual de UPL segundo o nível de adoção das BPA nas áreas-chave da Ferramenta Protambo. Na maior parte das UPL foram identificadas práticas insuficientes nas áreas chaves de Saúde Animal, Higiene de Ordenha e Qualidade do Leite, Alimentos e Água, Bem-Estar Animal, e Meio Ambiente. São consideradas insuficientes as práticas inadequadas, ineficazes, inconsistentes, mal executadas, com resultados abaixo do esperado ou inexistentes. Na área de Gestão Socioeconômica, na maior parte das UPL, foram constatadas práticas precárias, indicando inexistência de determinadas práticas ou práticas inadequadas, ineficazes, inconsistentes ou mal executadas, com resultados abaixo do esperado ou inexistentes, associados a indicadores que ameaçam diretamente a segurança do alimento.

O padrão de conformidade, definido como o nível de adoção em que as BPA são constatadas e seus efeitos são observáveis diretamente ou indiretamente no contexto de sua aplicação pela ausência de um dano a ser evitado, foi atingido por menos do 20% das UPL em todas as áreas chaves. A quantidade de UPL com padrão de excelência nas diferentes áreas chaves variou entre 0,5 e 6,0%, indicando um baixo nível de adoção de práticas que promovem resultados acima dos níveis esperados de forma consistente. Só 0,5 a 1,0% das UPL nas áreas de Alimentos e Água e Higiene da Ordenha e Qualidade do Leite, respectivamente, adotaram práticas de forma a obter resultados máximos possíveis de forma consistente, ou seja, com padrão de excelência. Os resultados corroboram levantamento anterior (Dereti et al., 2019).

Tabela 1 - Diagnóstico dos níveis de adoção de boas práticas agropecuárias avaliados pela Ferramenta Protambo nas Unidades de Produção de Leite acompanhadas pelo Programa Leite Seguro no primeiro semestre de 2022.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As deficiências encontradas em todas as áreas-chave das BPA constituem enorme desafio para toda a cadeia produtiva, uma vez que o impacto do problema se estende do produtor ao consumidor. As relações entre os segmentos da cadeia influenciam o alcance e eficácia das eventuais soluções. O PQFL torna explícita esta interdependência entre segmentos e preconiza o diagnóstico dos sistemas de produção e da qualidade do leite para a elaboração de planos de ação detalhados e específicos para ajuste das não conformidades. A Ferramenta Protambo de Diagnóstico das BPA em Sistemas de Produção de Leite constitui instrumento validado para esta finalidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Defesa de Direito Difuso do Consumidor pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dereti, R. M.; Goncalves, E. B.; Zanela, M. B.; Schafhauser Junior, J.; Alvarenga, M. B. Boas práticas agropecuárias na produção leiteira: diagnóstico e ajuste de não conformidades.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 71, n. 6, p. 2075-2084, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/3KbC4ycmxvPRT5MT8NQ33Dp/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: 05 ago. 2021.

FAO/IDF. Guia de boas práticas na pecuária de leite: Produção e Saúde Animal Diretrizes. Roma, 2013. 40p. Disponível em:
<http://www.fao.org/3/ba0027pt/ba0027pt.pdf> Acesso em: 05 ago. 2021.

EFETIVIDADE DA TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA E SUA RELAÇÃO COM MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE

Tamiris Alves dos Santos¹, Fernando Bueno¹, Lívia Castelani¹, Lenira El Faro Zadra², João José Assumpção de Abreu Demarchi¹, Weber Vilas Boas Soares¹, Guilherme Geraldi Hyppolito¹, Luiz Carlos Roma Júnior¹

¹Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, São Paulo, Brasil. ²Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

A produção leiteira por pequenos produtores geralmente é constituída por mão de obra familiar, com conhecimentos compartilhados por gerações. Entretanto, a demanda da cadeia produtiva exige a constante capacitação, visando aumento da produção, melhoria da qualidade e atendimento à legislação vigente (Conterato et al., 2007).

As tendências evidenciam que as atividades leiteiras de sucesso serão aquelas que apresentarem eficiência e sustentabilidade na produção de leite de qualidade e, somente estas poderão competir por mercados consumidores. O alcance desta eficiência e sustentabilidade pode ser atingido, principalmente, por meio da transferência de tecnologias já comprovadas. A transferência e difusão de tecnologia, produção e comercialização úteis e sustentáveis aos produtores rurais por meio de métodos educativos é a missão da extensão rural (Araújo, 2007).

A qualidade do leite pode ser útil no processo pela busca em eficiência e sustentabilidade por meio das informações fornecidas pelas análises do leite para auxiliar os produtores e técnicos envolvidos. Outro aspecto seria o pagamento por qualidade aplicado pelas indústrias que pode contribuir com a rentabilidade das propriedades. E por fim, além das indústrias, é importante ressaltar a legislação vigente que reforça os limites de qualidade do leite produzido, incluindo aspectos de composição, sanitários e higiênicos.

Assim, diante das exigências legais para qualidade do leite, o treinamento pode trazer promissores resultados por meio de transferência de tecnologia para os produtores. Destarte, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da transferência de conhecimento na melhoria da qualidade do leite.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em 23 propriedades com área média de 18 ha destinada para a produção de leite, localizadas na região Nordeste do Estado de São Paulo. Os rebanhos eram constituídos de animais mestiços, com produção média de 170 litros/leite/dia.

Inicialmente, os produtores receberam de profissionais especializados treinamentos teórico-práticos sobre os temas: produção higiênica, reprodução, melhoramento genético, nutrição e sanidade animal. Ao término de cada treinamento, cada produtor respondeu a uma avaliação de conhecimento técnico contendo 20 questões de múltipla escolha.

Após os treinamentos, a qualidade do leite do tanque de resfriamento de cada propriedade foi avaliada mensalmente nos períodos de janeiro a junho (ano 1) e janeiro a junho (ano 2). As amostras de leite foram acondicionadas em frascos contendo conservante Azidiol® para contagem padrão em placa (CPP) e conservante Bronopol® para determinação da gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado (ESD),

nitrogênio uréico no leite (NUL), contagem de células somáticas (CCS). Os frascos foram mantidos sob refrigeração e encaminhados para realização das análises no laboratório Clínica do Leite/ESALQ/USP.

Os resultados de CCS foram transformados em escore linear de células somáticas (ECS), de acordo com Shook (1982). Para a CPP (x1.000 UFC/mL) foi realizada transformação logarítmica na base 10. As médias das avaliações de conhecimento e das variáveis de qualidade do leite estudadas para cada grupo nos dois períodos avaliados (ano 1 e ano 2) foram comparadas pelo teste T-pareado, com 95% de confiança. Os resultados foram analisados pelo pacote estatístico SAS, versão 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as notas da avaliação de conhecimento técnico no início e final do experimento, os produtores foram separados em dois grupos: grupo P – produtores que permaneceram com a mesma nota de conhecimento e grupo M – produtores que melhoraram a nota dos seus conhecimentos (Tabela 1).

Para o grupo P, observaram-se diminuições significativas nos teores de gordura e NUL. Estes resultados podem indicar dificuldade do produtor em termos de nutrição, mais voltado para os aspectos de volumoso e inclusão de fibra, mas também ao balanceamento da dieta em termos de energia:proteína.

Tabela 1 - Valores médios e significância para as notas de avaliação de conhecimento e parâmetros de qualidade do leite dos grupos de produtores estudados.

Variáveis	GRUPO P (n=12)			GRUPO M (n=11)		
	Ano 1	Ano 2	P	Ano 1	Ano 2	P
Nota das Avaliações de Conhecimento	6,41	6,31	0,6810	6,38b	7,68a	0,0191
Gordura %	3,77a	3,65b	0,0225	3,56	3,66	0,7674
Proteína %	3,3	3,3	0,7635	3,29b	3,39a	0,0039
Lactose %	4,44	4,45	0,7627	4,43	4,47	0,1054
Extrato Seco Desengordurado %	8,72	8,74	0,4032	8,66b	8,81a	0,001
Nitrogênio Uréico, mg/dL	13,80a	3,40b	0,0236	12,1	12,8	0,243
Contagem de células somáticas, 1000 cels/mL	594	456	0,3038	547a	383b	0,0333
Contagem padrão em placa, 1000 UFC/mL	331	566	0,3799	657	331	0,1512

Médias seguidas por letras diferentes dentro do mesmo grupo diferem entre si, nível de significância de 5%.

O grupo M apresentou aumento significativo para os teores de proteína e ESD, que são aspectos também relacionados com manejo nutricional, e diminuição da CCS, mostrando preocupação com aspectos de controle da mastite. Importante ressaltar que esta diminuição permite classificar o leite dentro do padrão da legislação em vigor. Fato este que não ocorria no ano 1.

Apesar de todos os produtores terem recebido treinamento, apenas parte apresentou resposta satisfatória na melhoria da qualidade do leite. São necessários mais estudos para o entendimento da efetividade da transferência de conhecimento, relacionando com as características das propriedades e principalmente dos produtores, uma vez que essa transferência exige uma disruptura de conhecimentos prévios.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que o ganho efetivo em conhecimento através de treinamento técnico para produtores leiteiros colabora com a melhoria da qualidade do leite, principalmente em aspectos relacionados à composição e a mastite.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Processo nº 2010/20893-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, R.T. A política nacional de assistência técnica e extensão rural (PNATER) e o novo perfil profissional do médico veterinário. **Ens. Ciênc.**, v.5, p.96-98, 2007;

Conterato, M.A. et al. A dinâmica agrícola do desenvolvimento da agricultura familiar no Alto Uruguai, **RS: suas metamorfoses e reações locais**. In: TONNEAU, P.; SABOURIN, E. Agricultura familiar, interação entre políticas públicas e desenvolvimento local. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007.

Shook, G.E. Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. In: **National Mastitis Council**, 21, 1982, Washington. Proceedings... Washington, D.C.: 1982b. p.150-66.

EVOLUÇÃO DOS INDICADORES DE QUALIDADE DO LEITE NAS UPL DO PROGRAMA LEITE SEGURO: RESULTADOS INICIAIS

Maira B. Zanela¹, Rogério M. Dereti², Melissa G. Méndez³, Adriana Hauser³, Laura A. L. Mews³, Paulo H. A. Delabary³, Stefan D. Nachtigall³, Rosângela S. Barbosa¹

¹Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado. ²Analista da Embrapa Gado de Leite.

³Bolsista do CNPq no Programa Leite Seguro da Embrapa Clima Temperado

INTRODUÇÃO

O Plano de Qualificação de Fornecedores de Leite (PQFL) tem como objetivo capacitar os produtores rurais, aprimorando a adoção de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) nos sistemas produtivos e promovendo o atendimento aos requisitos de qualidade e segurança do leite estabelecidos pelas INs 76 e 77 (Brasil, 2018). Metodologicamente, o PQFL deve contemplar um diagnóstico inicial do sistema de produção e da qualidade do leite e adoção de BPA que guiam a elaboração de um plano de ação detalhado e específico para o ajuste das não conformidades. O plano de ação deve conter indicadores de gerenciamento mensuráveis que possam ser acompanhados e monitorados para avaliar a eficácia do mesmo.

A Ferramenta Protambo é uma tecnologia da Embrapa (Dereti et al., 2019) utilizada para realização do diagnóstico do nível de adoção das BPA nas Unidades de Produção de Leite (UPL), baseada no guia da FAO/IDF (2013), podendo ser utilizada como modelo para os laticínios no PQFL. O uso do diagnóstico e o estabelecimento dos planos de ajustes podem ser avaliados pelas melhorias nos sistemas de produção, qualidade e segurança do leite.

O objetivo desse trabalho é apresentar os resultados iniciais da evolução dos indicadores de qualidade do leite, após a realização do diagnóstico de BPA e implementação de planos de ajustes na área-chave de Higiene de Ordenha e Qualidade do Leite nas UPL acompanhadas pelo Programa Leite Seguro.

MATERIAL E MÉTODOS

O Programa Leite Seguro possui parcerias com laticínios da Região Sul do Brasil. Inicialmente, estão sendo acompanhadas 169 UPL por dez técnicos de campo vinculados ao Programa e capacitados para aplicação da Ferramenta Protambo.

No período de fevereiro a julho de 2022, cada UPL foi visitada mensalmente por um técnico, que realizou o diagnóstico e estabeleceu o plano de ajuste de BPA juntamente ao produtor. Na área chave Higiene de Ordenha e Qualidade do Leite (HOQL), identificou-se as principais não conformidades, sendo priorizadas as ações para melhoria da qualidade e segurança do leite. O plano de ação para ajuste das não conformidades foi estabelecido para cada UPL individualmente. Entretanto, de forma geral, as práticas recomendadas incluíram: identificação individual dos animais e realização do manejo higiênico de ordenha (Zanela et al., 2011). Recomendou-se que o leite dos animais com mastite subclínica fosse destinado aos terneiros e o das vacas com mastite clínica, descartado. Nas UPL com mastite clínica elevada foi recomendada a realização de análise microbiológica para isolamento de agentes etiológicos e perfil de resistência por antibiograma. Orientou-se a limpeza de utensílios e equipamentos de ordenha e controle do resfriamento do leite.

Nos meses de maio e junho, foram realizadas coletas de leite do rebanho a partir do resfriador em 78 UPL. Nesse trabalho, foram consideradas apenas as UPL que apresentavam coletas nos dois meses citados. As amostras foram coletadas em frascos contendo conservante de acordo com as recomendações da Rede Brasileira de

Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL). Posteriormente, foram mantidas em refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite (LABLEITE/CPACT) para análise de Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Padrão em Placas (CPP), ambas por citometria de fluxo. Os resultados foram analisados por estatística descritiva e comparados aos parâmetros da IN76 (Brasil, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação do diagnóstico de BPA nas UPL pela Ferramenta Protambo identificou que na área-chave Higiene de Ordenha e Qualidade do Leite 16% das propriedades apresentaram nível de adoção em conformidade ou acima e 84% abaixo da conformidade. Os resultados da qualidade do leite foram apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Evolução dos valores de CCS e CPP das UPL acompanhadas pelo Programa Leite Seguro, após aplicação da Ferramenta Protambo e estabelecimento de planos de ajuste de não conformidades na área-chave de Higiene de Ordenha e Qualidade do Leite.

Componente	Parâmetro IN 76	Média±DP		UPL dentro do parâmetro IN 76	
		Maio	Junho	Maio	Junho
CCS(1) (x 1.000 cél./mL)	500	696±497	323±216	44%	90%
CPP(2) (x 1.000 UFC/mL)	300	396±1.122	245±452	71%	76%

Número de amostras: (1) 78; (2) 87;

Com relação à mastite, os valores da CCS em maio demonstram que mais da metade das UPL encontrava-se acima dos valores máximos estabelecidos pela legislação, resultado do baixo nível de adoção de BPA nas UPL. Ao iniciar a implantação dos planos de ajustes, houve redução da CCS, sendo que em junho o leite de 90% das UPL já se encontrava dentro dos limites legais da IN76, refletindo um aumento de 46%. Isso demonstra que as ações realizadas foram efetivas na melhoria da qualidade do leite. Quanto à higiene de obtenção da matéria-prima, 71% das UPL já apresentavam o leite abaixo dos limites estabelecidos pela legislação. Contudo, o elevado desvio padrão demonstra a grande variabilidade de CPP, com valores bem acima do máximo estabelecido. Esses valores são preocupantes no contexto da segurança do alimento, pois o leite que chega na indústria é resultado da mistura do leite de vários rebanhos no tanque do caminhão. Com a implementação dos planos de ajustes, houve aumento das UPL que apresentavam leite abaixo do limite máximo estabelecido, com redução da variabilidade dos resultados, demonstrando melhorias na qualidade geral da matéria-prima.

As UPL do Programa Leite Seguro continuarão sendo acompanhadas durante o período de execução do programa, o que possibilitará o monitoramento do nível de adoção das BPA e reflexos na qualidade e segurança do leite.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico das BPA a partir da aplicação da Ferramenta Protambo permite a avaliação sistemática e a abordagem sistêmica para conhecimento da realidade quanto à observância das boas práticas agropecuárias nas fazendas. A utilização de indicadores detalhados e demonstráveis permite fundamentar a elaboração e o comprometimento dos produtores com planos de ação específicos para ajuste de não conformidades. A evolução favorável da CPP e CCS em curto prazo, nas UPL acompanhadas pelo Programa Leite Seguro, evidencia a eficácia da abordagem para

ajustes das práticas adotadas nas UPL, com potencial de alto impacto em programas de qualidade do leite.

AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Defesa de Direito Difuso do Consumidor pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dereti, R. M.; Goncalves, E. B.; Zanela, M. B.; Schafhauser Junior, J.; Alvarenga, M. B. Boas práticas agropecuárias na produção leiteira: diagnóstico e ajuste de não conformidades. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 6, p. 2075-2084, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/3KbC4ycmxvPRT5MT8NQ33Dp/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: 05 ago. 2021.
- Zanela, M. B.; Ribeiro, M. E. R.; Kolling, G.J. Manejo de ordenha. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011. 22 p. (**Embrapa Clima Temperado. Documentos, 342**).
- FAO/IDF. Guia de boas práticas na pecuária de leite: Produção e Saúde Animal Diretrizes. Roma, 2013. 40p. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ba0027pt/ba0027pt.pdf> Acesso em: 05 ago. 2021.

Área Temática 10: INOVAÇÃO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL MATURADO

Débora América Frezza Villar Araújo Bezerra¹, Karoline Mirella Soares de Souza², Ana Lúcia Figueiredo Porto², Luis Medeiros de Lucena³, Katya Anaya Jacinto⁴, Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro⁵, Idiana de Macêdo Barbosa⁶, Adriano Henrique do Nascimento Rangel¹

¹Programa de Pós Graduação em Produção Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, Brasil. ²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil ³Laboratório de Qualidade do Leite, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, Brasil. ⁴Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Santa Cruz, Brasil. ⁵Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. ⁶Unidade de Processamento de Laticínios, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, Brasil

INTRODUÇÃO

A maturação do queijo é uma etapa muito importante do processo de fabricação, uma vez que nela ocorre o desenvolvimento das suas características. Durante esta etapa, milhões de microrganismos e enzimas de origem microbiana atuam quebrando as moléculas de proteínas, gorduras e carboidratos resultando em uma complexa combinação de compostos que influenciam na textura, sabor e aroma do queijo. Além da questão sensorial, a maturação é um critério essencial definido pela legislação, afim de garantir a inocuidade dos queijos feitos a partir de leite cru.

A composição dos queijos representa uma boa fonte para a liberação de fragmentos de proteínas que podem influenciar em diversas respostas fisiológicas benéficas ao organismo, sendo estes conhecidos como Peptídeos Bioativos. Em razão disso, algumas pesquisas têm sido conduzidas com foco nas propriedades das proteínas lácteas, como a atividade antimicrobiana (Rafiq, 2021).

