

FORMAÇÃO DE BIOFILME NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS POR ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADAS DE MASTITE BOVINA

Alessandra Pereira Sant' Anna Salimena*

RESUMO

O leite compõe as refeições diárias de inúmeras famílias, portanto há uma constante preocupação quanto à qualidade e à eliminação dos fatores contaminantes presentes no processo de obtenção desses produtos. Entre as doenças que acometem o gado bovino leiteiro, encontra-se a mastite, a qual consiste na infecção intramamária causada primariamente pela presença de microrganismos patogênicos. Diversas pesquisas comprovam *Staphylococcus aureus*, como o microrganismo mais frequentemente isolado de amostras de leite provenientes dessa enfermidade em inúmeras propriedades rurais em todo o mundo. A análise da diversidade genética de *S. aureus* e o estudo de diferentes cepas têm sido vistos como etapas indispensáveis para o controle mais efetivo da doença. A capacidade dos *S. aureus* aderirem à superfície do epitélio está associada à produção de biofilmes, sendo esse constituído por multicamadas de células embebidas em uma matriz. A proposta do presente artigo é realizar uma breve reflexão sobre a importância do estudo e controle microbiológico da mastite com finalidade de amenizar sua disseminação e aumentar a eficácia desse controle, visando à saúde e ao bem-estar humano e animal.

Palavras-chave: Produtos lácteos. Controle microbiológico. Fatores de virulência.

1 INTRODUÇÃO

Denomina-se leite como sendo o produto normal, fresco, integral, oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, proveniente de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (FONSECA; SANTOS, 2000).

O Brasil ocupa posição de destaque quando observados os índices de produção da pecuária leiteira mundial. Como um país, em sua essencialidade, promotor da atividade agropecuária, fiscaliza todas as etapas de processamento do leite por meio de diversos órgãos competentes, bem como enfermidades que acometam desde os animais até os consumidores, decorrentes de qualquer irregularidade de manejo e higiene (MENEZES, 2013).

* Doutoranda em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Lavras (UFLA). E-mail: alessandrasalimena@yahoo.com.br

A mastite continua sendo grande problema para a pecuária leiteira, apesar das diversas pesquisas voltadas para o diagnóstico e controle dessa enfermidade (MEDEIROS et al. 2011). Acarreta inúmeros prejuízos econômicos, entre eles gastos com medicamentos, descarte de animais, diminuição da produção leiteira, entre outros. Pode-se ressaltar também alerta à saúde pública, pois o manejo ou o tratamento inadequado possibilitam a presença desses patógenos ou de resíduos de antimicrobianos no leite destinado ao consumo humano, acarretando casos de toxinfecções alimentares.

Embora possa ser ocasionada por inúmeros patógenos, *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes das mastites consideradas contagiosas, apresentando elevada incidência na maioria dos rebanhos leiteiros em vários países.

Dentre as características que tornam esse microrganismo um dos principais agentes causadores de mastite, destaca-se a alta capacidade de invasão, que permite a infecção de regiões mais profundas da glândula mamária. Adicionalmente, ocorre formação de tecido fibroso no foco da infecção, formando "bolsões" de bactérias que dificultam a ação dos antibióticos ao local da infecção.

Diversos fatores de virulência (resistência à fagocitose, reconhecimento e ligação a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, capacidade de metabolizar substratos presentes no leite) contribuem para a diversidade genética de *S. aureus* e auxiliam no estabelecimento das infecções causadas pelo patógeno.

Mediante certas condições, os microrganismos se aderem, interagem com diversas superfícies e iniciam o crescimento celular, sendo então formado o biofilme. Esses podem ser caracterizados como comunidades microbianas constituídas por células sésseis, mono ou multiespécies, aderidas em superfícies embebidas numa matriz de polímeros extracelulares (Exopolissacarídeos - EPS).

Nas indústrias de alimentos, a existência de biofilmes é problemática, sendo responsável por prejuízos de ordem econômica e contaminações dos alimentos. Consequentemente, pesquisas envolvendo a caracterização da capacidade de formação de biofilmes microbianos são relevantes para posteriormente se realizarem estudos utilizando agentes sanificantes e antibióticos para prevenção ou remediação de superfícies com biofilmes já formados.

A presente revisão foi construída com o objetivo de evidenciar a importância do estudo e o controle microbiológico da mastite com a finalidade de amenizar sua disseminação e aumentar a eficácia desse controle, visando à saúde e ao bem-estar humano e animal.

2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE NO BRASIL

O leite, por definição do Ministério de Abastecimento, Pecuária e Agricultura (MAPA), é, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011).

Do ponto de vista biológico, leite é o produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cuja função natural é a alimentação dos recém-nascidos. Do ponto de vista físico químico, leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias (lactose, glicerídeos, proteínas, sais, vitaminas, enzimas etc.) em que algumas estão em emulsão (gordura e substâncias associadas), em suspensão (caseínas ligadas a sais minerais) e outras em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais etc.) (LIMA et al., 2007).

O leite, fonte de alimento natural mais completo que existe, reconhecido pelo seu alto valor nutritivo e energético, constitui um excelente meio onde, sem preparações ou alterações físico-químicas, podem-se desenvolver, com maior ou menor intensidade, as mais variadas formas de microrganismos, modificando, assim, as suas características primárias e comprometendo a qualidade final de seus subprodutos (ALBUQUERQUE, 1997).

O conceito de alimento seguro é dado a partir da definição de risco significativo. A maior parte dos pesquisadores concorda que risco igual a zero é impraticável, devido à quantidade de produtos alimentícios disponíveis, da complexidade da cadeia de distribuição e da natureza humana. Os riscos de ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) devem ser reduzidos ao máximo, durante sua produção, para se obter risco aceitável e de acordo com os padrões exigidos pela legislação (RICHARDS, 2002).

O Brasil é atualmente o quarto maior produtor de leite no mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos, Índia e China (FAO, 2013). Em 2011, a produção brasileira atingiu 32,1 bilhões de litros de leite fluido, sendo que 33% desse volume se trataram de leite não inspecionado (EMBRAPA, 2014). O destino do leite sem inspeção é o mercado informal, podendo ser vendido diretamente ao consumidor ou ser comercializado na forma de derivados produzidos por pequenos laticínios (BARRETO et al., 2012).

No ano de 2012, o Brasil obteve a terceira posição no ranking dos maiores países produtores de leite do mundo, com produção equivalente a 33,2 milhões de toneladas métricas aproximadamente (IBGE, 2012). Entre os maiores produtores na última década, apresentou a maior taxa de crescimento anual de produtividade, o que reforça a argumentação do elevado potencial da produção nacional (MACHADO et al., 2008).

A baixa qualidade microbiológica encontrada no leite *in natura* produzido no Brasil é reflexo das precárias condições de higiene na produção nacional. Embora importantes para a economia do país, as fazendas leiteiras ainda apresentam pouco ou nenhum conhecimento tecnológico, com condições higiênicas insatisfatórias e controle sanitário ineficiente (NERO et al., 2009).

3 MASTITE

O saldo da balança comercial brasileira de lácteos considera Minas Gerais o Estado que mais contribuiu para as exportações, com embarques de US\$ 224,5 milhões (CARVALHO et al., 2008). Entretanto estudos demonstraram significativa queda de 12 a 15% na produção de leite todos os anos, representando desperdício de 2,4 bilhões de litros de leite/ano. Uma das principais razões para essa perda é a mastite bovina (DIAS, 2007).

A mastite nesses animais é um grave problema, tanto pela redução na produtividade, como pelos riscos à saúde pública (SILVA et al., 2001). Trata-se de uma inflamação da glândula mamária (ocasionada na sua maioria por bactérias), incluindo não apenas tecidos intramamários, mas também estruturas anatômicas relacionadas, tais como tetos e dutos de leite (FETHERSTON, 2001).

Quanto à forma de apresentação, essa doença pode ser classificada como clínica ou subclínica. A mastite clínica é facilmente diagnosticada por alterações no leite e no úbere. No entanto os principais prejuízos à produção são ocasionados pela mastite subclínica, que não é diagnosticada pela observação visual da fêmea ou do leite, e sim pela presença de elevadas Contagens de Células Somáticas (CCS) no leite. O controle dessa enfermidade está mais relacionado ao sucesso de práticas preventivas que de tratamentos medicamentosos, sendo importante aumentar a capacidade de resposta do sistema imune do animal, através de vacinas contra esses agentes (CONTRERAS et al., 2007).

Devido à considerável incidência em rebanhos do mundo todo, é de grande importância estudar a etiologia dessa enfermidade, as causas e os tipos mais comuns. Assim, pode-se formar uma base teórica para dissertar a respeito de métodos de prevenção e de tratamentos eficazes, visando, sobretudo, melhorar a qualidade do leite produzido e minimizar as perdas econômicas (HACHEM, 2005).

4 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Staphylococcus são cocos Gram-positivos, pertencentes à família *Staphylococcaceae*, imóveis, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 μm e, por dividirem-se em planos diferentes, quando vistos ao microscópio, aparecem na forma de cacho de uva. São bactérias anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, então, produzem catalase (GARRITY, 2006). São bactérias mesófilas e a temperatura de crescimento encontra-se na faixa de 7°C a 47,8°C e pH de crescimento variando entre 4,2 e 9,3, com ótimo entre 7 a 7,5 (BERGDOLL, 1990). Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos, com produção de ácidos (NETO et al., 2002). O crescimento ocorre em ágar nutritivo e ágar-sangue (QUINN et al., 2011). Considerando a atividade de água (a_w), os estafilococos são únicos em sua capacidade de multiplicar-se em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para bactérias não halofílicas. São tolerantes a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio, em que o valor mínimo de a_w considerado é de 0,83 (PORTOCARRERO et al., 2002).