Considerando que o processo de maturação dos queijos também pode potencializar a formação e liberação de peptídeos bioativos, agindo juntamente as enzimas produzidas pelas bactérias lácticas iniciais e não iniciais e a importância da fabricação de queijo de coalho no Brasil, sobretudo na região Nordeste, o presente trabalho se propôs a investigar o potencial antimicrobiano do queijo de coalho artesanal fresco e maturado.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de queijo de coalho foram elaboradas de acordo com as etapas previstas na modalidade artesanal do RN, adicionando-se cultura láctica mista compostas por bactérias mesofílicas homofermentativas e *St. thermophilus*. Os queijos foram submetidos à maturação (12–15°C, 90–95% UR) em períodos distintos, na câmara do Laboratório de Qualidade do Leite da UFRN em Macaíba/RN. No experimento adotou-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliados quatro períodos de maturação (0, 30, 45 e 60 dias). A extração dos peptídeos e o ensaio de atividade antimicrobiana avaliada nas soluções com concentrações de 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml e 0,312 mg/ml de amostras liofilizadas de peptídeos, de acordo com Lima et al. (2018), no Laboratório de Tecnologia de Bioativos/UFRPE em Recife/PE. Para atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Staphylococcus aureus* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028. O pré-inóculo para cada cepa foi preparado em caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI), sendo posteriormente incubada em condições aeróbicas a 37°C por 18 h. A concentração de biomassa (1,5 × 10⁸ UFC/mL) foi determinada através da medição em espectrofotômetro da turbidez da

suspensão a 595 nm (Microplate Lector LM-LGC) e então convertida em unidades formadoras de colônias usando curvas de calibração apropriadas (turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland). A mistura de reação contendo 50 µL do extrato peptídico e 5 µL de suspensão bacteriana mais 45 µL do caldo BHI foi avaliada após incubação por 24 h a 37 °C em estufa. O crescimento bacteriano foi monitorado por leitura em espectrofotômetro a 595 nm utilizando microplaca de 96 poços. O resultado foi determinado como a porcentagem de inibição do crescimento bacteriano com base no meio controle negativo sem bactérias e meio controle positivo com bactérias. Os ensaios foram realizados em triplicada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato obtido a partir do queijo fresco não apresentou atividade antimicrobiana para *Escherichia coli*, bem como o extrato de queijo maturado por 30 dias nas duas concentrações mais baixas testadas (Tabela 1). Para todos os demais extratos, foi observada atividade antimicrobiana para todas as cepas estudadas, sendo esta atividade crescente à medida que o tempo de maturação aumenta. Esse resultado confirma que durante a maturação dos queijos ocorre a liberação de peptídeos com atividade bactericida e/ou bacteriostática. Os extratos de 5 mg/mL dos queijos maturados por 60 dias atingiram atividade antimicrobiana superior a 89% para *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, chegando a reduzir em 98% o crescimento de *Staphylococcus aureus* (Tabela 1).

De modo geral, os peptídeos antimicrobianos possuem carga elétrica positiva, são anfipáticos, possuem solubilidade em ambiente aquoso e, portanto, facilmente inseridos nas membranas, desencadeando morte de microorganismos (Naghmouchi et al., 2007).

Tabela 1 - Percentual de atividade antimicrobiana dos peptídeos do queijo de coalho artesanal fresco (0 dias) e maturado por 30, 45 e 60 dias.

Microorganismo ¹	PSA (mg/mL)	Tempo de maturação ²			
		0	30	45	60
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	31,16	53,20	78,62	89,61
	2,5	21,74	43,91	69,76	77,17
	1,25	14,90	36,85	54,95	65,69
	0,625	9,51	30,94	50,39	60,87
	0,312	4,91	22,74	41,85	49,47
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	37,69	81,56	88,30	98,18
	2,5	24,32	50,65	60,45	73,78
	1,25	13,78	45,06	48,45	67,67
	0,625	4,51	34,26	40,00	56,57
	0,312	1,71	21,86	32,85	37,06
<i>Escherichia coli</i>	5	-	43,02	77,00	91,72
	2,5	-	26,23	68,08	65,06
	1,25	-	11,42	57,09	57,99
	0,625	-	-	46,20	27,08
	0,312	-	-	40,52	15,61
<i>Salmonella Typhimurium</i>	5	36,79	71,50	77,64	92,58
	2,5	30,76	48,09	70,53	85,92
	1,25	22,40	38,87	63,21	80,76
	0,625	15,22	30,34	56,24	72,99
	0,312	8,84	26,14	49,10	66,64

-: Ausência de atividade antimicrobiana; PSA: Peptídeos Solúveis em Água. ¹Atividade antimicrobiana realizada nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 mg/ml; ² Amostras de queijo nos tempos de maturação de 0 (fresco), 30, 45 e 60 dias.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As frações de peptídeos solúveis em água obtidas a partir de queijo de coalho artesanal fresco e maturado demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. A ação antimicrobiana foi crescente com o decorrer do período de maturação, atingindo melhores resultados de inibição aos 60 dias. A atividade antimicrobiana nos queijos, além de potencial ação funcional e benéfica ao organismo, pode ser considerada um fator protetor durante o processo de produção, uma vez que possibilita a redução da contaminação de produtos lácteos, podendo contribuir para o aumento a vida útil do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lima M. D. S. F., et al. Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v.10, p.446-455, 2018.
- Naghmouchi, K., et al. Action of divergicin M35, a class IIa bacteriocin, on liposomes and *Listeria*. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.1508-1517, 2007.
- Rafiq, S., et al. Functional role of bioactive peptides with special reference to cheeses. **International Journal of Dairy Technology**, v.74, p.1-16, 2021.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOATIVO DOS PEPTÍDEOS OBTIDOS DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL MATURADO

Débora América Frezza Villar Araújo Bezerra¹, Karoline Mirella Soares de Souza², Ana Lúcia Figueiredo Porto², Luis Medeiros de Lucena³, Katya Anaya Jacinto⁴, Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro⁵, Idiana de Macêdo Barbosa⁶, Adriano Henrique do Nascimento Rangel¹

¹Programa de Pós Graduação em Produção Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, Brasil. ²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil. ³Laboratório de Qualidade do Leite, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, Brasil. ⁴Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Santa Cruz, Brasil. ⁵Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. ⁶Unidade de Processamento de Laticínios, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, Brasil

INTRODUÇÃO

A constante busca pela melhoria da qualidade de vida tem sido positivamente correlacionada ao consumo de alimentos que além de apresentarem bom valor nutritivo, apresentam em sua composição química substâncias capazes de oferecer benefícios à saúde. Neste contexto, destaca-se a ação dos peptídeos bioativos, fragmentos de proteínas que podem produzir diferentes efeitos positivos ao organismo, sejam eles biológicos, bioquímicos e/ou fisiológicos.

Estudos indicam que o queijo representa uma boa fonte para a liberação de peptídeos bioativos, motivo pelo qual várias pesquisas têm sido conduzidas com foco nas propriedades das proteínas lácteas. Estando inseridos de forma inativa na estrutura primária das proteínas do leite, podendo ser liberados através da proteólise das caseínas e proteínas do soro (β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina sérica, imunoglobulinas e lactoferrina) e frações protease-peptona, através de tratamentos físicos e químicos, como o térmico, homogeneização, aplicação de pressão e coagulação do leite (Silva e Malcata, 2005).

A fabricação de queijo de coalho no Brasil, sobretudo na região Nordeste, destaca-se pela sua importância social, econômica e cultural. Considerando que o consumo deste queijo já faz parte do hábito alimentar da população, o presente trabalho se propôs a investigar o potencial bioativo do queijo de coalho artesanal maturado para as atividades antioxidante e anti-hipertensiva, visando identificar potenciais benefícios relacionados à presença de peptídeos bioativos.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de queijo de coalho foram elaboradas de acordo com as etapas previstas na modalidade artesanal do RN, adicionando-se cultura láctica mista compostas por bactérias mesofílicas homofermentativas e *St. thermophilus*. Os queijos foram maturados em câmara (12–15°C, 90–95% UR) do Laboratório de Qualidade do Leite da UFRN em Macaíba/RN. No experimento adotou-se um delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliados quatro períodos de maturação (0, 30, 45 e 60 dias). A extração dos peptídeos e os ensaios de bioatividade foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Bioativos/UFRPE em Recife/PE. Para a extração 40 g de cada amostra de queijo foram homogeneizadas em mesa agitadora orbital TE 141 por 10 minutos com 80 ml de água ultrapura (1:2 p/v) a 3000 x g por 10 minutos. Posteriormente o material foi homogeneizado a 3000 rpm por 5 minutos em vórtex, repetindo-se esse procedimento por 3 vezes. Os extratos foram centrifugados a 7000 rpm, 20 min, 4°C (Hermle Labortechnik Centrifuge 326 HK). O sobrenadante contendo os peptídeos foi coletado e o precipitado descartado. Esse processo foi realizado duas

vezes para se obter um sobrenadante livre de precipitado. Em seguida, o sobrenadante final foi filtrado em papel quantitativo (Whatman n. 80), congelado a -20°C para posterior liofilização. Soluções nas concentrações de 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml e 0,312 mg/ml de amostras liofilizadas contendo Peptídeos Solúveis em Água (PSA) foram preparadas de água destilada e usadas para avaliação de atividade antioxidante usando os radicais ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS) e 1,1-Difenil- Ensaio antioxidante de 2-picril-hidrazil (DPPH) (Lima et al., 2018). Também foram realizados ensaios de inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (Cushman e Cheung, 1971). Os ensaios foram realizados em triplicada (n=3) e os dados analisados por meio de regressão linear através do Software JAMOVI versão 1.8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os extratos peptídicos obtidos do queijo de coalho artesanal maturado apresentaram atividade antioxidante em todas as concentrações (Tabela 1). No entanto, demonstraram uma maior atividade pelo método ABTS os extratos com 5 mg/ml, variando esta capacidade de acordo com o tempo de maturação do queijo. Também foi observada atividade antioxidante dos peptídeos contra o radical DPPH. As amostras com 5mg/mL apresentaram a maior capacidade antioxidante, sendo o maior valor (82,69%) identificado nas amostras de queijo maturado por 45 dias. O potencial antioxidante é uma importante propriedade nutricional dos alimentos, visto que o aumento do estresse oxidativo está envolvido na maior parte das doenças crônicas relacionadas com a alimentação.

A capacidade de inibição da ECA foi melhor demonstrada também na concentração dos extratos peptídicos de 5mg/ml, sendo o maior valor observado aos 45 dias de maturação. O efeito anti-hipertensivo se dá através da atuação de três peptídeos na inibição da ECA, responsável pela conversão da Angiotensina I em Angiotensina II, um potente vasoconstrictor, proporcionando, dessa forma, efeito benéfico aos indivíduos que possuem pressão arterial alta.

Tabela 1 - Percentual de atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e de inibição da ECA dos peptídeos do queijo de coalho artesanal fresco (0 dias) e maturado por 30, 45 e 60 dias.

Atividade ¹	PSA (mg/mL)	Tempo de maturação ²			
		0	30	45	60
% Atividade Antioxidante DPPH	5	65,29	76,8	82,69	72,47
	2,5	58,01	72,19	75,63	65,84
	1,25	51,01	67,31	68,94	61,57
	0,625	44,84	61,76	57,73	55,19
	0,312	37,51	57,43	50	44,29
% Atividade Antioxidante ABTS	5	57,43	78,62	72,86	59,29
	2,5	38,95	69,67	68,29	52,1
	1,25	28,62	56,19	47,43	46,38
	0,625	24,24	45,95	37,38	33,29
	0,312	16,62	36,24	26,14	23,29
% Atividade Inibição da ECA	5	43,96	59,49	67,38	61,06
	2,5	38,81	57,58	64,3	57,64
	1,25	30,57	54,42	61,77	55,36
	0,625	27,43	52,83	59,16	52,32
	0,312	23,69	46,59	53,74	49,99

PSA: Peptídeos Solúveis em Água. ¹Atividade realizadas nas concentrações de 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 mg/ml; ² Amostras de queijo nos tempos de maturação de 0 (fresco), 30, 45 e 60 dias.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A frações de peptídeos solúveis obtidas a partir de queijo de coalho artesanal apresentam potencial bioativo antioxidante e anti-hipertensivo com inibição da ECA. O processo de maturação parece importante para potencializar essas capacidades, havendo um declínio das atividades observadas no último período de maturação (60 dias). Logo, o queijo de coalho quando elaborado com leite cru, obtido seguindo os princípios das boas práticas, apresenta propriedades benéficas à saúde dos consumidores, com potencial antioxidante e anti-hipertensivo, além de um diferencial de sabor, que proporcionam melhor valor agregado ao produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cushman, D. W., Cheung, H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**, v.20, p. 1637–1648, 1971.
- Lima M. D. S. F., et al. Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v.10, p.446-455, 2018.
- Silva, S.V., Malcata, F.X. Caseins as source of bioactive peptides. **International Dairy Journal**, v.15, p.1-15, 2005.

CLORAÇÃO DA ÁGUA EM PEQUENAS PROPRIEDADES RURAIS PRODUTORAS DE LEITE: UM ESTUDO DE CASO

Ana Carolini Machado de Aguiar¹, Beatriz Ribeiro Amorim ², Emanuely Zequim Ubeda², Pedro Paulo Alves Pinheiro³, Celso José de Moura⁴

¹Estudante de graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás. ²Estudante de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás. ³Estudante de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás. ⁴Professor Orientador da Universidade Federal de Goiás

INTRODUÇÃO

Partindo da premissa de que a grande maioria das propriedades rurais fazem o uso de água não tratada, sendo destinadas diretamente ao consumo e produção das propriedades, incluindo produtos alimentícios. Tendo que com intensificação da produção o lençol freático pode ser contaminado com resíduos orgânicos que carregam consigo microrganismos que podem afetar negativamente a produção e até as pessoas. No caso da produção de leite a contaminação da água pode aumentar a contagem padrão em placas. Entre os microrganismos presentes na água do lençol freático são encontrados coliformes de origem fecal entre outros microrganismos.

No projeto de extensão (Apoio Técnico às cadeias produtivas de Alimentos de origem animal cadastro proec: PJ041-2019) foi desenvolvida a conscientização dos produtores para a necessidade do tratamento de água para o uso de toda propriedade rural, assim foram realizadas coletas de amostras em 10 propriedades da região das águas emendadas, no município de Formosa-Goiás. No caso em estudo foram instalados cloradores de água em 10 propriedades no assentamento Mauro Borges, vale do Paranã no Município de Formosa GO.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionadas dez propriedades produtoras de leite, as quais faziam parte da associação dos produtores de leite do Paranã, assentamento Mauro Borges em Formosa/GO. Fazendas que possuíam poços de profundidade variadas, e que utilizavam a água das caixas tanto para ordenha, quanto para uso pessoal, sendo que, grande parte também produzia queijos. Em cada uma delas, foi instalado o clorador contínuo, produzido pelos alunos, participantes do projeto de extensão, com auxílio do professor coordenador, com tubos e válvulas de PVC, o ajuste do teor de cloro é feito por meio de válvulas manuais e de fácil operação. Além do treinamento para os produtores foram entregues cartilhas orientativas, as pastilhas de cloro e o kit teste para determinação do teor de cloro da água (em torno de 0,5 ppm de cloro livre). Foram coletadas amostras de água bruta, sem instalação do clorador, e outra amostra após instalação, já clorada, e enviada ao laboratório para análises físico-química das águas de todas as propriedades. Após a entrega dos resultados esses foram discutidos com os produtores apontados os caminhos para pequenas falhas caso tenham ocorrido. Ainda foram ouvidos os relatos dos produtores sobre o seu sentimento com o uso da água clorada. Após a instalação do sistema de cloração a cada visita foram coletadas amostras de água clorada para novas análises laboratoriais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A área eleita para a execução do projeto se deu em um assentamento, pois o acesso a serviços de saneamento como esgoto e água tratada na zona rural brasileira é escasso, com reflexos negativos na qualidade de produção de alimentos e saúde da população devido à contaminação microbianas.

Das dez propriedades atendidas não havia qualquer tipo de tratamento da água e nunca tinham feito ou não faziam a limpeza da caixa d'água com periodicidade regular, o que

se confirma com os laudos das amostras de qualidade microbiológica da água antes da instalação dos cloradores, que estavam, em sua totalidade, inadequados devido à presença de Coliformes Totais, indicadores de contaminação fecal ou excesso de matéria orgânica. Este resultado mostrando que 100% dos poços analisados estavam contaminados com coliformes provam que a região possuía carência de informações e acompanhamento técnico; dificultando assim a evolução da produção e da qualidade do leite e alimentos produzidos pelas propriedades.

As amostras água coletadas após o uso clorador de água apresentaram 100% negativas para Coliformes Totais, mostrando a efetividade instantânea do mesmo para o tratamento da água. O clorador apresenta uma ótima relação custo-benefício, uma vez que não demanda de grande investimento para a instalação e entrega resultados eficientes. O cloro presente na água para eliminar os coliformes totais e entregar uma água de qualidade representa um grande avanço tecnológico para uma propriedade rural, tanto nas atividades referentes a produção leiteira e de alimentos derivados quanto para atividades pessoais do dia a dia para as pessoas frequentadoras da propriedade. Com o levantamento de perspectiva dos produtores, notou-se que eles ficaram motivados para dar andamento ao programa. Em sua grande maioria, foi destacado nos relatos que após as ações educativas e implementação do manejo de medição dos teores de cloro a redução da necessidade da higienização dos cochos e melhora na qualidade de água para consumo, com a redução da matéria orgânica suspensa visível.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com análise dos resultados obtidos quanto às amostras de água, conclui-se que cloração da água é uma medida categórica a ser implementada em propriedades rurais, considerando sua efetividade no tratamento da água quanto a presença de Coliformes Totais e outros microrganismos. Os relatos dos produtores destacaram a consciência sanitária desencadeada pelas ações educativas e a atuação das medidas do presente trabalho na qualidade de vida.

Além disso, ter água de qualidade dentro da propriedade é o primeiro passo para a melhoria da produção e da qualidade de seu leite, como a melhoria dos índices de CCS e CPP por exemplo.

CONECTIVIDADE DOS PRODUTORES DO PROGRAMA LEITE SEGURO VISANDO ESTRATÉGIAS DE COMUNICAÇÃO

Rogério M. Dereti¹, Maira B. Zanela², Nágila F.S. Rodrigues³, Ana Amélia B. Perera³, Paulo H. A. Delabary³, Eduarda P. Damian³, Laura A. L. Mews³, Waldir Stumpf Junior²

¹Analista da Embrapa Gado de Leite ²Pesquisador da Embrapa Clima Temperado.

³Bolsista do CNPq no Programa Leite Seguro da Embrapa Clima Temperado

INTRODUÇÃO

Nossa sociedade vive um momento em que a conectividade possibilita ao indivíduo contato com informações, estudos e pesquisas diversas, capazes de aprimorar o seu conhecimento, profissionalização e conseqüentemente impactar no seu trabalho e renda familiar. Especialmente durante a pandemia houve a expansão dos meios de comunicação, plataformas e aplicativos on-line, como ferramentas de apoio aos estudos, profissionalizações e rotina laboral.

Na atividade leiteira, a legislação vigente, IN 77 (Brasil, 2018), prevê a qualificação dos fornecedores de leite pelos laticínios e cooperativas. O cenário atual da pandemia dificulta a realização de atividades presenciais. Além disso, o Programa Leite Seguro promove acesso dos produtores à uma plataforma de capacitações on-line com aulas gravadas e em tempo real oferecidos via internet, mídias sociais e grupos em apps de mensagens instantâneas que oferecem suporte técnico e transferência de tecnologias.

Entretanto, para que as plataformas digitais possam ser utilizadas, é necessário identificar se os produtores possuem acesso as mesmas e qual a melhor forma de otimizar essa comunicação, tornando-se de suma importância o levantamento a respeito das reais condições do acesso à internet e aparelhos celulares capazes estabelecer comunicação e conectividade necessárias para que este processo aconteça de forma satisfatória.

Este trabalho tem como objetivo identificar o perfil dos produtores que participam do Programa Leite Seguro, conforme escolaridade, conectividade a internet e principais aplicativos e plataformas utilizadas por eles, visando o estabelecimento de ações de comunicação entre a pesquisa e o produtor.

MATERIAIS E MÉTODOS

O Programa Leite Seguro possui parceria com laticínios e cooperativas dos três estados da Região Sul. Estão sendo acompanhadas mensalmente 189 Unidades de Produção de Leite, desde fevereiro de 2022, por dez técnicos vinculados ao programa. Nas primeiras visitas técnicas, foi aplicado um questionário simplificado contendo perguntas referentes ao grau de instrução do produtor, acesso à internet, uso de aplicativos de mensagens, sites, etc.

O grau de instrução foi categorizado em: ensino fundamental (completo e incompleto), ensino médio (completo e incompleto, incluindo cursos técnicos), graduação (completa ou em andamento) e pós-graduação.

Os resultados foram avaliados e foram identificadas as possibilidades de conectividade e de comunicação por meios virtuais do produtor, observando o seu acesso à internet, a celulares e smartphones, utilização de redes sociais e aplicativos de mensagens instantâneas, com o fim de averiguar qual a probabilidade efetiva que os produtores têm de participar de eventos, cursos, capacitações, entre outras atividades de aprendizagem online.

Os produtores também foram questionados se gostariam de receber mensagens e informações sobre o Programa e a instituição pelo celular.

Os resultados foram analisados estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grau de instrução dos produtores entrevistados que responderam o questionário foi: ensino fundamental 35,6%; ensino médio 51,1%; 11,7% graduação e 1,7% pósgraduação.

O acesso à internet e aparelhos eletrônicos aptos à conectividade também faz parte da rotina da maioria dos produtores. O Whatsapp é o app que possui maior adesão de produtores, seguido dos sites de mídias sociais, Facebook e Instagram, conforme os dados da Tabela 1.

Tabela 1 - Acesso à internet, aparelhos eletrônicos utilizados e principais aplicativos utilizados pelos produtores do Programa Leite Seguro.

Conectividade	Produtores que responderam positivamente (%)
Acesso à Internet	98,9
Aparelhos utilizados	Produtores que utilizam (%)
Celular	53,0
Computador	1,6
Celular e Computador	47,6
Principais Aplicativos Utilizados	Produtores que utilizam (%)
Whatsapp	66,3
Whatsapp e Facebook	10,3
Whatsapp/Facebook/Instagram	20,7
Facebook	0,5
Todos os meios	0,5

Os resultados demonstram que um elevado percentual de produtores do Programa Leite Seguro possui acesso à internet, sendo o principal aparelho utilizado o celular. Além disso, os produtores utilizam aplicativos de mensagens e sites de mídias sociais que podem ser utilizados para favorecer o processo de comunicação entre a pesquisa e o setor produtivo.

Ao serem questionados se gostariam de receber mensagens e informações sobre o Programa Leite Seguro, 99% dos produtores afirmaram que gostariam. Isso demonstra a receptividade dos produtores na realização das ações de comunicação.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O perfil identificado e os meios de comunicação utilizados pelos produtores que participam do Programa Leite Seguro são pontos de partida para que se estabeleça uma comunicação efetiva no âmbito do projeto.

Ações comunicacionais via Whatsapp, Facebook e Instagram, além de informar, podem servir como oportunidade de interação e porta de entrada para que o produtor participe de eventos e cursos de capacitação on-line em outras plataformas. A internet e suas redes sociais/aplicativos estão incorporados ao cotidiano dos produtores de leite e deverão crescer em importância como espaço de interação social e capacitação nos programas de qualidade do leite.

AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Defesa de Direito Difuso do Consumidor pelo apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 77, de 26 de novembro de 2018**. Diário Oficial República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 nov. 2018.

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO LEITE NO PERFIL REDOX DO *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Ingrid Laíse Silvestre de Oliveira¹, Adriano Henrique do Nascimento Rangel¹, Riva de Paula Oliveira², Giovanna Melo Martins Silva², Cesar Orlando Muñoz Cadavid², Danielle Cavalcanti Sales³, Katya Anaya Jacinto⁴, José Geraldo Bezerra Galvão Júnior⁵

¹Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Macaíba, Brasil. ²Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brasil. ³Instituto de Defesa e Inspeção Agropecuária do Rio Grande do Norte (IDIARN), Natal, Brasil. ⁴Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Santa Cruz, Brasil. ⁵Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN), Ipanguaçu, Brasil

INTRODUÇÃO

O leite bovino e seus derivados vem sendo alvo de críticas, uma vez que seu consumo está associado a biomarcadores da inflamação, estresse oxidativo e desenvolvimento de doenças. No decorrer da vida, o estresse oxidativo causa danos às macromoléculas celulares, devido acúmulo progressivo de espécies reativas de oxigênio (EROs), contribuindo para o declínio das funções fisiológicas no envelhecimento dos organismos (Finkel; Holbrook, 2000). Entretanto, alguns estudos já demonstraram que a ingestão de lácteos produz supressão significativa e substancial do estresse oxidativo e inflamatório, e as proteínas lácteas foram capazes de atenuar a reatividade das EROs e de aumentar as atividades de enzimas antioxidantes (Zemel Et Al., 2010; Stancliffe; Thorpe; Zemel, 2011; Awad et al., 2016).

Em busca de modelos alternativos aos animais vertebrados e ensaios em cultura de células, o nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) tem se tornado um excelente organismo para estudo de distúrbios metabólicos relacionados ao estresse oxidativo e aos mecanismos moleculares relacionados à sua fisiopatologia. Uma vez que as vias de sinalização que são altamente conservadas com mamíferos, esse nematoide pode contribuir através de uma abordagem *in vivo* para o entendimento das vias moleculares relacionadas ao estresse oxidativo que estão implicadas em doenças humanas.

Portanto, objetivou-se avaliar o efeito da exposição ao leite nos níveis de espécies reativas de oxigênio e na resistência ao estresse oxidativo do *C. elegans*. Assim, este trabalho visa propor o *C. elegans* como uma opção de modelo animal em pesquisas para avaliação do equilíbrio redox na ingestão de leite.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 04 amostras de leite integral bovino pasteurizadas de diferentes rebanhos. As amostras foram alíquotadas em microtubos de 2 ml dentro de capela de fluxo e congeladas para posterior utilização. A cepa do *C. elegans* utilizada foi a N2 tipo selvagem para todos os ensaios. Larvas em estágio L1 foram semeadas em placas de Petri de 60mm contendo Meio de Crescimento para Nematódeo (NGM) e *Escherichia coli* OP50 a 20°C durante 40 horas. As placas foram lavadas 2 vezes com solução M9 (KH₂PO₄ 0,022 M; K₂HPO₄ 0,042 M; NaCl 0,085 M; MgSO₄ 0,001 M) e os animais transferidos para microtubos de 1,5ml contendo Solução Basal, *Escherichia coli* OP50 (centrifugada a 4500 rpm por 10 minutos) e leite na concentração de 20%, permanecendo em meio líquido até o crescimento das larvas em L4 (48 horas). Logo após, cada microtubo foi lavado três vezes com M9 ou Solução basal. O efeito do tratamento foi testado no *C. elegans* tipo selvagem em estágio L4, através dos ensaios de tamanho corporal, batimentos faríngeos, quantificação de progênie, resistência ao estresse oxidativo (terc-butil hidroperóxido t-BOOH 10 mM) e quantificação de espécies

reativas de oxigênio (fluorescência com excitação a 485 nm e emissão a 535 nm medida a cada 30 minutos durante 2 horas). Para os ensaios de tamanho corporal, batimentos faríngeos e progênie, foi utilizada uma amostra de leite composta para avaliar o efeito da exposição ao leite nos parâmetros citados. Nos ensaios de quantificação de espécies reativas de oxigênio e resistência ao estresse, as 04 amostras de leite foram analisadas separadamente. Os dados obtidos foram submetidos ao programa estatístico GraphPad Prism® versão 6.01 (EUA) para análise dos dados. Dados não paramétricos foram analisados pela ANOVA para comparar grupos. Para dados em distribuição normal, utilizou-se o teste T. A significância foi considerada a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Antes de analisar os efeitos do leite sobre o estresse oxidativo, foi necessário investigar se o leite também afeta mecanismos básicos de desenvolvimento, como reprodução e crescimento. O leite provocou redução ($p < 0,0001$) no tamanho corporal, quando comparados o grupo tratado com 20% de leite e o grupo controle. Apesar disso, foi necessário relacionar o desenvolvimento com dois fatores: atraso de desenvolvimento e diminuição da taxa de alimentação. Ainda que o tamanho corporal do grupo tratado tenha apresentado redução, o ensaio de batimentos faríngeos revelou que os animais não recusam o alimento ($p = 0,78$). O leite também não afetou ($p = 0,09$) a taxa de reprodução dos animais, indicando que o efeito da exposição ao leite no potencial redox de animais selvagens não ocorre às custas da reprodução.

Em relação a produção de EROs, o nível médio observado nos animais tratados com 20% de leite não foi estatisticamente diferente comparado ao controle. Quando as amostras foram analisadas individualmente, apenas a amostra 3 produziu aumento na quantificação de EROs. Na média geral das quatro amostras, o tratamento com 20% de leite diminuiu ($p = 0,02$) a resistência do *C. elegans* em condições de estresse oxidativo, quando comparadas ao controle. Apenas a amostra 3 apresentou valores estatísticos de menor sobrevivência ($p = 0,03$) ao estresse oxidativo quando comparada ao controle.

De acordo com Xing et al. (2019), a lactose presente no leite aumenta a quantificação de EROs intracelular e diminui a longevidade no *C. elegans*, o que sugere estresse oxidativo celular induzido pela lactose. Assim como a interferência da lactose, cada fração proteica possui diferente produção nos níveis de EROs, conforme estudo *ex vivo* realizado por Albenzio et al. (2018). Ao utilizar o modelo *in vivo* *C. elegans* a partir das amostras testadas, de forma geral, o tratamento com leite não afeta a resistência ao estresse oxidativo e não aumenta os níveis de EROs sob condições de estresse oxidativo. Ao analisar as amostras separadas quanto a resistência em condições de estresse oxidativo, o leite não aumenta a resistência em três das quatro amostras testadas, assim, não podemos afirmar que o leite interfere negativamente neste parâmetro de avaliação.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições deste estudo, a exposição com 20% de leite parece não diminuir a resistência em condições de estresse e não interfere nos níveis de EROs endógeno em *C. elegans* do tipo selvagem. Apesar do pequeno número de amostras de leites testadas, o efeito do leite sobre o *C. elegans* pode ser variável de acordo com a composição da amostra. A utilização do modelo animal *C. elegans* pode ser uma opção em pesquisas para avaliação do equilíbrio redox na ingestão de leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albenzio, M. et al. Milk nutrition and childhood epilepsy: An *ex vivo* study on cytokines and oxidative stress in response to milk protein fractions. **J. Dairy Sci.** v.101, p.4842–4852, 2018.

- Awad, S., et al. Antioxidant activity of milk protein hydrolysate in alloxan-induced diabetic rats. **J. Dairy Sci**, v.99, p.8499-8510, 2016.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-247,2000.
- Stancliffe, R. A., et al. Dairy attenuates oxidative and inflammatory stress in metabolic syndrome. **Am J Clin Nutr.**, v.94, p.422-430,2011.
- Xing, S., et al. Lactose induced redox-dependent senescence and activated Nrf2 pathway. **IJCEP**, v.12, p.2034-2045,2019.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório BioElegans da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e ao CNPq pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

IMPACTO SOCIOECONÔMICO DO PROJETO DE QUEIJOS FINOS A PRODUTORES DE LEITE NA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

Pâmela Rosana Schneider¹, Carolina Balera Trombini¹, Kennidy de Bortoli¹, Ana Paola Buchman¹, Rosilei Heck Schmidt¹, Leandro de Paula¹, Gabryella Della Giustina¹, Diego Henrique de Godoi²

¹Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de Queijos Finos, Associação de Ensino, Pesquisa e Extensão Biopark/Faculdade Biopark, Toledo, Paraná, Brasil.

²Parque Científico e Tecnológico de Biociências Ltda – Biopark, Toledo, Paraná, Brasil

INTRODUÇÃO

O leite é uma das principais atividades da pecuária paranaense, favorecido pelas condições climáticas e dedicação dos agricultores (Cima et al., 2021). Ao longo dos últimos anos têm apresentado significativo crescimento, se destacando em litros produzidos (produção) na segunda colocação no ranking nacional, superando 4,7 bilhões de litros de leite em 2020 (IBGE, 2020). Porém, o principal desafio está em aumentar a produtividade e a renda dos produtores que têm o leite como principal fonte de renda (IDR, 2022).

A partir disso, em 2019 foi lançada a iniciativa do Projeto de pesquisa, desenvolvimento e inovação em Queijos Finos pelo Parque Científico e Tecnológico de Biociências Ltda – Biopark, localizado no município de Toledo – Paraná. O objetivo é de valorizar a vocação regional do agronegócio, honrando especialmente a expressiva bacia leiteira da região Oeste, sendo está a área de atuação do Projeto. Ao incentivar a produção diversificada de queijos finos, apresenta-se como uma oportunidade para que, especialmente as pequenas propriedades rurais, ganhem em valor agregado de seus produtos, aumentando a renda e levando mais inovação para o campo.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo demonstrar o impacto socioeconômico do Projeto de Queijos Finos aos produtores conveniados que já estão produzindo queijos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho, os dados foram coletados através da aplicação de questionário a quatro produtores do Projeto de Queijos Finos do Biopark, os quais já receberam a tecnologia e produzem queijos em suas respectivas agroindústrias, localizados nos municípios de Toledo, Cascavel e Diamante D'Oeste – PR. Os produtores responderam itens relacionados à produção ou compra do leite; quantidade da matéria-prima que é destinada para os queijos finos; o período que já produz queijos finos; quantos queijos são produzidos; ocorrência de produção de outros derivados lácteos; valor dos investimentos feitos para oportunizar a produção; rentabilidade atingida mensalmente; crescimento em faturamento com os queijos finos; admissão de mão de obra; futuros investimentos na propriedade e nível de satisfação com o Projeto.

A partir disso, foram avaliados os resultados e os possíveis impactos em diversificar os tipos de queijos finos sobre o faturamento das propriedades conveniadas no Projeto, através de uma análise de dispersão pelo programa Minitab.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão social das pessoas é dependente a cultura regional onde estão inseridos, tal qual, a característica de trabalho do local, como no Oeste paranaense está estabelecido o agronegócio (Cima et al., 2021). É por este motivo que a implantação de inovação busca impactar socioeconomicamente nas mudanças de metas dos bens, capacidades, oportunidades, e, claro, na renda dos vossos negócios (Melo, 2019).

Os resultados demonstram exatamente isso, que há uma aparente correlação entre a diversificação dos queijos finos na propriedade e o seu faturamento no mês

(Tabela 1). O produtor “A” produz cinco tipos de queijos finos e seu faturamento já atingiu R\$ 50.000,00 por mês, o produtor “B”, produzindo dois tipos diferentes de queijos finos, obteve um faturamento de R\$ 14.000,00, o produtor “C” obteve, também com a produção de dois tipos queijos finos, um faturamento de R\$ 4.000,00, já o produtor “D”, que produz um tipo de queijo fino, apresentou um faturamento de R\$ 1.000,00 por mês. Isto corrobora com o esperado através da iniciativa de transferência de tecnologia para o campo.

Tabela 5 - Relação da diversificação de queijos finos com o faturamento mensal dos produtores.

Produtor	Município	Queijos Finos	Faturamento mensal (R\$)
A	Toledo	5	50.000,00
B	Toledo	2	14.000,00
C	Cascavel	2	4.000,00
D	Diamante	1	1.000,00
D'Oeste			

Podem existir alguns fatores que impactem nos resultados, como quantidade e capacidade produtiva da agroindústria, uma vez que, é comum haver heterogeneidade entre as propriedades e, o intimamente ligado a questão de padrão de vida dos municípios em estudo. Toledo e Cascavel, possuem populações mais numerosas e economicamente favoráveis, aumentando assim as oportunidades de mercado para os queijos finos, se comparado a Diamante D'Oeste, onde a cidade, devido a ser pouco populosa, apresenta restrições de mercado, visto que o produtor “D” apresenta apenas a liberação municipal para seu estabelecimento, restringindo-se a comercialização.

Segundo Abreu (2020), os queijos tem oportunizado a contribuição na renda e qualidade de vida dos produtores de leite, onde os mesmos, através do processamento do leite, conseguem aumentar o valor agregado deste produto.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no discutido, há indicativo de que o Projeto de Queijos Finos possui relevância para a região, principalmente por levar inovação as propriedades e, conseqüentemente, o aumento no faturamento e rentabilidade das mesmas, o que ocorre devido a diversificação na quantidade e tipos de queijos, proporcionando um maior giro capital. Tais observações abrem caminhos para novos trabalhos de avaliação do desenvolvimento de outros produtores participantes, de forma a aumentar e conhecer mais a fundo os impactos causados por este Projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao Parque Científico e Tecnológico de Biociências Ltda – Biopark e a Associação de Ensino, Pesquisa e Extensão Biopark/Faculdade Biopark pela disponibilidade de realização deste trabalho.

PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL SUBMETIDO A DIFERENTES PERÍODOS DE MATURAÇÃO

Débora América Frezza Villar Araújo Bezerra¹, Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro², Karoline Mirella Soares de Souza³, Ana Lúcia Figueiredo Porto³, Luis Medeiros de Lucena⁴, Katya Anaya Jacinto⁵, Adriana M. Zambotto Ramalho⁶, Adriano Henrique do Nascimento Rangel¹.

¹Programa de Pós Graduação em Produção Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, Brasil. ²Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. ³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil. ⁴Laboratório de Qualidade do Leite, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, Brasil. ⁵Faculdade de Ciências da Saúde do Trairi, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Santa Cruz, Brasil. ⁶Laboratório de Nutrição Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, Brasil

INTRODUÇÃO

Entre os queijos de fabricação artesanal no Brasil, o queijo de coalho se destaca dentre os principais; seu consumo já faz parte do hábito alimentar da população, sobretudo na região Nordeste, uma vez que representa uma atividade de importância social, econômica e cultural.

A legislação federal vigente o define como um queijo obtido por meio da coagulação do leite pasteurizado com coalho ou com outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, com a obtenção de uma massa dessorada, semicozida ou cozida, submetida à prensagem e secagem. No entanto, alguns estados têm permitido a sua elaboração a partir de leite cru, a fim de atender a critérios locais de produção artesanal.