Cerca de 47 espécies de estafilococos e 24 subespécies (EUZÉBY, 2012) são reconhecidas e divididas em duas categorias: coagulase positiva e coagulase negativa. Essa divisão é baseada na capacidade de coagulação do plasma, que é a propriedade considerada importante como marcador de patogenicidade (BEHME et al., 1996). Os estafilococos coagulase-positiva têm sido utilizados como microrganismos indicadores, apesar de a produção de enterotoxinas por algumas espécies não produtoras de coagulase ser relatada (VERNOZY-ROSAND et al., 1996). A coagulase é uma enzima produzida por algumas espécies de estafilococos, principalmente, *S. aureus*, que exerce efeito clínico da coagulação do plasma humano e de outros animais, por ativação da protrombina, resultando na conversão do fibrinogênio em fibrina. Esse teste tem sido largamente utilizado para diferenciação de *S. aureus* e outras espécies produtoras ou não de coagulase (MADANI et al., 1998).

Dentre os diversos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser encontrados em alimentos, destaca-se a espécie *S. aureus*, cuja importância epidemiológica nas DTA's decorre em virtude de sua alta prevalência e do risco da produção de toxinas pré-formadas (ZECCONI; HANG, 2000), produzidas e liberadas pela bactéria, durante sua multiplicação no alimento, representando risco para saúde pública (ALCARÃS et al., 1997). Surtos e casos esporádicos de toxinose por *S. aureus*, atribuídos ao consumo de produtos lácteos, contendo enterotoxinas pré-formadas, têm sido relatados em diversos países (OSTYN et al., 2010). Em se tratando do cenário

epidemiológico mundial, *S. aureus* é considerada a terceira causa mais relevante de DTA's (TIRADO; SCHIMIDT, 2001).

Uma vez instalados no interior da glândula mamária, esses microrganismos têm a propriedade de se fixar às células epiteliais e estabelecer uma infecção por meio de múltiplos mecanismos patogênicos, como produção de toxinas (BRITO et al., 2002).

Pereira et al. (2007) analisaram a ocorrência de mastite subclínica em 31 rebanhos no sul do estado de Minas Gerais e verificaram que, entre as 2.368 vacas submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT), os principais patógenos isolados foram *Staphylococcus* coagulase positiva (35,57%).

Almeida et al. (2005), em propriedades também na região sul do estado de Minas Gerais, analisaram amostras de leite provenientes de 96 rebanhos, sendo a maior frequência microbiológica de isolamento *S. aureus* (64,55%).

Sá et al. (2000) verificaram que os microrganismos mais comuns nos casos de mastite bovina no agreste do estado de Pernambuco foram *Staphylococcus* sp. (33%), sendo que, entre os estafilococos isolados, a espécie *S. aureus* apresentou a maior prevalência (66%). Também no mesmo estado, Freitas et al. (2005) analisaram que os agentes mais prevalentes nos casos de mastite bovina foram *S. aureus* (14%).

5 BIOFILMES BACTERIANOS NA INDÚSTRIA DE LEITE

As adesões dos *S. aureus* ao epitélio da glândula mamária são consideradas o primeiro ponto crítico na patogenia da mastite, sendo que a maioria das estirpes dos *S. aureus* causadoras da doença são circundadas por uma camada espessa (*slime* - polissacarídeo extracelular), que auxilia na aderência e colonização dos microrganismos no epitélio da glândula mamária (AGUILAR et al., 2001). A habilidade dos *S. aureus* aderirem à superfície do epitélio está associada à produção de biofilmes, compostos de multicamadas de células embebidas em uma matriz (MELO et al., 2012).

O crescimento de qualquer biofilme é limitado pela disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante e pela sua propagação às células localizadas no interior do biofilme. Fatores como o pH, difusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade controlam também a maturação do biofilme. Um biofilme maduro pode levar de algumas horas até várias semanas para desenvolver-se, dependendo das condições de seu meio ambiente. Sendo assim, existem na literatura várias teorias propostas para formação de biofilmes (MACEDO, 2000).

Biofilme pode ser definido como comunidade séssil de microrganismos embebidos

numa matriz polimérica extracelular (HARRISON et al., 2005), que eles mesmos produzem, caracterizada por células aderidas irreversivelmente a uma superfície ou interface e que exibem alteração fenotípica em relação ao crescimento planctônico (COSTERTON et al., 1999).

Sauer et al. (2007) identificam biofilmes como agrupamentos de células microbianas associadas a superfícies, os quais se encontram envoltos por substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances*) hidratadas.