Alguns ácidos graxos possuem propriedades bioativas, como aumentar/diminuir o risco de problemas cardiovasculares. Portanto, o impacto do período de maturação sobre a variação do perfil de ácidos graxos é uma informação valiosa para associarmos o modo de preparo de queijo coalho artesanal a possíveis benefícios na saúde humana, com foco na percentagem de ácidos graxos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de ácidos graxos do queijo de coalho artesanal maturado por 30, 45 e 60 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de queijo de coalho foram elaboradas de acordo com as etapas previstas na modalidade artesanal do RN, adicionando-se cultura láctica mista compostas por bactérias mesofílicas homofermentativas e *St. thermophilus*. A maturação foi realizada em câmara do Laboratório de Qualidade do Leite/LABOLEITE localizado na UFRN/EAJ em Macaíba/RN, cuja umidade se manteve em torno de 90 a 95% e a temperatura entre 12 a 15°C. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com 04 períodos de maturação (0, 30, 45 e 60 dias). Todas as análises foram feitas em quadruplicata. A identificação do perfil de ácidos graxos dos queijos foi realizada de acordo com a metodologia de Kramer et al. (1997). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinados usando um cromatógrafo a gás (modelo Focus GC; Thermo Scientific, Milão, Itália), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (100 mx 25 mm x 0,2 µm de espessura do filme; Supelco, Bellefonte, Pensilvânia). Hidrogênio foi usado como gás de arraste (1 ml/min) e nitrogênio como gás auxiliar. As temperaturas do detector e do injetor foram ajustadas em 250°C, com razão de divisão de 15:1. A temperatura do forno foi ajustada para 70°C por 4 min, aumentada em 13°C/min até 175°C, mantida por 27 min, aumentada em 4°C/min até 215°C e mantida por 31 min (Kramer et al., 1997). Os FAME foram

identificados comparando três referências FAME (Supelco FAME mix # C4-C24, CLA trans-9, cis 11 # 16413, e CLA trans-10, cis 12 # 04397; Sigma Aldrich). Os isômeros cis/trans-18:1 foram identificados de acordo com sua ordem de eluição relatada nas mesmas condições cromatográficas (Kramer et al., 2002). Os dados foram analisados por meio de regressão linear com o auxílio do Software JAMOVI versão 1.8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do tempo de maturação sobre o teor dos principais ácidos graxos no queijo de coalho se encontra na Tabela 1. A predominância de ácidos graxos saturados era esperada, uma vez que produtos de ruminantes contém maior quantidade desses ácidos em sua composição. O C16:0 foi predominante em todos os tempos de maturação, seguido dos ácidos C18:1 *cis*-9 e C14:0. O C18:1 *cis*-9 é o principal ácido graxo monoinsaturado e é benéfico para o consumo uma vez que reduz os níveis de LDL-C, além de induzir menor síntese endógena de colesterol, quando comparado aos ácidos graxos poliinsaturados. Contudo, os ácidos saturados (C16:0 e C14:0) possuem um efeito contrário. Foi observado um decréscimo linear ($P < 0,05$) nos teores de C16:0, C18:1 *trans*-11, C18:2n-6, C18:3n-3 e C20:4n-6. O corpo humano não é capaz de sintetizar os ácidos graxos n6 e n3, logo são considerados essenciais. A hidrogenação de ácidos insaturados por bactérias é um processo já conhecido e explicaria a diminuição dos teores de insaturados à medida que o queijo matura. Não foi observado efeito do tempo de maturação sobre os teores de CLA.

Tabela 1 – Perfil de ácidos graxos (g/100 g) de queijo de coalho artesanal em diferentes dias de maturação.

Ácidos graxos	Tempo de maturação (dias)				EPM ²	P ¹	
	0	30	45	60		L	Q
Saturados							
C14:0	11,93	12,18	12,21	12,25	0,062	0,056	0,536
C16:0	32,95	33,54	33,31	33,55	0,089	0,019	0,291
C18:0	9,46	9,59	9,46	9,60	0,053	0,508	0,945
Monoinsaturados							
C14:1	0,94	0,94	0,95	0,96	0,005	0,122	0,557
C16:1	1,75	1,78	1,82	1,78	0,010	0,110	0,217
C18:1 <i>trans</i> -11	1,15	1,16	1,11	1,08	0,012	0,030	0,229
C18:1 <i>cis</i> -9	17,17	17,21	17,67	17,13	0,110	0,677	0,368
Poliinsaturados							
C18:2 n6	1,68	1,50	1,50	1,40	0,035	<0,01	0,696
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,33	0,33	0,34	0,34	0,004	0,785	0,932
CLA <i>cis</i> -12, <i>trans</i> -10	0,03	0,02	0,05	0,04	0,005	0,300	0,667
C18:3 n3	0,35	0,21	0,19	0,18	0,020	<0,01	0,033
C20:4 n6	0,31	0,17	0,18	0,18	0,018	<0,01	0,046

¹Probabilidade de efeito linear (L) ou quadrático (Q). EPM² – Erro Padrão da Média.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ácidos graxos saturados prevalecem tanto no queijo de coalho artesanal fresco, como nas amostras maturadas. Os ácidos graxos poliinsaturados importantes na prevenção de doenças de ordem cardiovascular, diminuíram com a maturação, sem alterações significativas nos teores de CLA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KRAMER, J. K. G., et al. Evaluating Acid and Base Catalysts in the Methylation of Milk and Rumen Fatty Acids with Special Emphasis on Conjugated Dienes and Total trans Fatty Acids. **Lipids**, v.32, p.1219–1228, 1997.

KRAMER, J. K. G., et al. Evaluation of Two GC Columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP Sil 88) for Analysis of Milkfat with Emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 Isomers, and Short- and Long-Chain FA. *Lipids*, v. 37, p.823-835, 2002.

PERFIL DO CONSUMIDOR E O CONHECIMENTO SOBRE O LEITE A2

Ingrid Laíse Silvestre de Oliveira¹, Adriano Henrique do Nascimento Rangel^{1,2}, Dayane Beatriz Melo Pessoa², Sérgio Marques Júnior², Danielle Cavalcanti Sales³, Bruna Schmitz⁴, Helena Fagundes Karsburg⁵, José Geraldo Bezerra Galvão Júnior⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Brasil. ²Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Macaíba, Brasil. ³Instituto de Defesa e Inspeção Agropecuária do Rio Grande do Norte (IDIARN), Brasil. ⁴Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (UFRGS), Brasil. ⁵Integral Certificações. ⁶Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN), Ipangaçu, Brasil

INTRODUÇÃO

Como a composição e qualidade do leite são diretamente influenciadas por fatores ambientais, nutrição, genética e pela fisiologia do próprio indivíduo (Dufour et al., 2011), em uma mesma espécie podem ser produzidos leites com características genéticas distintas, e conseqüentemente, podem ser digeridos de forma diferente pelo organismo. Em termos de conformação da β -caseína, são comercializados dois tipos de leites: o leite A1, proveniente de vacas com genótipo A1A1/A1A2 para β -caseína e o leite A2 que possui apenas a β -caseína A2 (A2A2). Como produto da digestão da β -caseína A1, ocorre a liberação de um peptídeo opiáceo chamado de beta-casomorfina-7 (BCM-7), o qual está relacionado a inúmeros distúrbios na digestão do leite A1 em indivíduos sensíveis ao BCM-7.

Neste sentido, o papel do consumidor na comercialização e aumento da disponibilidade de produtos provenientes de leite A2 se faz importante para ditar a demanda e distribuição do produto, pois o estudo do comportamento dos consumidores traz respostas quanto as causas e motivações relacionadas ao processo de aquisição, consumo ou não, do leite (Regis et al., 2019). E, para os produtores de leite, conhecer as preferências e interesses do consumidor acerca de tal produto, é recurso chave para inserção do leite A2 no mercado de forma cada vez mais acessível e disponível nas gôndolas do mercado.

Objetivou-se analisar o conhecimento da população sobre o leite A2 e realizar um levantamento quanto ao consumo de leite relacionado a aspectos de saúde do consumidor.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada a partir da aplicação de questionários on-line através da plataforma “Google Formulários”, com caráter exploratório e descritivo para obtenção de respostas relacionadas ao conhecimento e consumo do leite convencional e leite A2 pelos brasileiros. O formulário foi desenvolvido pelo Laboratório de Qualidade do Leite (LABOLEITE) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN/EAJ) em parceria com o programa nacional de estímulo ao consumo de lácteos BEBA MAIS LEITE.

Foram obtidas 2.054 respostas, distribuídas por todo território nacional, sendo estas de consumidores ou não do produto pesquisado, conforme sua disposição em participar da pesquisa. O link para o formulário foi compartilhado através de plataformas digitais como whatsapp, instagram, e-mails institucionais e sites dos programas parceiros da pesquisa. O questionário foi composto por 24 perguntas, entre múltipla escolha e perguntas abertas, o qual esteve disponível durante 15 dias para a obtenção de respostas (junho a julho de 2020). Não foi estabelecido um critério de tempo para

encerramento do questionário, apenas observou-se o fluxo médio de respostas diárias. As questões foram agrupadas em quatro dimensões para a análise dos dados e divididas em quatro etapas: 1 - levantamento sobre frequência e consumo de leite e seus derivados; 2- disfunções relacionadas ao consumo de leite e derivados; 3- conhecimento sobre o leite A2; 4- perfil socioeconômico dos respondentes, conforme apêndice A. Nas etapas 1, 2 e 3 o questionário utilizou-se de escala métrica baseada no modelo Likert, na qual o respondente expõe seu grau de concordância com a pergunta (Silveira et al., 2010).

A partir do banco de dados, foi gerada a análise de frequência das percepções dos participantes. Para a análise das respostas, foram utilizadas ferramentas da análise estatística descritiva, apresentada por valores percentuais obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas respostas de todos os estados do Brasil, com maior índice nos estados do Rio Grande do Norte (30,8%), São Paulo (16,7%) e Minas Gerais (16,3%). Do total de entrevistados, 1.274 foram mulheres e 775 homens, distribuídos em por faixas de idade, sendo a maioria (85,5%) entre 21 e 60 anos. Em relação ao grau de escolaridade, apenas 2,2% afirmaram não possuir o ensino médio completo, 22% afirmaram ter ensino superior incompleto, 27,1% superior completo e 39,9% pós-graduação. A renda familiar de 42,8% dos entrevistados enquadrou-se nas classes econômicas “A” e “B” e 46% classificaram-se como classe “C. Ao relacionar os dados de grau de escolaridade e renda familiar, considera-se que o grupo analisado nesse estudo, pertence a uma faixa de escolaridade e renda acima da média brasileira.

Dos participantes, 62,6% afirmaram que sempre consumiam leite e derivados e 24,2% consumiam quase sempre. Ao serem questionados sobre a possibilidade de que o consumo de leite e derivados poderia causar alguma doença, os respondentes afirmaram que certamente não causa nenhuma doença (30,7%), talvez cause, talvez não (26,9%), provavelmente não causa (19,5%) e apenas 8,3% responderam que o consumo de leite e derivados certamente causa alguma doença.

Os respondentes foram questionados quanto ao conhecimento de alguma alternativa existente no mercado para pessoas que não são intolerantes, mas que ainda sim, apresentam algum tipo de desconforto gastrointestinal ao consumir leite e 72,2% afirmaram não conhecer nenhuma alternativa. No geral, 66,1% afirmaram ter pouco ou nenhum conhecimento sobre o leite A2 e 52,7% não sabiam que o leite A2 é a forma original no leite bovino e que os animais podem ser criados para produzir naturalmente este leite. Apesar da maioria dos participantes não conhecerem ou conhecerem pouco sobre o leite A2, 76,4% afirmaram entre muito importante e importante que fazendas produzam o leite proveniente apenas de vacas A2A2, todavia, apenas 5,9% declaram que há boa ou muita disponibilidade do leite A2 em supermercados na sua cidade. Ao serem questionados sobre probabilidade de pagar a mais pelo litro de leite, caso fosse do tipo A2, 50,8% foram favoráveis a proposta.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo evidencia que as pessoas relacionam o consumo de leite a desconfortos gastrointestinais, e ainda desconhecem sobre o leite A2. Esse desconhecimento, somado à pequena oferta do leite A2 no mercado faz com que muitos potenciais consumidores ainda não tenham o devido acesso ao produto, mesmo estando abertos para seu consumo. Portanto, este é um novo nicho de mercado estabelecido em todas as regiões do Brasil, que precisa tanto do aumento da oferta do produto, como também de ações estratégicas voltadas para a pesquisa científica e para a divulgação de informações junto ao consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dufour, S. et al. Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 2, p.563-579, 2011. DOI: 10.3168/jds.2010-3715.

Regis, N. S. et al. Perfil do consumidor de leite e preferência de consumo no município de Santa Inês, Bahia. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 10, n. 2, p.66-79, 2019.

Silveira, T. S. J. et al. Avaliação da Ambiência Interna da URI Santiago Através da Escala de LIKERT Modificada Para Fins de Planejamento Estratégico. X Colóquio Internacional sobre Gestión Universitaria en América del Sur. Mar del Plata. Mar del Plata. Argentina. 2010.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, ao programa nacional de estímulo ao consumo de lácteos “Beba Mais Leite” e ao CNPq pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

SOLUÇÃO IOT PARA MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE TANQUES DE LEITE

Lucas Sanders¹, Polyana Pizzi Rotta², Mariah Couto¹, Lucas Faria Porto¹, Savio Silveira¹, Maria Eduarda Rocha Saraiva², Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues Martins^{1*}

¹Rumina S.A., Belo Horizonte, Brazil

²Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

INTRODUÇÃO

O uso de sensores e monitoramentos por meio de sistemas de IoT (internet das coisas) têm se tornado cada vez mais frequentes nos sistemas de produção de leite, gerando informações em tempo real para o aumento de produtividade e eficiência das fazendas (Cabrera et al., 2020). O monitoramento em tempo real do tanque de expansão de fazendas de leite pode auxiliar o produtor a ter informações rápidas e precisas sobre o volume coletado e temperatura, e com isso analisar rapidamente anomalias que podem acontecer dentro da fazenda e que poderiam impactar no volume produzido, eficiência de ordenha, produtividade das vacas, e na gestão financeira da fazenda baseadas nas informações de volume total produzido no dia e no mês. Desta forma, a hipótese do presente estudo foi de que o uso de sensores e monitoramento em tempo real do volume do leite do tanque de expansão por meio de sistemas de IoT tem alta acurácia e precisão. O presente estudo teve como objetivo avaliar a acurácia e precisão do monitoramento do volume de leite em tempo real, por meio do uso de sensores RumiTank (RumiTank, Viçosa, MG).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização do experimento, três sensores RumiTank (RumiTank, Viçosa, MG) foram instalados em uma unidade de tanque de expansão cilíndrico vertical, com capacidade nominal de 1000 litros (DMBrasil, Perdizes, MG). Os sensores RumiTank monitoram, sem nenhum contato, a temperatura e o volume do líquido continuamente, bem como a agitação da pá, desnivelamento, refrigeração e abertura da tampa. Para aferição do volume real (método padrão) de leite no tanque, empregou-se um aferidor volumétrico de 20L de capacidade (Seu Posto, São Paulo, SP), certificado pelo INMETRO, através do qual volumes conhecidos de líquido puderam ser depositados no tanque de leite.

O procedimento realizado consistiu no preenchimento do tanque usando volumes conhecidos de 20 L, mensurados através do emprego do aferidor volumétrico. A cada 40 L colocados no tanque, fez-se o registro do valor real e do volume medido por cada sensor RumiTank e, desta forma, foram compostos 25 pontos de medição entre 40 L e 1000 L. Este processo foi repetido por 5 vezes e, ao todo, foram analisadas 375 medições.

Foram realizadas análises descritivas e exploratórias dos resultados obtidos do volume real e de cada sensor. Para avaliar o desempenho de acurácia e repetibilidade do volume estimado pelo sensor, foram utilizadas métricas de correlação, coeficiente de determinação (R^2), erro absoluto, erro percentual, desvio padrão e análises de subestimação e superestimação.

$$\text{Coeficiente de Correlação: } r = \frac{\text{Cov}(\text{Volume Real}, \text{Volume Estimado})}{S_{\text{Volume Real}} \times S_{\text{Volume Estimado}}} \quad (1)$$

$$\text{Coeficiente de determinação: } R^2 = r^2 \quad (2)$$

Erro absoluto:
$$e_{abs} = |Volume Real - Volume Estimado| \quad (3)$$

Erro percentual:
$$e_{perc} = \frac{|Volume Real - Volume Estimado|}{Volume Real} \times 100 \quad (4)$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todos os resultados partiram das 375 medições que foram realizadas. Na etapa de pré-processamento e preparação dos dados, onde avaliou-se a qualidade dos dados, foi possível identificar que dentre as 375 medições existia um *outlier* mensurado com valor de 882 L por um dos sensores. Este valor não foi considerado nas análises por exceder 3 vezes o desvio padrão, sendo substituído pela média baseada nos outros 4 valores do mesmo volume deste sensor.

Em relação aos resultados, o sistema de monitoramento em tempo real do volume de leite no tanque apresentou alta acurácia ($R^2 = 0,99$; Tabela 1). O erro absoluto médio das observações foi de $\pm 2,30$ L, o que representa 0,23% da capacidade do tanque testado (tanque de 1000 L de capacidade). Os valores de erro absoluto médio das 375 medições separadas por volume de tanque apresentaram uma variação entre 1,2 e 3,5 litros (Gráfico 2).

Tabela 1 - Análise descritiva dos resultados gerais.

Correlação	R ²	Desvio Padrão (L)	Erro Absoluto Médio (L)	Erro Absoluto Médio (%)	Erro Médio/Capacidade do Tanque (%)
0,999	0,999	2,06	2,30	0,84	0,23

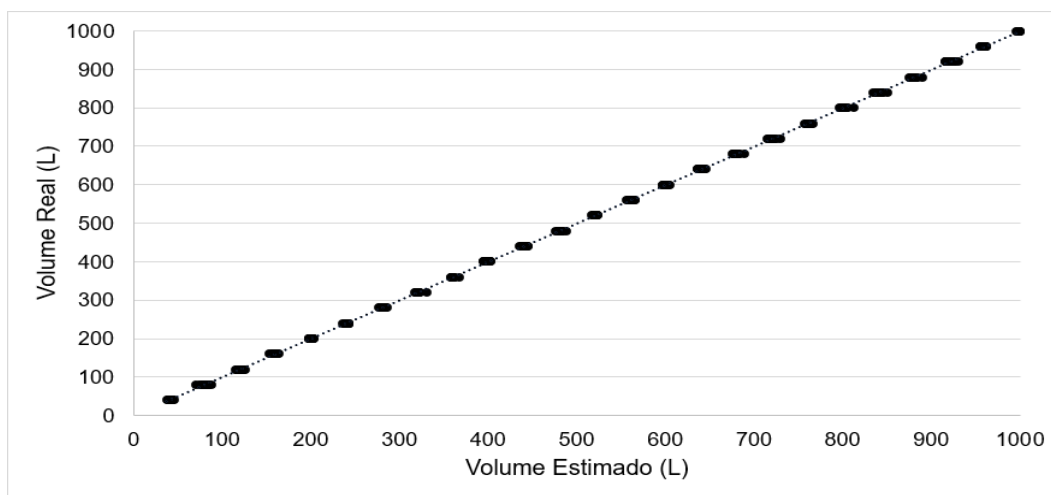


Gráfico 1 – Associação entre o volume estimado pelos sensores e o volume real do tanque, ao longo de todas as medições de 40 L à 1000 L de volume no tanque.

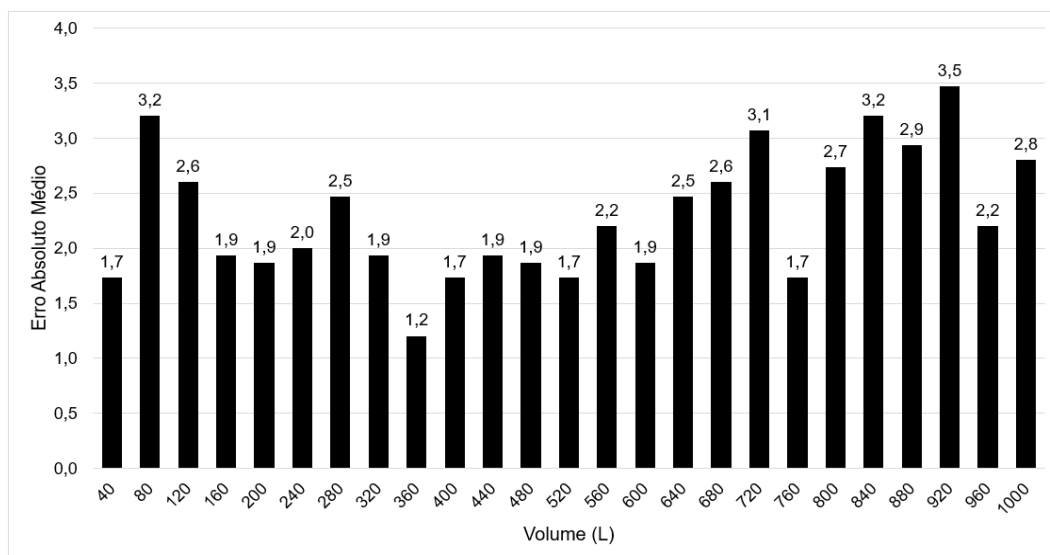


Gráfico 2 – Erro absoluto médio das medições por volume de leite presente no tanque.

Ao longo dos 5 dias estudados em que as medições foram repetidas, a variação do erro absoluto médio das medições foi de 1,85 à 2,91 litros e o erro percentual médio inferior $\leq 1,16\%$, demonstrando que os sensores avaliados apresentam alta repetibilidade das medições.

Tabela 2 – Erro médio observado entre as repetições de volume realizadas ao longo de 5 dias de mensuração.

Dia	1	2	3	4	5	Média
Erro Absoluto Médio (L)	1,85	2,91	2,00	2,23	2,51	2,30
Erro % Médio	0,93	1,16	0,79	0,57	0,73	0,84

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de sensores e monitoramentos por meio de sistemas de IoT (internet das coisas) apresentou alta acurácia e repetibilidade das medições, ao estimar o volume de leite de tanque de expansão com capacidade para 1000 L. Estes resultados demonstraram que o sistema de IoT pode ser aplicado em fazendas de leite para monitoramento em tempo real do volume presente no tanque, e também contribuir com o monitoramento do volume ordenhado e entregue a laticínios fornecedores, auxiliando na gestão e análise de dados das fazendas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Victor E. Cabrera, Jorge A. Barrientos-Blanco, Hector Delgado, Liliana Fadul-Pacheco. Symposium review: Real-time continuous decision making using big data on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.103, n.4, 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17145>.

Área Temática 11: GESTÃO

DIAGNÓSTICO ESTRUTURADO DO IMPACTO DA COVID-19 NA CADEIA AGROARTESANAL DE QUEIJOS DO RIO GRANDE DO NORTE

Joadilza da Silva Bezerra^{1,3}, Adriano Henrique do Nascimento Rangel^{2,3}, Heloysa Aline Pinheiro Lopes^{2,3}, Yhêlda Maria de Oliveira Silva^{2,3}, Sérgio Marques Júnior², Fabio de Souza Mendonça⁴, Danielle Cavalcanti Sales⁵, José Geraldo Bezerra Galvão Júnior⁶

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil. ²Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil. ³Laboratório de Qualidade do Leite - LABOLEITE/UFRN, Brasil. ⁴Laboratório de Diagnóstico Animal – LDA/UFRPE, Brasil. ⁵Instituto de Defesa e Inspeção Agropecuária do Rio Grande do Norte - IDIARN, Brasil. ⁶Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN), Ipangaçu, Brasil

INTRODUÇÃO

A covid-19 (Doença do coronavírus), descoberta na China, em dezembro de 2019, tendo seu alastramento global em 2020, está interferindo radicalmente na vida das pessoas em todas as esferas. A pandemia da covid-19 fez um marco na história da humanidade de forma multidimensional, envolvendo questões científicas, sanitárias, socioeconômicas, políticas, de saúde e bem-estar. No entanto, as análises realizadas sobre os efeitos dessa crise sanitária mundial ficaram centralizadas, principalmente, nas áreas urbanas.

Moradores de áreas rurais representam cerca da metade da população mundial, mesmo assim, têm menos acesso a cuidados e apresentam as piores condições de saúde quando comparados com populações urbanas (Wonca, 2003). A população do campo tem sido penalizada na pandemia, tanto pelo aprofundamento de vulnerabilidades, como pela ausência de estratégias políticas e sanitárias, capazes de garantir condições mínimas de manutenção da vida em uma situação de crise social, econômica e sanitária (Alves et al., 2022). Nos levantamentos realizados em torno da covid-19 foi dispensada pouquíssima atenção ao setor agrário, apesar de ser uma área de fundamental importância social e econômica para o país. Nesse sentido, estudos recentes sobre a agricultura familiar apontam o impacto da pandemia na manutenção da dinâmica produtiva e comercial; nos volumes de produção; nos preços recebidos e no decréscimo da renda dos agricultores familiares.

O objetivo deste trabalho consiste em apresentar informações sobre os impactos decorrentes da covid-19 para o produtor agroartesanal de leite e queijos, nas dimensões socioeconômicas, acesso a informações e políticas públicas, assim como nos cuidados com a saúde.

MATERIAL E METODOS

A pesquisa foi realizada na região do Seridó do Rio Grande do Norte (RN), situada em plena área semiárida do Nordeste do Brasil. O Seridó tem uma longa tradição na produção de leite e queijo coalho artesanal (QCA) e é onde há a maior concentração de queijeiras do estado. A seleção dos participantes deste estudo considerou os seguintes critérios: ter cadastro no Sebrae RN e/ou cadastro em cooperativas da região, além da localização de mais fácil acesso para a realização das entrevistas. Os participantes pertenciam a dois grupos: (1) produtores de leite e fornecedores das queijeiras; (2) produtores de QCA, que comercializassem qualquer quantitativo de sua produção.

Os dados foram coletados através da aplicação de um questionário estruturado, considerando os grupos de interlocutores, produtores de leite e QCA. Foi utilizada a ferramenta Google Forms® e método Survey (Malhotra, 2004).

As entrevistas foram realizadas presencialmente, entre os meses de outubro de 2019 e novembro de 2020, distribuídas em visitas às propriedades, reuniões em

cooperativas e sindicatos, feiras livres e comércio local, na região do Seridó do Rio Grande do Norte. Neste período, foram tomadas todas as medidas preventivas em relação ao contágio, inclusive, foi necessário diminuir o número de entrevistas. Antes de responder as perguntas, os produtores recebiam informações com a descrição, objetivo, e importância da pesquisa, identificação da pesquisadora e dos órgãos apoiadores.

Foram elaboradas questões de relevância socioeconômica e sanitária no âmbito da covid-19 relacionadas aos aspectos de:

- a) Acesso às informações sobre a covid-19
- b) Produção, comercialização e mercado consumidor
- c) Renda e apoio governamental

Os dados obtidos nas entrevistas foram tabulados em planilhas do programa Excel®, submetidos à análise descritiva, sendo os resultados expressos em porcentagem e colocados em tabelas para melhor visualização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O diagnóstico estruturado foi aplicado a 42 produtores de leite e 47 de produtores de QCA (n=89).

O acesso às informações sobre a covid-19 possui grande importância, evitando uma disseminação ainda maior da doença. A maior parte dos entrevistados relatou que “recebeu muita informação” sobre as formas de prevenção da covid-19 (74,9%). A TV e a internet representaram veículos importantes de informações para os entrevistados, enquanto as secretarias de saúde não foram mencionadas. Trinta e um entrevistados (66,0%) ficaram sabendo da covid-19 por programas de televisão e outros 31,9%, pela internet. As principais orientações recebidas foram sobre lavagem das mãos com água e sabão, uso de álcool 70%, utilização de máscaras, como também, o isolamento social. Quase todos os produtores entrevistados fizeram uso de máscara (91,5%) e álcool gel ou álcool 70% (97,9%). As recomendações podem ter sido favoráveis para prevenir o acometimento da doença nesta população, já que 97,9% deles não tinham sido diagnosticados com covid-19 até o momento da entrevista.

A principal mão de obra utilizada na propriedade foi a familiar, tanto para os produtores de leite (52,4%), como de QCA (70,2%). Segundo 57,4% dos entrevistados, a quantidade de QCA produzida precisou ser diminuída no início da pandemia (março – maio/2020). Entretanto, para 61,7% dos entrevistados, a quantidade precisou ser aumentada a partir do mês de junho/2020. Quase metade deles (48,9%) concordou que a pandemia modificou os hábitos de consumo da população, aumentando o nível de exigência sobre a qualidade dos queijos artesanais.

O fechamento do comércio e das feiras livres interferiu na comercialização dos produtos com prejuízos à renda familiar. Os produtores declararam que não obtiveram apoio do poder público, sendo necessário recorrer ao auxílio emergencial (78,7%).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os desafios da pandemia não são apenas sanitários, alcançando também os setores primário, secundário e terciário, tripé de suma importância socioeconômica.

A crise exacerbou a urgência de adequação a novas estratégias de produção e comercialização, de modo a construir um alicerce para melhores condições de produção, abastecimento e consumo, fortalecendo a autonomia das famílias e propiciando melhores condições de vida, sendo de grande importância para o desenvolvimento rural.

Esses resultados confirmam a vulnerabilidade dessas populações e a necessidade de reestruturação dos serviços e políticas públicas. Porém, os impactos da pandemia da covid-19 necessitam de mais indicadores para áreas rurais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Hayda et al. Territórios rurais contra a Covid-19: saberes, fazeres e reflexões por meio da Educação Popular em Saúde. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação** [online]. 2022, v. 26 [Acessado em 24 Julho 2022].

MALHOTRA, N. K. **Pesquisa de marketing: uma orientação aplicada**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman.

Working Party on Rural Practice WONCA. Política de qualidade e eficácia dos cuidados de saúde rural. **Rev Bras Med Fam Comunidade** 2013; 8 Suppl 1:15-24. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.5712/rbmfc8\(1\)728](http://dx.doi.org/10.5712/rbmfc8(1)728). Acessado em 13/07/2020.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (LABOLEITE/UFRN), ao Sebrae RN e ao CNPq pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

IMPACTO DA ASSISTÊNCIA TÉCNICA E GERENCIAL DO SENAR AR/GO NA QUALIDADE DO LEITE, ESPECIFICAMENTE NA CCS, EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DO MUNICÍPIO DE PONTALINA GO

Fábio da Silva Almeida¹, Guilherme Brandão Gonçalves Bizinoto¹, Joás Barbosa Bueno¹, Luciana dos Reis Valadão¹, Mirianny Urzeda¹, Roseane Silva Araújo², Weder de Lima Vieira¹, Wesley José de Souza²

¹Serviço Nacional de Aprendizagem Rural – AR Goiás. ² Instituto Federal Goiano – Campus Urutai.

INTRODUÇÃO

A ATeG SENAR, é um programa de Assistência Técnica e Gerencial, nele procura-se explorar novas ferramentas, afim de fazer com que o pecuarista aprimore suas técnicas de produção, seu gerenciamento, e torne sua produção mais eficiente, sustentável e lucrativa.

Atendendo principalmente, um público de produtores de baixa e média produção, com pouco poder de investimento, baixa tecnificação e quase nenhuma instrução, o SENAR busca levar aos produtores assistidos, metodologias simples e aplicáveis, que consigam diminuir ou anular os erros de produção que se tornam gargalos em sua cadeia produtiva, um desses que podemos citar, é o alto número de descartes involuntários de animais devido a incidências de mastite subclínica e clínica nas propriedades atendidas.

Buscando uma longevidade produtiva média de quatro crias por animal, esse descarte prejudica a execução deste planejamento zootécnico, o que compromete diretamente o planejamento financeiro da propriedade, impactando na lucratividade anual da atividade.

Na legislação vigente, Instrução Normativa (IN) nº 76/2018 (Brasil, 2018), “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas”.

Resultados de análises acima do permitido pela IN 76, são indícios de deficiências no processo de higiene da ordenha, do manejo dos animais, e sobretudo, na falta de instrução e capacitação dos ordenhadores sobre boas práticas de fabricação.

Desta forma, o presente estudo, buscou analisar o impacto das metodologias implantadas pelo SENAR, na qualidade do leite de produtores no município de Pontalina.

MATERIAL E METODOS

Para fins comparativos, neste estudo, utilizamos dados coletados durante doze meses, durante a visita mensal de consultoria técnica a cada produtor avaliado, no total, foram dez propriedades avaliadas, contamos também, com dados do banco de dados do laticínio parceiro receptor do leite, nestas propriedades. Totalizando vinte e quatro amostras por propriedade, sendo doze retroativas a assistência e doze posteriores a implantação da metodologia ATeG SENAR. A metodologia implantada, consiste, na realização de análise de CCS individual do rebanho mensalmente, formação de linha de ordenha conforme ordem crescente de CCS, onde os animais que apresentaram número menor de CCS, iniciam a ordenha, seguindo sucessivamente até o animal onde o número de CCS individual foi mais alta na análise do mês, descarte de animais com mastite crônica, tratamento à base de antimicrobianos sistêmicos e locais em animais positivos para mastite clínica, segregação e controle de animais com mastite subclínica, implantação de rotina de pós dipping ao fim de todas as ordenhas, implantação de rotina de sanitização no início de todas as ordenhas, algumas das propriedades possuem

rotina de aplicação de ocitocina antes da ordenha, nestas foi introduzido manejo de higienização de agulhas e seringas com amônia quaternária, e utilização individual de agulhas. Os dez rebanhos avaliados, são compostos por média de quarenta animais em lactação, com idade média de três a nove anos, animais SRD e da raça girolandos, não possuem registro, vivem em sistemas semi intensivos, onde no período das chuvas se alimentam de piquetes rotacionados e suplemento concentrado no cocho, e nas secas, se alimentam de silagem de milho e suplemento concentrado no cocho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os manejos executados nas propriedades são pontos críticos a serem observados durante a consultoria, pois interferem diretamente na qualidade do leite, e na sanidade dos animais, na saúde e na segurança do colaborador, no bem estar animal, e em questões ambientais.

A CCS do tanque é um forte indicador da sanidade do rebanho, sendo que ela representa a média de células somáticas das vacas em lactação. Podendo ser correlacionado seu valor à taxa de perda de produção e a taxa de infecção do rebanho (Pelegriño et al, 2008).

Em 100% das propriedades avaliadas, foram observados erros no manejo, que predispoem os animais a contaminações e conseqüentemente a índices altos de CCS, por isso foi elaborada a tabela 1, afim de seguirmos como protocolo referência, para controle de CCS.

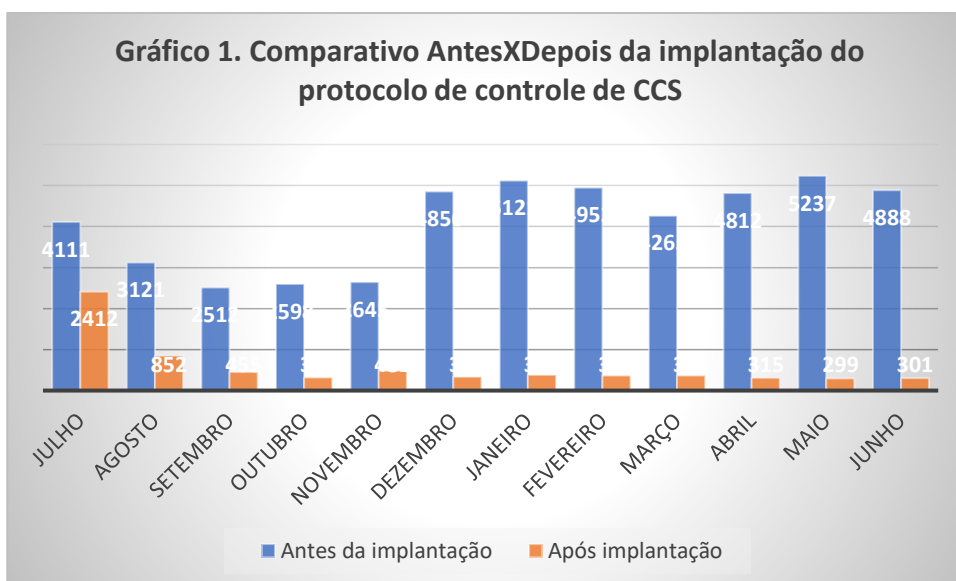
Tabela 1 - Protocolo para controle de CCS implantado nas propriedades.

1.0	Revisão dos produtos de limpeza da ordenha
2.0	Introdução da rotina de sanitização e pós dipping
3.0	Introdução de coleta e análise CCS individual
4.0	Linha de ordenha
4.1	Novilhas recém paridas
4.2	Vacas com CCS inferior a 200,400, sucessivamente
5.0	Implantação do teste de CMT
6.0	Tratamento dos animais com mastite clinica
7.0	Descarte de animais recorrentes

Para a análise de CCS individual, foram utilizados potes contendo estabilizante, as amostras eram enviadas, em caixa isotérmica refrigerada para o LQL- Universidade Federal de Goiás, dentro de 24 horas, após a coleta.

Todas as outras implantações foram realizadas com os ordenhadores durante visita de consultoria, e monitoradas mensalmente na visita.

Para iniciar o estudo, fizemos o levantamento da empresa compradora de leite, nestas propriedades, após isso fizemos uma solicitação informal dos dados destes produtores, o laticínio, nos forneceu então, os dados retrospectivos de coleta de doze meses anteriores 06/2020 a 06/2021, da mesma forma, acompanhando como parâmetro as coletas realizadas pelo laticínio e entregue ao produtor na folha do leite, registramos os dados, dos doze meses subsequentes a introdução da nova rotina para controle de CCS, que foi iniciada no mês de junho do ano de 2021, nas dez propriedades avaliadas, segue no gráfico 1.



CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desta forma, concluímos que a ATeG oferecida pelo SENAR aos produtores rurais de Pontalina, conseguiu implantar com efetividade um protocolo para controle de CCS nos rebanhos avaliados, como principal benefício temos o ganho econômico no fluxo de caixa.

Assim os resultados do presente estudo, reforçam a importância da realização de exames de CCS individual em rebanhos leiteiros, assim como a implantação e manutenção de protocolos de linha de ordenha, para controle de CCS, diminuindo assim, as perdas econômicas dentro das propriedades rurais.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n°. 76 de 26 de novembro 2018.** Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e o Leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília. 2018.

DUTRA, T.P. Em busca da melhor qualidade do leite. Rio Grande do Sul: **SENAR**, publicado em 17 de agosto de 2021. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/em-busca-da-melhor-qualidade-do-leite-2> Acessado em 22/06/2022.

FUNDAÇÃO ROGE. **Entenda melhor como avaliar o CCS no seu rebanho.** Disponível em: <https://www.fundacaoroge.org.br/blog/entenda-melhor-como-avaliara-ccs-no-seu-rebanho> Acessado em 14/06/2022.

Área Temática 12: GENÉTICA

ASSOCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM VACAS HOLANDESAS USANDO MODELOS DE REGRESSÃO ALEATÓRIA

Amauri Felipe Evangelista¹, Rafaela Martins², Suelen Fernandes Padilha², Denyus Augusto de Oliveira Padilha², Altair Antônio Valloto³, Laila Talarico Dias⁴, Rodrigo de Almeida Teixeira⁴

¹Doutor em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil. ²Discente do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil. ³Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa - APCBRH, Curitiba, PR, Brasil. ⁴Professor Associado do Depto de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPR, Curitiba, PR, Brasil

INTRODUÇÃO

As curvas de lactação e porcentagens de sólidos têm sido utilizadas para fornecer informações essenciais para avaliar a eficiência biológica e econômica do animal (Naderi, 2018), além disso, são úteis para avaliação genética, monitoramento de saúde, decisões sobre manejo nutricional e planejamento.