Outra interessante teoria é proposta por Shi e Zhu (2009), que abordaram a formação de biofilmes microbianos, enfatizando sua ocorrência em indústrias alimentícias, em que a formação de biofilmes microbianos em ambiente de processamento de alimentos é um processo complexo. Inicialmente, moléculas orgânicas provenientes do alimento são depositadas sobre a superfície de equipamentos formando o filme condicionante. Em seguida, microrganismos ativos biologicamente aderem à superfície condicionada atraídos pelas moléculas orgânicas. Algumas células microbianas persistem mesmo após a limpeza e sanitização e iniciam o crescimento do biofilme. Por último, forma-se o biofilme maduro com a ajuda da expressão de genes específicos e *quorum sensing*.

Na indústria de alimentos, a formação de biofilme conduz a sérios problemas de higiene e perdas econômicas, devido à contaminação de alimentos e danos em equipamentos, podendo desenvolver nas mais variadas superfícies (HOOD; ZOTTOLA, 1997).

De acordo com Bremer et al. (2006) e Flint et al. (1997), quando os produtos lácteos são contaminados microbiologicamente, evidências sugerem que os biofilmes formados nas superfícies dos equipamentos de processamento são os principais responsáveis. Nas indústrias de laticínios, os biofilmes, além de conterem bactérias e EPS, contêm, também, significativa quantidade de resíduos de leite, particularmente proteínas e minerais, como o fosfato de cálcio (KUMAR et al., 1998).

A contaminação do leite pode se iniciar na fazenda, durante e/ou após a ordenha. Diversos fatores são responsáveis pela perda da qualidade microbiológica nessa etapa, com destaque a ineficiência da higienização de utensílios e equipamentos, como os equipamentos de ordenha mecânica, latões e tanques de expansão (OLIVEIRA, 2011). Segundo Oliver et al. (2005), microrganismos podem se aderir com contaminantes do ambiente de propriedades leiteiras, como matéria fecal ou úbere de animais infectados e, também, pela água utilizada nas ordenhadeiras mecânicas. Diversos autores mencionam que esses microrganismos podem formar biofilmes, difíceis de erradicar e que podem agir

como abrigo e/ou substrato para microrganismos menos propensos à formação, aumentando a probabilidade de sobrevivência dos mesmos e a posterior disseminação durante o processamento de alimentos (LAPIDOT et al., 2006). Falhas no armazenamento e transporte do leite para as indústrias, como tempo e temperatura inadequadas, podem favorecer a multiplicação dos microrganismos presentes (OLIVEIRA, 2011).

Após a pasteurização, pode ocorrer contaminação do leite e produtos lácteos em função dos equipamentos de envase (DOGAN; BOOR, 2003). Biofilmes podem se desenvolver na lateral das juntas dos equipamentos, sendo também fonte de contaminação dos alimentos após a pasteurização (AUSTIN; BERGERON, 1995). A contaminação do leite pasteurizado, também, pode ocorrer pela adesão de bactérias nas placas dos pasteurizadores de leite (FLINT et al., 1997). Superfícies do ambiente (pisos e paredes) podem ser fontes indiretas de contaminação. Exemplos desse fato são a transferência de microrganismos aos alimentos por vetores, como o ar, pessoas e sistemas de limpeza (GIBSON et al., 1999).

Do ponto de vista da segurança alimentar e da degradação de alimentos, os biofilmes são importantes devido à sua formação em alimentos, utensílios e superfícies e à dificuldade encontrada em sua remoção. Se formados em materiais da linha de produção da indústria de alimentos, podem acarretar risco à saúde do consumidor e prejuízo financeiro à indústria (FLACH et al., 2005).

Por outro lado, os biofilmes nas indústrias, em alguns casos, podem ser benéficos, como na produção e degradação de matéria orgânica, degradação de poluentes ou na reciclagem de nitrogênio, enxofre e vários metais. A maioria desses processos requer o esforço coletivo de organismos com diferentes capacidades metabólicas. Assim, os biofilmes são utilizados em tratamentos aeróbios e anaeróbios de efluentes domésticos e industriais, metabolizando esgotos e águas contaminadas; no processo de tratamento de água potável, a remoção de nitrogênio, carbono biodegradável e precursores de trihalometanos pode ser obtida por biofilmes microbianos submersos; em reatores para a produção de fermentados (MACEDO, 2000).

Para se evitar a formação de biofilmes na indústria de alimentos, é essencial o estabelecimento e a adequação das medidas de higiene e sanitização (ARAÚJO, 2006).

6 CONCLUSÃO

Os microrganismos formam o biofilme como estratégia para otimizar a sobrevivência, uma vez que são consideravelmente mais resistentes às substâncias

antimicrobianas e à remoção por agentes comumente utilizados para limpeza e sanificação. Desse modo, constituem alvo de preocupação para indústria de produtos de origem animal