Neste sentido, os modelos de regressão aleatória (MRA) têm sido utilizados para a estimação dos parâmetros genéticos das características de produção e porcentagens de sólidos. Dessa maneira, as estimativas dos parâmetros genéticos dessas características permitem estabelecer uma estratégia de avaliação genética eficaz e a seleção de animais geneticamente superiores (Scholtens et al., 2020).

Entretanto, no Brasil as pesquisas envolvendo a utilização de modelos de regressão aleatória com dados de sólidos do leite são escassas. No Paraná, poucos estudos foram realizados com o objetivo de estimar parâmetros genéticos utilizando a curva de porcentagens de sólidos (Scorsato et al., 2014; Ferreira et al., 2015). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi identificar, por meio de regressão aleatória qual período da lactação a associação genética entre as características de produção de leite, % proteína e % gordura foram maiores.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas informações da produção de leite no dia de controle (PLDC), porcentagem de gordura (%G) e porcentagem de proteína (%P) avaliadas no dia do controle de vacas da raça Holandesa de primeira lactação, com idade ao parto variando de 18 a 43 meses, controladas do 5º dia após o parto até o 305º dia de lactação. Os dados foram cedidos pela Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), compreendendo lactações do período 2010 a 2017.

Na edição dos dados foram excluídas informações de rebanhos com menos de 10 animais, vacas com menos de 5 controles leiteiros e vacas cujo primeiro controle leiteiro foi realizado após 45 dias do parto, e grupos de contemporâneos (rebanho, ano e mês do controle leiteiro) com menos de três animais. Ao preparar o arquivo de dados as PLDC, %G e %P foram agrupadas em 20 classes quinzenais de lactação.

Foi realizada análise bicaracterística entre a PLDC com os constituintes do leite (%G e %P), bem como entre %G e %P, por meio de um modelo de regressão aleatória, empregando-se polinômios de Legendre de 4ª ordem, com variância residual homogênea. No modelo, considerou-se como fixos os efeitos de grupo contemporâneo, interação entre a frequência de ordenha (2 ou 3 vezes por dia) e dias em lactação (20 classes), além dos efeitos linear e quadrático da idade da vaca ao parto, como covariável. Como aleatórios foram considerados os efeitos: genético aditivo direto, ambiente permanente do animal e residual.

Os parâmetros genéticos foram estimados por meio de inferência Bayesiana, utilizando-se o programa GIBBS2F90 (Misztal et al., 2018). Foram geradas cadeias amostrais com comprimento de 500.000 ciclos, com descarte inicial de 50.000 amostras

e um intervalo de armazenamento de 20 amostras, resultando em 22.500 amostras. As análises de convergência foram realizadas por avaliações gráficas e pelo teste de Geweke, por meio do pacote BOA (*Bayesian Output Analysis*), implementado no software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estimativas de correlações genéticas estão na tabela 1. As correlações genéticas aditivas foram negativas e variaram de moderadas a alta magnitude, entre produção de leite no dia do controle (PLDC) e % de gordura no início da lactação (-0,30) e ao final da lactação (-0,49). O mesmo ocorreu entre as variáveis PLDC e % de proteína (-0,44) para o início da lactação e ao final da lactação (-0,54). Dessa maneira, tanto no início como no final da lactação quanto maior a PLDC menor foram as porcentagens de gordura e de proteína.

Tais resultados já eram esperados, pois a porcentagem de sólidos no leite diminui com o aumento da produção. Resultados semelhantes foram encontrados por Loker et al. (2012) e Romano et al. (2020) que observaram valores que variaram de -0,47 e -0,51 entre produção de leite e % de gordura e -0,50 e -0,53 entre produção de leite e % de proteína.

Esses resultados podem ser explicados, pois a produção de proteína e a produção de gordura não aumentam na mesma proporção que a produção de leite. Isso resulta na diluição das porcentagens desses sólidos, fato que pode explicar, em parte, as magnitudes negativas entre produção de leite e as porcentagens.

Tabela 1 - Médias *a posteriori* (desvios-padrão) das correlações genéticas entre Produção de leite no dia do controle (PLDC) e % de gordura, PLDC e % de proteína, e % de gordura e % de proteína.

DL	PLDC_%Gordura	PLDC_%Proteína	%Gordura_%Proteína
20	-0,30 (0,05)	-0,44 (0,04)	0,45 (0,04)
35	-0,33 (0,04)	-0,44 (0,03)	0,50 (0,03)
50	-0,37 (0,03)	-0,44 (0,03)	0,52 (0,02)
65	-0,40 (0,03)	-0,45 (0,02)	0,53 (0,02)
80	-0,43 (0,03)	-0,47 (0,02)	0,53 (0,02)
95	-0,45 (0,02)	-0,48 (0,02)	0,53 (0,02)
110	-0,47 (0,02)	-0,49 (0,02)	0,54 (0,02)
125	-0,49 (0,02)	-0,51 (0,02)	0,54 (0,02)
140	-0,51 (0,02)	-0,52 (0,02)	0,54 (0,02)
155	-0,52 (0,02)	-0,53 (0,02)	0,55 (0,01)
170	-0,53 (0,02)	-0,54 (0,02)	0,56 (0,01)
185	-0,54 (0,02)	-0,55 (0,02)	0,57 (0,01)
200	-0,55 (0,02)	-0,55 (0,02)	0,58 (0,01)
215	-0,56 (0,02)	-0,56 (0,02)	0,59 (0,01)
230	-0,56 (0,02)	-0,56 (0,02)	0,60 (0,01)
245	-0,55 (0,02)	-0,56 (0,02)	0,62 (0,01)
260	-0,54 (0,02)	-0,56 (0,02)	0,63 (0,01)
275	-0,53 (0,02)	-0,55 (0,02)	0,65 (0,01)
290	-0,51 (0,03)	-0,55 (0,02)	0,67 (0,01)
305	-0,49 (0,03)	-0,54 (0,03)	0,68 (0,01)

Por outro lado, as correlações genéticas entre % de gordura e % de proteína foram altas e positivas (0,45) no início da lactação e ao final da lactação (0,68). Resultados semelhantes foi encontrado em estudo realizado por Paula et al. (2008) em

uma população de bovinos da raça Holandesa do estado do Paraná, nessa população a correlação foi positiva e alta (0,58).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao final da lactação as associações entres as características foram maiores e, portanto, nesse período os ganhos indiretos para % de gordura e % de proteína serão maiores.

AGRADECIMENTOS

Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) pela concessão dos dados para a realização deste trabalho.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ferreira, A. G. T et al. Fitting mathematical models to lactation curves from holstein cows in the southwestern region of the state of Parana, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, n. 1, p. 503-517, 2015.
- Loker, S.; Bastin, C.; Miglior, F.; et al. Genetic and environmental relationships between body condition score and milk production traits in Canadian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 1, p. 410–419, 2012.
- Misztal, I.; Tsuruta, S.; Lourenco, D.; et al. Manual for BLUPF90 family of programs. **university of Georgia, Athens, USA**, p. 125, 2018.
- Naderi, Y. Appropriate mathematical models to describe the lactation curves of milk production traits of Iranian Holstein dairy cattle. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 40, 2018.
- Paula, M. C.; Martins, E. N.; Da Silva, L. O. C.; et al. Estimativas de parâmetros genéticos para produção e composição do leite de vacas da raça Holandesa no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 824–828, 2008.
- Romano, G. S.; Pinto, L. F. B.; Valloto, A. A.; Horst, J. A.; Pedrosa, V. B. Genetic parameters between somatic cell score and production traits for holstein cattle in southern Brazil. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 33, n. 1, p. 60–70, 2020.
- Scholtens, M. R. et al. Genetic parameters for total lactation yields of milk, fat, protein, and somatic cell score in New Zealand dairy goats. **Animal Science Journal**, v. 91, n. 1, p. e13310, 2020.
- Scorsato, A. P.; Menarin, V.; Giolo, S. R. Curvas de lactação de bovinos da raça holandesa e mestiços do município de Castro, Paraná. *Revista Brasileira de Biometria*, v. 32, p. 216-225, 2014.

EFEITO DOS GENÓTIPOS DA BETA-CASEÍNA SOBRE A COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA

Danielle C. M. Fonseca¹, Alenia N. Vasconcellos¹, Ana Maria C. Vidal¹

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo (FZEA / USP), Pirassununga/SP – Brasil

INTRODUÇÃO

As proteínas lácteas contêm quatro caseínas α_1 , α_2 , β e kappa-caseína e duas proteínas principais do soro, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina (Kamiński et al., 2007) sendo que, dentre as proteínas lácteas, as caseínas são as proteínas mais abundantes no leite, e têm a β -caseína como o maior constituinte.

A β -caseína do leite possui 209 aminoácidos com 13 variantes, A1, A2, A3, A4, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G (Caroli et al. 2009; Gallinat et al., 2013; Kamiński; et al., 2007), as quais A1 e A2 são as variantes mais comuns. Sabe-se que a frequência dos alelos pode variar entre as raças e, para a beta-caseína, o alelo A1 é mais frequente nos animais de origem taurina, sendo maior nas raças Holandesa e Pardo-Suíça, intermediária na raça Jersey e muito baixa na raça Guernsey (Kaminski et al., 2007).

A diferença entre a variante A1 e A2 é o resultado de um polimorfismo de nucleotídeo único no códon 67 do gene da β -caseína; sendo a histidina na A1 e a prolina em A2 (Kamiński; et al., 2007; Truswell, 2005). Enquanto a variante A2 apresenta uma ligação peptídica entre prolina e isoleucina (Pro-Ille), a variante A1 apresenta a ligação peptídica entre histidina e isoleucina (His-Ille). Essa diferença estrutural vem sendo foco de recentes pesquisas (Asledottir et al., 2018; Brooke-Taylor et al., 2017; Nguyen et al., 2018), pois esta diferença conformacional na estrutura secundária da proteína expressa, pode exercer influência sobre as propriedades físico-químicas e microestruturais do leite (Elliot et al., 1999; Mclachlan, 2001; Nguyen et al., 2018).

Segundo Maia (2018), o leite A2 representa um nicho de mercado pouco explorado e específico, muito relacionado à necessidade global de produção crescente em produtos alimentícios premium, bem como uma demanda por alimentos mais diversificados e altamente nutritivos.

Objetivou-se com o presente estudo, realizar comparações quantitativas e qualitativas dos indicadores de produção do sistema de beneficiamento do leite proveniente de vacas com os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2, submetidas as mesmas condições ambientais e nutricionais, em um rebanho comercial localizado no estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo, foi analisado um banco de dados de um rebanho comercial de propósito leiteiro de vacas da raça Holandesa (*Holstein-Friesian*), com informações qualitativas e quantitativas da produção acompanhadas mensalmente ao longo dos 12 meses de 2021. Essas vacas apresentavam polimorfismo genético dos alelos A1 e A2 do gene da β -caseína, identificadas pelo teste de genotipagem realizado conforme a metodologia descrita Giglioti et al. (2020).

Foram utilizadas 1.923 observações de vacas portadoras do genótipo A1A1, com animais apresentando idade média de 59 meses, 212 dias em lactação e na 3ª parição; 8.426 observações de vacas portadoras do genótipo A1A2, com animais apresentando idade média de 48 meses, 217 dias em lactação e na 2ª parição e; 10.550 observações de vacas portadoras do genótipo A2A2, com animais apresentando idade média de 40 meses, 185 dias de lactação e na 2ª parição, totalizando 20.899 informações obtidas ao longo dos 12 meses de 2021.

Para a análise das variáveis qualitativas, obteve-se os dados de distribuição da frequência genotípica e alélica de vacas em lactação da raça Holandesa (*Holstein-Friesian*) para o gene da β -caseína (CSN2), estimados de acordo com Falconer (1989).

Para análise das variáveis quantitativas, obteve-se os dados de referente aos resultados das análises dos constituintes do leite (gordura, proteína total, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado) através do método de absorção infravermelha (Bentley 2000: Operator's Manual. Chaska, 1995) e de contagem de células somáticas eletrônica (citometria de fluxo), ambos realizados pela Clínica do Leite, instituição vinculada ao Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo em (ESALQ / USP / Piracicaba / SP / Brasil).

Para análise estatística utilizou-se programa computacional *Statistical Analysis System*[®], versão 9.4 (SAS, 2017) sob comando do procedimento PROC GLIMMIX, adotando-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis qualitativas, observou-se que a composição genética do rebanho segue em sua maioria para o genótipo A2A2 para o gene da β -caseína com 3.012 animais, que representam 76,29% de frequência genotípica do total do rebanho, seguida pelo genótipo A1A2 para o gene da β -caseína com 798 animais, que representam 20,21% e, em minoria para o genótipo A1A1 para o gene da β -caseína com 138 animais, que representam 3,49%. Foi observado aumento do genótipo A2A2 para gene da β -caseína entre as vacas de reposição em relação as vacas em produção. A frequência gênica do alelo A1 foi de 13,60% e do alelo A2 foi de 86,39%.

Para as variáveis quantitativas, observou-se que exceto para o teor de gordura (%), que não houve efeito estatisticamente significativo entre os três diferentes genótipos ($p_{\text{valor}} = 0,181$), a nível de significância de 5%, todos os demais constituintes do leite apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os três diferentes genótipos ($p_{\text{valor}} < 0,0001$), a nível de significância de 5%. Sendo o genótipo A1A1, o que apresentou as maiores médias para teor de proteína (%) (3,27a) e contagem de células somáticas (cél./ mL⁻¹) (587,11a). O genótipo A1A2, sendo o que apresentou as maiores médias para teor de proteína (%) (3,26a), teor de sólidos totais (%) (12,56a) e teor de extrato seco desengordurado (%) (8,80a). E o genótipo A2A2, sendo o que apresentou as maiores médias para o teor de lactose (%) (4,61a) e menor contagem de células somáticas (cél./ mL⁻¹) (265,11c).

Os resultados observados correspondem as informações obtidas de rebanho comercial de bovinos leiteiros, em que as vacas são submetidas as mesmas condições nutricionais e ambientais. Diante ao cenário apresentado, Carvalho (2002) explica que a gordura é o componente do leite com maior variação dentro de uma mesma espécie e raça, principalmente por fatores nutricionais e/ou metabólicos. A proteína é o segundo componente que mais variabilidade tem em função dos fatores ambientais, incluindo a nutrição, sendo geralmente, à medida que aumenta o teor de proteína do leite, aumenta a produção total. Já o conteúdo de lactose é o componente que tem menor variação em função de fatores ambientais. Noro et al., (2006) afirma que o teor de lactose diminui significativamente com o avanço da lactação, sendo que nos primeiros sessenta dias ocorre o maior teor deste glicídio e também ocorreu a redução significativamente à medida que aumenta a idade das vacas.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após as comparações quantitativas e qualitativas dos indicadores de produção do sistema de beneficiamento do leite proveniente de vacas com os genótipos A1A1, A1A2 e A2A2, submetidas as mesmas condições ambientais e nutricionais, em um rebanho comercial localizado no estado de São Paulo, Brasil, verificou-se que a distribuição do gene foi favorável para o alelo A2, o que pode estar relacionado com o apelo comercial da indústria por produtos provenientes de vacas com o genótipo A2A2.

Ao observar a maior frequência genotípica para o genótipo A2A2, seguida do A1A2 e finalmente do A1A1, e a maior frequência alélica para o alelo A2, pode-se inferir que estes animais são responsivos para a seleção genética do alelo A2 evidenciando a pressão de seleção direcionada realizada na fazenda em oferecer um produto diferenciado ao mercado, com valor agregado, principalmente na oferta dos derivados lácteos, como uma opção interessante para as indústrias que buscam produzir leite com diferencial a saúde, abrangendo até mesmo uma população de consumidores com alimentações mais restritivas devido a certos desconfortos gastrointestinais.

AGRADECIMENTOS

Universidade de São Paulo (USP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP nº processo: 2019/09583-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asledottir, T., et al. Release of β -casomorphin-7 from bovine milk of different β -casein variants after ex vivo gastrointestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 81, p. 8–11, 1 jun. 2018.
- Bentley 2000. Operator's manual. Chaska: Bentley Instruments, p. 77, 1995.
- Brooke-Taylor, S., et al. Systematic Review of the Gastrointestinal Effects of A1 Compared with A2 β -Casein. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 8, n. 5, p. 739 – 748, set. 2017.
- Çardak, A. D. Effects of genetic variants in milk protein on yield and composition of milk from Holstein-Friesian and Simmentaler cows. **South African Journal of Animal Sciences**, v. 35, n. 1, p. 41–47, 2005.
- Caroli, A. M., et al. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5335–5352, 2009.
- Carvalho, G. F., et al. Milk yield, somatic cell count and physicochemical characteristics of raw milk collected from dairy cows in Minas Gerais state. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle da Mastite. *Anais...* Ribeirão Preto, 2002.
- Elliott, R. B. et al. Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus and cow milk: Casein variant consumption. **Diabetologia**, v. 42, n. 3, p. 292–296, 1999.
- Falconer, D.S. **Introduction to Quantitative Genetics**. 3rd Edition, Longman Scientific and Technical, New York, 1989.
- Gallinat, J. L., et al. DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 699–709, 1 jan. 2013.
- Giglioti, R., et al. New high-sensitive rhAmp method for A1 allele detection in A2 milk samples. **Food Chemistry**, v. 313, p. 2 – 7, 2020.
- Kamiński, S., et al. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 3, p. 189–198, 2007.
- Maia, L. Resultado da avaliação genética dos touros girolando. **Revista da CRV Lagoa**, n. 49, 2018.
- McLACHLAN, C. N. S. β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. **Medical Hypotheses**, v. 56, n. 2, p. 262–272, 1 fev. 2001.
- Nguyen, H. T. H., et al. Differences in the yoghurt gel microstructure and physicochemical properties of bovine milk containing A1A1 and A2A2 β -casein phenotypes. **Food Research International**, v. 112, p. 217–224, 1 out. 2018.
- Statistical Analysis System. Version 9.4, SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA, 2017.
- Truswell, A. S. The A2 milk case: A critical review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, p. 623 – 631, 2005.

FATORES AMBIENTAIS QUE INFLUENCIAM CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS A MOBILIDADE EM VACAS LEITEIRAS

Denyus Augusto de Oliveira Padilha¹, Suelen Fernandes Padilha¹, Rafaela Martins²,
Altair Antônio Valloto³, Rodrigo de Almeida Teixeira⁴, Laila Talarico Dias⁴

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil, bolsista CAPES. ²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil, bolsista CNPq. ³Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa - APCBRH, Curitiba, PR, Brasil. ⁴Professor Associado do Depto. de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPR, Curitiba, PR, Brasil

INTRODUÇÃO

A claudicação é a terceira afecção de maior incidência nos rebanhos leiteiros, seguida de problemas reprodutivos e mastite, sendo que, aproximadamente, 80% dos animais apresentam algum tipo de problema nos pés e um terço das vacas são visivelmente coxas, isto é, claudicam (Frankena et al., 2009).

A incidência de lesões podais, além de comprometer a produtividade, também está associada a redução do bem estar animal (BEA). A nutrição, algumas práticas de manejo e a estrutura das instalações podem ser considerados fatores de risco para tal condição. Destes, destacam-se, por exemplo, o tempo de espera na sala de ordenha, tipo do piso, pedilúvio e a higiene, tanto dos animais quanto das instalações (Hund et al., 2019).

Na literatura foram relatados diversos critérios que podem ser utilizados para avaliação de níveis de BEA. Desta forma, muitas iniciativas de protocolos de avaliação foram estabelecidas ao redor do mundo, considerando diferentes indicadores. O *Welfare Quality*® foi desenvolvido na Europa e tem sido amplamente utilizado para embasar programas de BEA (GIBBONS, 2019).

No Paraná, em 2021, a Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) iniciou o projeto piloto denominado “+BEA”, com a intenção de estabelecer um protocolo de avaliação de características relacionadas ao bem-estar de vacas leiteiras, no qual foram avaliados indicadores indiretos relacionados a mobilidade dos animais entre os quais: claudicação, condição corporal e lesões nos jarretes. Portanto, o objetivo desse trabalho foi identificar os efeitos ambientais que influenciam as características relacionadas a mobilidade em rebanhos leiteiros do estado do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dados de 638 vacas de rebanhos leiteiros distribuídos pelos municípios de Arapotí, Castro, Carambeí e Palmeira, localizados no estado do Paraná, associados à APCBRH. Na Tabela 1 constam as porcentagens de vacas com escores adequados e não adequados em função do número de animais avaliados e do sistema de produção para cada propriedade.

Tabela 1 - Identificação das fazendas, número de vacas avaliadas (N), sistema de produção e % de animais com escore desejável e indesejável para as características.

Fazenda	N	Sistema Produtivo	% de animais com escore desejável	% de animais com escore indesejável
---------	---	-------------------	-----------------------------------	-------------------------------------

			EC	ECC	ELJ	EC	ECC	ELJ
A	39	Semi-Confinamento	72	80	74	28	20	26
B	40	Semi-Confinamento	80	33	90	20	67	10
C	105	Free-Stall	81	89	68	11	32	
D	100	Free-Stall	58	82	80	42	20	
E	94	Free-Stall	61	68	24	39	32	76 F 59
		Free-Stall	73	83	19	27	17	81 G 43 Semi-
		Confinamento	84 84 95 16 16 5 H 32	Free-Stall	78 97 63 22 3 37			
I	30	Free-Stall	60	93	3	40	7	97
J	96	Free-Stall	64	57	19	36	43	81

Legenda: EC = Claudicação (escores desejáveis entre 1 e 2); ECC = Condição corporal (escores desejáveis entre 3 e 4) e ELJ = Lesões nos jarretes (escore desejável igual a 1).

Para a amostragem, foi utilizado o método preconizado por Heyerhoff et al. (2014), em que vacas foram selecionadas aleatoriamente, entre 10 e 120 dias em lactação. Os animais foram avaliados por 3 técnicos treinados, após a ordenha, sendo que as avaliações ocorreram em dois momentos: nos canzins de alimentação, facilitando o manejo da avaliação, e soltos, para observação da claudicação, permitindo que as vacas caminhassem em superfície plana, se deslocando de 6 a 10 passadas. O escore mais recorrente foi considerado na avaliação final.

Para claudicação (EC), o escore variou de 1 (ausência de claudicação) a 5 (claudicação severa); condição corporal (ECC), o escore variou entre 1 (extremamente magro) a 5 (extremamente gordo), e lesões nos jarretes (ELJ), considerou-se 1 (ausência de lesões ou inchaços no jarrete) a 3 (jarrete com lesões aparentes ou inchaços).

Primeiramente, procedeu-se a estatística descritiva dos dados. Para o estudo dos efeitos ambientais realizou-se o procedimento GLM para dados não paramétricos, utilizando a distribuição Poisson, por meio do software R Studio, em que se considerou no modelo os efeitos fixos de fazenda e ordem de lactação (primíparas ou múltiparas), conforme o modelo apresentado a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + Faz_i + OrdLac_j + e_{ij}$$

Em que: Y_{ij} = variáveis dependentes (CL, CC e LJ); μ = média da população; Faz_i = efeito da i -ésima fazenda; $OrdLac_j$ = efeito da j -ésima ordem de lactação; e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 2 estão apresentadas as porcentagens de animais em cada escore, para cada característica avaliada. Com relação ao escore de claudicação (EC), 42,78% dos animais foram classificados com EC 1, ou seja, apresentavam marcha normal e 1,48% da amostra estavam com EC 5 (vacas com severa claudicação). Dados semelhantes foram relatados por Bicalho et al. (2007), que encontraram, respectivamente: 11,5% (EC 1), 17,3% (EC 2), 36,5% (EC 3), 37,6% (EC 4) e 1% (EC 5). Todavia, o mesmo autor identificou um número maior de vacas com sinais evidentes de claudicação, possivelmente por se tratar de um estudo em propriedades cujo sistema era *free-stall*, onde a ocorrência deste problema é favorecida pelo tipo das instalações.

Para o escore de condição corporal (ECC), 49,29% dos animais avaliados obtiveram ECC 3 (dentro do desejável) e menos de 1% dos animais foram classificados em condições de ECC extremos (ECC 1 e ECC 5). Em relação ao escore de lesões nos jarretes (ELJ), 54,28% dos animais não apresentaram lesões. No entanto, 8,40% das

vacas foram avaliadas com ELC 3, ou seja, com alguma perda evidente de pelo e inflamações na região dos jarretes.

Tabela 2 - Porcentagem (%) de animais em função do escore correspondente para claudicação (EC), condição corporal (ECC) e lesões nos jarretes (ELJ).

Características	Escore								
	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
EC	42,78		28,02		19,32		8,40		1,48
ECC	0,15	1,62	4,86	17,40	49,29	20,20	5,30	1,03	0,15
ELJ	54,28		37,32		8,40				

Pela Tabela 3, é possível notar que o efeito de fazenda foi significativo para as três características avaliadas, o que provavelmente pode ser explicado pelos diferentes tipos de sistema de criação. Segundo Costa et al.(2018), a claudicação e as lesões de jarrete podem ocorrer devido as condições de instalações, sobretudo, os diferentes tipos de materiais usados nas camas dos animais.

Tabela 3 - Resumo da ANOVA para estudo dos efeitos ambientais sobre as características de claudicação, condição corporal e lesões nos jarretes em vacas Holandesas.

Efeitos Ambientais	Características ECC			
	EC	EC	ELJ	ELJ
	GL	QM	QM	QM
Fazenda	9	28,37*	8,96***	52,27**
Ordem de Lactação	1	21,16***	0,54	2,64

Legenda: EC= Escore de claudicação; ECC=Escore de condição corporal; ELJ = Escore de lesões nos jarretes; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrados Médios; * = P < 0,1; ** = P < 0,01; *** = P <0,001.

O efeito da ordem de lactação foi significativo apenas para EC (P < 0,001), o que pode ser justificado, pois vacas primíparas tendem a ter menos problemas de mobilidade do que as multíparas, uma vez que à medida que se tornam mais velhas, a probabilidade de desenvolverem problemas nas pernas e pés é maior (Le Cozler et al., 2019).

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fazendas que utilizam o sistema de confinamento em *free-stall* devem atentarse para o tipo de cama e instalações, a fim de minimizar os problemas relacionados a claudicação e lesões nos jarretes.

AGRADECIMENTOS

Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) pela concessão dos dados para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bicalho, R. C. et al. Visual locomotion scoring in the first seventy days in milk: Impact on pregnancy and survival. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.4586–4591, 2007;
Costa, J. H. C. et al. Prevalence of lameness and leg lesions of lactating dairy cows housed in southern Brazil: Effects of housing systems. **Journal of Dairy Science**, v.101, p.2395–2405, 2018;
Le Cozler, Y. et al. Early lactation performance in Holstein heifers first calving at 36 months and managed for high or low weight gain during mid- and late gestation. **Journal of Dairy Research**, v.86, p.272–278, 2019.

FREQUÊNCIA DOS ALELOS DE KAPPA E BETA CASEÍNA EM BOVINOS DAS RAÇAS ZEBUÍNAS

Dayane Beatriz Melo Pessoa¹, Adriano Henrique do Nascimento Rangel¹, Bruna Schmitz², Cláudio Vaz Di Mambro Ribeiro³, Gregório Miguel Ferreira de Camargo³, Rodrigo Coutinho Madruga⁴, Mariana Alencar Pereira⁴, Danielle Cavalcanti Sales⁵

¹Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Macaíba, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil. ³Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil. ⁴Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ), Brasil. ⁵Instituto de Defesa e Inspeção Agropecuária do Rio Grande do Norte (IDIARN), Natal, Brasil

INTRODUÇÃO

Marcadores genético-moleculares de proteínas do leite são usados em programas de avaliação genética de bovinos. O gene da kappa-caseína possui dois alelos: A e B, sendo que o alelo B está associado a rendimento queijeiro e outras características de produção. O gene da beta-caseína apresenta dois principais alelos: A1 e A2. Todavia, ganhou notória atenção nos últimos anos pela produção de leite A2. Esse lácteo é produzido a partir da ordenha de vacas A2A2 e tem digestão facilitada.

No Brasil, as raças zebuínas têm importante participação na produção leiteira pela adaptação ao clima tropical (termorregulação e resistência a parasitas) e pelo uso em cruzamentos. As principais raças zebuínas, usadas na produção de leite, são Gir, Guzerá e Sindi, estando inclusive sob avaliação genética (Bruneli et al 2021).

Esse trabalho teve o objetivo de caracterizar as frequências alélicas e genotípicas dos alelos dos genes da kappa e beta-caseína em bovinos das raças de zebuínas Gir, Guzerá e Sindi com o intuito de traçar um panorama da potencialidade de uso e seleção desses marcadores em populações adaptadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 622 amostras (machos e fêmeas) para o gene *CSN3*, sendo Sindi (n=43), Guzerá (n=242) e Gir (n=337). Para o gene *CSN2*, foram compilados resultados de 1670 bovinos (machos e fêmeas), sendo Sindi (n=760), Guzerá (n=317) e Gir (n=593). Os dados foram cedidos por produtores de fazendas parceiras e pela Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ). Os testes foram realizados por laboratórios credenciados.

Após a elaboração do banco de dados, as frequências alélicas e genotípicas foram calculadas por contagem, usando o programa Microsoft Excel. A probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste χ^2 ao nível de significância de 1% utilizando o programa SAS v.9.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observam-se as frequências genotípicas e alélicas dos genes em estudo (Tabela 1). Para o gene *CSN3*, as frequências do genótipo AA e do alelo A são as mais altas nas três raças. Para o gene *CSN2*, as frequências do genótipo A2A2 e alelo A2 são as mais altas. As frequências genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando que as populações não estão sob efeito de fatores que alterem sua constituição genética.

Tabela 1 - Frequências alélicas e genotípicas para os genes CSN3 e CSN2.

Gene	Raça	Frequência genotípica			Frequência alélica	
		AA	AB	BB	A	B
CSN3	Sindi	0,51	0,46	0,03	0,75	0,25
	Guzerá	0,70	0,22	0,08	0,82	0,18
	Gir	0,86	0,13	0,01	0,93	0,07
CSN2		A2A2	A1A2	A1A1	A2	A1
	Sindi	0,9	0,1	0	0,95	0,05
	Guzerá	0,83	0,17	0	0,92	0,08
	Gir	0,79	0,19	0,02	0,89	0,11

As frequências alélicas para o gene CSN3 aqui apresentadas são praticamente as mesmas por Azevedo et al (2008). Inclusive os genótipos dos touros avaliados para o gene CSN3 é divulgado em sumários de touros (Bruneli et al., 2021). A manutenção das frequências alélicas (mesmo que em populações diferentes) pode ser indicativo de falta de associação dos alelos com características produtivas ou pequena contribuição dos alelos na variância das características nas populações em questão como reportado em algumas meta-análises (Mahmoudi et al., 2020).

Para o gene CSN2, as frequências genotípicas do A2A2 são altas (>~0,80). Esses resultados estão em acordo com resultados prévios para as raças (Rangel et al., 2017). Alguns produtores possuem interesse em selecionar animais com genótipo A2A2 a fim de obter lácteos A2. Esses produtos possuem digestão facilitada, valorização e aceitação do mercado. Selecionar animais de raças zebuínas para populações completamente A2A2 é fácil devido às altas frequências encontradas nas populações. Trata-se de uma característica que valoriza a criação e seleção das raças pelos produtores.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo representa um compêndio de resultados de genotipagem para os genes CSN3 em CSN2 em três importantes raças zebuínas. Trata-se de um trabalho com um grande número de animais genotipados e bastante representativo das populações. Há inalterações das frequências do gene CSN3 nos últimos anos e confirmação da potencialidade produção de leite A2 a partir das raças zebuínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo, A. L., et al. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 79, p.623-630, 2008.
- Bruneli, F. A., T., et al. **Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite[...]**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p.93, 2021.
- Rangel, A. H. N., et al. Estimation of genetic and phenotypic trends for dairy traits of Gyr and Guzerá breeds. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 40, p. 36685, 2017.
- Mahmoudi et al. A meta-analysis on association between CSN3 gene variants and milk yield and composition in cattle. **Anim. Gene**, v. 51 p. 369-381. 2020.

AGRADECIMENTOS

Ao Escritório Regional da ABCZ no Rio Grande do Norte e ao CNPq pelo financiamento da bolsa de pesquisa.

GANHOS GENÉTICOS DAS CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO DE LEITE E SÓLIDOS EM REBANHOS DA RAÇA HOLANDESA NO BRASIL

Timotheo Souza Silveira¹, Júlia Maria Ebeling², Cláudio Nápolis da Costa³, Rodrigo de Almeida²

¹Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Castro, Brasil.

²Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. ³Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil

INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira é uma das principais fontes de renda para os produtores do Brasil, e devido à crescente demanda no fornecimento de matéria-prima para industrialização, torna-se indispensável promover a qualidade do leite produzido. A seleção de animais geneticamente superiores é uma alternativa para aumentar a produção de leite e de sólidos, em benefício da qualidade e da economia leiteira.

O delineamento de um programa de seleção objetiva a melhoria do padrão genético dos animais, e é definido por objetivos e critérios estrategicamente estabelecidos. O processo de seleção consiste na escolha dos animais de padrão genético superior, identificados por meio dos valores genéticos obtidos das avaliações genéticas que se baseiam na análise estatística de registros de desempenho e de genealogia dos animais da população envolvida no programa. Diversas formas podem ser utilizadas para promover o progresso genético de um rebanho, dentre elas, a seleção de animais através da PTA (*Predicted Transmitting Ability*) (Borelli et al., 2022).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi descrever e avaliar a estrutura da base de dados oficiais de rebanhos da raça Holandesa de todo o Brasil, para as características de produção de leite e sólidos, bem como os seus valores genéticos, expressos em PTA, e tendências de ganhos genéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Aproximadamente treze milhões de registros zootécnicos – incluindo partos, controles leiteiros e genealogia – oriundos de rebanhos em controle leiteiro oficial, foram utilizados para realizar as avaliações genéticas. Os registros de genealogia (ano de nascimento, ascendência no pedigree e origem) e do desempenho produtivo (produções de leite, de gordura e de proteína) dos controles leiteiros das três primeiras lactações foram editados para ano de nascimento (1986 a 2020), ano de parto (1992 a 2021), mês do controle leiteiro, idade ao parto em conformidade com a ordem de lactação, composição racial, tamanho do rebanho e grupo contemporâneo de mês do controle da produção no rebanho. Os registros de produção foram avaliados para cada lactação, idade e dias em lactação, eliminando-se os valores extremos (± 3 desvios padrões). Eliminou-se também animais cuja sequência de datas de controle não coincidissem com o número de dias em lactação.

Após tais edições, foram então analisados mais de cinco milhões de registros de controle leiteiro, de mais de 300 mil vacas, progênie de mais de 7,5 mil touros, obtidos em aproximadamente 1400 rebanhos. As predições dos valores genéticos de cada animal foram obtidas pela metodologia de melhor previsão não-viesada (BLUP), com estimativas dos componentes de variância e coeficientes de autocorrelação obtidas por DFREML (BOLDMAN et al., 1995), com o modelo animal auto-regressivo utilizando os registros do controle leiteiro disponíveis das três primeiras lactações, com o programa MATLAB.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela abaixo estão apresentadas informações sobre a estrutura da base de dados, valor da média geral e das estimativas dos componentes de variância e das herdabilidades por lactação, para as características de produção de leite e sólidos.

Tabela 1 – Número de controles, animais e rebanhos, com respectivas médias de produção e estimativas de componentes de variância genética aditiva e residual e da herdabilidade das características de produção e componentes sólidos do leite (em kg) nas três primeiras lactações de vacas da raça Holandesa no Brasil.

Indicadores Parâmetros	Produção (kg/dia)		
	Leite	Gordura	Proteína
Média	29,9 ± 8,70	0,95 ± 0,31	0,87 ± 0,24
Controles Leiteiros	5.225.212	4.804.943	4.755.334
Vacas	310.350	303.391	299.175
Touros	7.896	7.803	7.623
Rebanhos	1.509	1.492	1.460
Variância genética	10,00 ± 0,43	0,014 ± 0,001	0,010 ± 0,002
Variância residual 1/2/3*	8,18/10,18/11,83	0,020/0,032/0,037	0,007/0,010/0,011
Herdabilidade 1/2/3*	0,25/0,22/0,18	0,23/0,16/0,14	0,28/0,19/0,18

A tendência genética caracteriza o progresso genético ou resposta à seleção realizada e o sentido da sua evolução ao longo de um determinado período. A sua avaliação fornece uma indicação de sucesso com relação aos impactos desejados e motiva a identificação de aspectos que possam eventualmente ter comprometido o que se planejou inicialmente. Embora de pequena magnitude, os ganhos genéticos foram favoráveis e consistentes para as produções de leite, de gordura e de proteína de vacas da raça Holandesa, nascidas entre 2010 e 2019, no Brasil, incluídas na Avaliação Genética Nacional da raça. Neste período, a tendência genética para produção de leite em quilos variou aproximadamente entre -200 e +75; enquanto que para a produção de sólidos em quilos os valores foram de -8,00 a 6,00 e -6,00 a 2,00 para gordura e proteína, respectivamente.

A partir de 2018 observou-se uma inflexão na tendência do ganho para a produção de leite, o que contribuiu para as similares tendências de inflexão nas produções de gordura e de proteína, uma vez que para as respectivas porcentagens, os ganhos foram contínuos, com maior intensidade para a porcentagem de gordura.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram que existe a introdução de genética melhoradora e que se têm adotado manejo reprodutivo de acasalamento para que ocorram aumento de sólidos, principalmente decorrente de incentivos de mudança de preço pago ao produtor para essas características. Produtores buscam um ganho genético maior em sólidos.

As estratégias de seleção e acasalamento de touros e vacas definidas pelos criadores determinarão a realização de taxas anuais de ganho para a melhoria genética dos rebanhos, e conseqüentemente, da raça Holandesa no Brasil, além dos ganhos em produtividade e em eficiência técnico-econômica de seus sistemas de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boldman, K.G., et al. A manual for use of MTDFREML: a set of programs to obtain estimates of variances and covariances (DRAFT). Lincoln: Department of Agriculture/Agriculture Research Service. 125p., 1995.
- Borelli, E., et al. Associations between putative risk factors and poor colostrum yield in Holstein Friesian cattle. Research in Veterinary Science, v.149, p.74-81, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2022.06.008>

GANHOS GENÉTICOS DE ESCORE DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM REBANHOS DA RAÇA HOLANDESA NO BRASIL

Timotheo Souza Silveira¹, Júlia Maria Ebeling², Cláudio Nápolis da Costa³, Rodrigo de Almeida²

¹Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Castro, Brasil.

²Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. ³Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil

INTRODUÇÃO

As características relacionadas a saúde de glândula mamária e a qualidade do leite estão nos últimos anos em evidência, principalmente devido a questões de legislação no Brasil. Buscar melhorias de manejo de rebanhos para que possam estar enquadradas na legislação é um primeiro passo para os produtores. Como estratégia adicional, a escolha de touros melhoradores para essa característica pode contribuir na busca de leite de qualidade.

A Contagem de Células Somáticas (CCS) é reconhecida internacionalmente como indicador de saúde da glândula mamária e da qualidade do leite produzido (Tsenkova et al., 2001). A variação da CCS está associada basicamente à presença de infecções intramamárias no rebanho e depende da duração da infecção, do patógeno envolvido, da presença de doenças intercorrentes, do estágio de lactação, do número de lactações, do grupamento racial, da produtividade dos animais, bem como do manejo e alimentação dos animais (Gonzalez et al., 2003).

A CCS apresenta uma distribuição que não é normalizada e para adequação nos programas de seleção genética é importante a correção; dessa forma um índice com base logarítmica é adotado, sendo obtido pela transformação numérica da CCS (CCS, 1000 células/ml): $ECS = \log_2 (CCS/100) + 3$.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi descrever e avaliar a estrutura das bases de dados oficiais de rebanhos da raça Holandesa no Brasil para as características de escore de células somáticas (ECS), bem como os seus valores genéticos, expressos em PTAs, e tendências de ganhos genéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Aproximadamente treze milhões de registros zootécnicos – incluindo partos, controles leiteiros e genealogia – oriundos de rebanhos em controle leiteiro oficial, foram utilizados para realizar as avaliações genéticas em 2022. Os registros de genealogia (ano de nascimento, ascendência no pedigree e origem) e da contagem de células somáticas dos controles leiteiros das três primeiras lactações foram editados para o ano de nascimento (1986 a 2020), ano de parto (1992 à 2021), mês do controle leiteiro, idade ao parto em conformidade com a ordem de lactação, composição racial, tamanho do rebanho e grupo contemporâneo de mês do controle da produção no rebanho. Os registros zootécnicos são coletados através dos técnicos de campo das filiais da raça Holandesa e enviados para o Herdbook da raça.

Os registros de produção foram avaliados para cada lactação, idade e dias em lactação, eliminando-se os valores extremos (± 3 desvios-padrões). Eliminou-se também animais cuja sequência de datas de controle não coincidissem com o número de dias em lactação. Após tais adequações, foram então analisados mais de cinco milhões de registros de controle leiteiro de mais de 300 mil vacas, progênie de mais de 7,5 mil touros, obtidos em aproximadamente 1400 rebanhos. As predições dos valores genéticos de cada animal foram obtidas pela metodologia de melhor previsão não-viesada (BLUP), com estimativas dos componentes de variância e coeficientes de autocorrelação obtidas por DFREML (Boldman et al. 1995), com o modelo animal auto-

regressivo utilizando os registros do controle leiteiro disponíveis das três primeiras lactações, com o programa MATLAB.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela abaixo estão apresentadas informações sobre a estrutura das bases de dados, valor da média geral, e das estimativas dos componentes de variância e das herdabilidades por lactação, para escore de células somáticas.

Tabela 1 – Número de controles, animais e rebanhos, com respectiva média de escore de células somáticas (ECS) e estimativas de componentes de variância genética aditiva e residual e da herdabilidade de ECS nas três primeiras lactações de vacas da raça Holandesa no Brasil.

Indicadores / Parâmetros	ECS
Média	2,81 ± 2,16
Controles Leiteiros	4.804.549
Vacas	296.485
Touros	7.534
Rebanhos	1.449
Variância genética	0,75 ± 0,009
Variância residual Lact.1/2/3*	1,20/1,30/1,65
Herdabilidade Lact. 1/2/3*	0,19/0,17/0,16

Os valores genéticos (VG) indicam o potencial genético de touros e de vacas, cuja metade é transmitida às suas progênes, e neste caso, estão expressos em PTA (VG/2). A tendência genética caracteriza o progresso genético ou resposta à seleção realizada e o sentido da sua evolução ao longo de um determinado período. A sua avaliação fornece uma indicação de sucesso com relação aos impactos desejados e motiva a identificação de aspectos que possam eventualmente ter comprometido o que se planejou inicialmente. Entre os anos de 2010 e 2019, a PTA para escore de células somáticas (em unidades) variou de, aproximadamente, -0,16 a -0,02. A tendência genética foi favorável até 2017, quando uma inflexão direcionou, com ganhos médios negativos, uma tendência desfavorável nos últimos anos.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tais resultados sugerem uma maior atenção aos processos de escolha e acasalamento dos progenitores e, particularmente, para a seleção direcionada para ECS. As estratégias de seleção e acasalamento de touros e vacas definidas pelos criadores determinarão a realização de taxas anuais de ganho para a melhoria genética dos rebanhos, e conseqüentemente, da raça Holandesa no Brasil, além dos ganhos em produtividade e em eficiência técnico-econômica de seus sistemas de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boldman, K.G., et al. A manual for use of MTDFREML: a set of programs to obtain estimates of variances and covariances (DRAFT). Lincoln: Department of Agriculture/Agriculture Research Service. 125p, 1995.
- Gonzalez, S. G., et al. Influência de fatores raciais e manejo nutricional na contagem de células somáticas e nos constituintes do leite de vacas holandesas e mestiças no Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.25, p.323-329, 2003.
- Tsenkova, R., et al. Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: a new diagnostic tool. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2550-2557, 2001.

GENETIC CORRELATIONS BETWEEN PREDICT TRANSMITTING ABILITIES FOR BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS AND PRODUCTION, REPRODUCTION AND HEALTH TRAITS IN HOLSTEIN DAIRY CATTLE

Simone da Silva¹, Denyus Augusto de Oliveira Padilha¹, Altair Antônio Valloto², Rodrigo de Almeida Teixeira³, Francisco Peñagaricano⁴, Laila Talarico Dias³

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, Brazil, bolsista CAPES. ²Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa - APCBRH, Curitiba/PR. ³Professor Associado do Depto. De Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPR, Curitiba, PR, Brazil. ⁴University of Wisconsin-Madison, Madison/WI

INTRODUCTION

Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is an important pathogen reported in herds worldwide, endemic in many countries, and is one of the main diseases that cause losses in dairy cattle.

Clinical manifestation can vary from asymptomatic to severe when the death of the animal occurs. The immunosuppression caused by the disease is associated with the development of other economically important secondary infections in cattle, such as respiratory disease and mastitis. Reproduction losses include premature embryo death, low fertility, abortion, congenital defects, growth retardation, and the birth of debilitated animals. Moreover, in utero infection during the first trimester of gestation can lead to the development of animals known as persistently infected (PI), which are an important source of infection in the herd. Production losses are caused mainly by the reduction in milk production.

Genetic selection is a tool used in breeding programs that provides progressive and permanent gains, it can contribute to eradication programs by considering selecting sires, thus helping reduce health disorders in dairy herds. In this sense, understanding the BVD virus and the role of this pathogen in the dairy cattle industry is crucial in order to elaborate strategies for effective eradication programs to reduce the occurrence of BVDV in dairy herds.

Therefore, this study aimed to estimate the genetic correlation between sire predict transmitting abilities (PTA) for bovine viral diarrhea virus and predict transmitting abilities for milk production, productive life, gestation length, heifer conception rate, mastitis, and somatic cell scores.

MATERIALS AND METHODS

565 sires belonging to the Paranaense Holstein Cattle Breed Association (APCBRH) database, in 7 commercial farms in the State of Parana (South of Brazil), were used to estimate the predict transmitting abilities (PTA) for bovine viral diarrhea virus (BVDV). The APCBRH started collecting BVDV data in 2015 (Freitas et al., 2021). Therefore, the BVDV data contains information between the years 2015 to 2021.

These bulls were identified in the Council on Dairy Cattle Breeding (CDCB) database, so the predict transmitting abilities (PTA) information for milk production (MP), productive life (PL), gestation length (GL), heifer conception rate (HCR), mastitis (MAS) and somatic cell scores (SCS) were obtained at the CDCB website.

Sires breeding value was predicted through THRGIBBS/BLUPF90 family of programs (Misztal et al., 2021) and sire predicted transmitting ability (PTA) for bovine viral diarrhea virus (BVDV) was calculated. Data edition and genetic correlation analyses were carried out using the statistical program R (R Core Team, 2021).

RESULTS AND DISCUSSION

The genetic correlations between sires's predict transmitting abilities for BVDV and the other traits studied are shown in table 1.

Table 1 - Genetic correlations of PTA for Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) with other predicted transmitting ability (PTA) traits.

Trait	Genetic correlation
Milk production	-0.0095
Productive life	-0.0658
Gestation length	0.0165
Heifer conception rate	0.0496
Mastitis	0.0507
Somatic cell scores	0.0597

The genetic correlations for all the traits were close to zero and non-significant. This result probably occurs because, from the 565 sires presented in the dataset, only 53 animals born from those sires were positive for BVDV. The small amount of positive information on the health data may be a reason for a non-significant genetic correlation between the traits. Genetic improvement programs depend exclusively on phenotypic records. In Brazil, notification of BVDV cases is not mandatory, so adherence to the control program is voluntary. Therefore, it is still challenging to have farmers recording this sort of information.

In Ethiopia, Aragaw et al. (2021) have also encountered difficulties in demonstrating a significant association between BVDV and reproductive events. They concluded that limited information retrieval due to the absence of reproduction data, along with the possibility of occurrence of other important reproductive problems in the herds may be a reason for this result.

Recent studies described that cows with mastitis were more likely to be seropositive for BVDV, which affects milk production. In addition, the negative effects of the disease also reflect the decrease in the reproductive efficiency of animals. According to Yavru et al. (2013), the detection of BVDV in the blood of seropositive cows may be associated with a 28 to 71% reduction in the first service conception rate. Arnaiz et al. (2013) reported an important increase in calving to conception intervals after a BVDV outbreak, impacting negatively the fertility performance.

The role of BVDV as an immunosuppressive agent and its association with secondary disease cases and reproductive disorders are well established in the literature.

Furthermore, health traits have been implemented in breeding programs around the globe. The strategy aims to maintain diseases at a small proportion and improve herd health, animal welfare, and profitability.

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

We estimated negligible genetic correlations between sires' PTA for BVDV and sires' PTA for other traits of economic interest.

In dairy farms management, we suggest recording data for disease traits such as BVDV as well as its pedigree information. The implementation of control and biosecurity measures, along with the planning of an eradication program can be a strategy to minimize health problems in dairy herds.

ACKNOWLEDGMENTS

CAPES for the sponsorship and Paranaense Holstein Cattle Breed Association (APCBRH) for providing the data.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

- Aragaw, K. et al. Seroprevalence and association of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) serostatus with reproductive problems in dairy cattle in central and southern Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 5, p. 1-9, 2021.
- Arnaiz, I. et al. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection: Effect on reproductive performance and milk yield in dairy herds. **The Veterinary Journal**, v. 277, p. 105747, 2021.
- Yavru, S. et al. Effects of bovine viral diarrhoea virus on the fertility of cows. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 61, n. 2, p. 281-289, 2013.

PARÂMETROS GENÉTICOS PARA PORCENTAGEM DE GORDURA E PROTEÍNA PARA PRIMIPARAS HOLANDESAS USANDO MODELOS DE REGRESSÃO ALEATÓRIA

Amauri Felipe Evangelista¹, Rafaela Martins², Denyus Augusto de Oliveira Padilha², Suelen Fernandes Padilha², Altair Antônio Valloto³, Laila Talarico Dias⁴, Rodrigo de Almeida Teixeira⁴

¹Doutor em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil. ²Discente do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil. ³Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa - APCBRH, Curitiba, PR, Brasil. ⁴Professor Associado do Depto de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPR, Curitiba, PR, Brasil

INTRODUÇÃO

As indústrias de produtos lácteos têm aumentado o incentivo para a obtenção de leite de melhor qualidade, concedendo bônus aos produtores que obtêm vacas que produzem leite com níveis de gordura e proteína elevados (Romano et al., 2020). Por essa razão, nos últimos anos os programas de melhoramento genético de bovinos leiteiros passaram a valorizar os constituintes do leite, incluindo as porcentagens de gordura e proteína como critérios de seleção.

A partir do conhecimento das estimativas de parâmetros genéticos dessas características ao longo da curva de produção, será possível traçar estratégias eficientes para melhor definir objetivo e critérios de seleção, bem como a seleção de animais com mérito genético superior (Scholtens et al., 2020).

No Irã, Khanzadeh et al. (2013) avaliaram vacas Holandesas e estimaram coeficientes de herdabilidades de 0,053 a 0,232 e 0,111 a 0,259 para porcentagens de gordura e proteína, respectivamente. Os autores sugeriram que seria mais adequado selecionar para porcentagem de gordura entre o terceiro e quarto mês de lactação, enquanto para porcentagem de proteína nos últimos meses de lactação.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi estimar os parâmetros genéticos para porcentagem de gordura e proteína em bovinos da raça Holandesa no estado do Paraná por meio do modelo de regressão aleatória para identificar em qual período a seleção para essas características será mais eficiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 414.030 registros de lactações do período 2010 a 2017 pertencentes ao banco de dados histórico da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH). Foram consideradas as informações de porcentagem de gordura (%G) e porcentagem de proteína (%P) avaliadas no dia do controle, agrupadas em 20 classes quinzenais de lactação, de vacas da raça Holandesa de primeira lactação, com idade ao parto variando de 18 a 43 meses, controladas do 5º dia após o parto até o 305º dia de lactação.

Foram excluídas informações de rebanhos com menos de 10 animais, vacas com menos de 5 controles leiteiros e cujo primeiro controle leiteiro foi realizado após 45 dias do parto, além de grupos de contemporâneos (rebanho, ano e mês do controle leiteiro) com menos de três animais. Após a edição dos dados restaram 47.194 vacas (filhas de 1760 touros e 34729 vacas). A matriz de parentesco utilizada continha dados de 81.272 animais, que incluíam 2.437 touros e 45.356 mães.

As características foram analisadas por meio de um modelo de regressão aleatória, empregando-se polinômios de Legendre de 4ª ordem, com variância residual homogênea. No modelo, considerou-se como fixos os efeitos de grupo contemporâneo, interação entre a frequência de ordenha (2 ou 3 vezes por dia) e dias em lactação (20 classes), além dos efeitos linear e quadrático da idade da vaca ao parto, como

covariável. Como aleatórios foram considerados os efeitos: genético aditivo direto, ambiente permanente do animal e residual.

Os parâmetros genéticos foram estimados por meio de inferência Bayesiana, utilizando o programa GIBBS2F90 (Misztal et al., 2015). Foram geradas cadeias amostrais com comprimento de 500.000 ciclos, com descarte inicial de 50.000 amostras e um intervalo de armazenamento de 20 amostras, resultando em 22.500 amostras. As análises de convergência foram realizadas por avaliações gráficas e pelo teste de Geweke, por meio do pacote BOA (*Bayesian Output Analysis*), implementado no software R.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

No início da lactação, as variâncias genéticas e de ambiente permanentes foram menores, mas foram aumentando conforme os dias de lactação (Tabela 1). Nesse contexto, vale ressaltar que houve uma tendência de declínio das estimativas de ambiente permanente após os sete meses de lactação (210 dias).

Tabela 1 - Estimativas de variância genética aditiva (σ^2_a), de ambiente permanente (σ^2_{ap}) e herdabilidades (h^2_a) para porcentagem de gordura e proteína no dia do controle para bovinos da raça Holandesa.

DL	% Gordura			% Proteína		
	σ^2_a	σ^2_{ap}	h^2_a	σ^2_a	σ^2_{ap}	h^2_a
20	0,066	0,031	0,27	0,0141	0,0070	0,40
35	0,080	0,035	0,30	0,0156	0,0069	0,42
50	0,092	0,039	0,32	0,0169	0,0069	0,43
65	0,102	0,043	0,34	0,0180	0,0069	0,45
80	0,111	0,047	0,35	0,0190	0,0070	0,46
95	0,118	0,051	0,36	0,0198	0,0072	0,46
110	0,124	0,054	0,37	0,0206	0,0074	0,47
125	0,130	0,057	0,37	0,0212	0,0076	0,48
140	0,134	0,059	0,38	0,0217	0,0078	0,48
155	0,137	0,061	0,38	0,0222	0,0080	0,48
170	0,140	0,063	0,39	0,0226	0,0081	0,48
185	0,142	0,064	0,39	0,0231	0,0083	0,49
200	0,144	0,064	0,39	0,0235	0,0084	0,49
215	0,145	0,064	0,39	0,0239	0,0084	0,49
230	0,146	0,063	0,40	0,0244	0,0084	0,50
245	0,148	0,062	0,40	0,0249	0,0083	0,50
260	0,149	0,060	0,40	0,0255	0,0081	0,51
275	0,151	0,057	0,41	0,0262	0,0078	0,52
290	0,153	0,054	0,42	0,0270	0,0074	0,54
305	0,155	0,049	0,43	0,0280	0,0069	0,56

As estimativas de herdabilidade variaram de moderada a alta magnitude, de 0,27 a 0,43 e de 0,40 a 0,55, para as porcentagens de gordura e proteína, respectivamente, indicando que as duas características devem responder à seleção direta durante toda a curva de lactação, sendo as maiores estimativas observadas no terço final da lactação (Tabela 1). Resultados semelhantes foram relatados em estudos realizados por Paiva et al. (2022).

Porém, Grayaa et al. (2019), estudando uma população de vacas Holandesas na Tunísia, estimaram herdabilidade de baixa magnitude de 0,02 a 0,06 (porcentagem de gordura) e 0,03 a 0,10 (porcentagem de proteína). Essas diferenças são provavelmente causadas por diferenças ambientais, bem como diferenças genéticas entre rebanhos e metodologias adotadas.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção direta para porcentagem de gordura e porcentagem de proteína será eficiente independentemente do período da lactação.

AGRADECIMENTOS

Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) pela concessão dos dados para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Grayaa, M., et al. Linking first lactation survival to milk yield and components and lactation persistency in Tunisian Holstein cows. **Archives Animal Breeding**, v. 62, n. 1, p. 153-160, 2019.
- Khazadeh, H., et al. Estimation of genetic parameters and trends for milk fat and protein percentages in Iranian Holsteins using random regression test day model. **Archives Animal Breeding**, v. 56, n. 1, p. 487-496, 2013.
- Misztal, I., et al. Manual for BLUPF90 family of programs. p. 125, 2015.
- Paiva, J. T., et al. Random regression test-day models to describe milk production and fatty acid traits in first lactation Walloon Holstein cows. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 139, n. 4, p. 398-413, 2022.
- Romano, G. S., et al. Genetic parameters between somatic cell score and production traits for Holstein cattle in Southern Brazil. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 33, n. 1, p. 60-70, 2020.
- Scholtens, M. R., et al. Genetic parameters for total lactation yields of milk, fat, protein, and somatic cell score in New Zealand dairy goats. **Animal Science Journal**, v. 91, n. 1, p. e13310, 2020.

REALIZAÇÃO:



PATROCÍNIO OURO:



PATROCÍNIO PRATA:



PATROCÍNIO BRONZE:



PATROCÍNIO ESTANDE:



APOIO:



ORGANIZAÇÃO:

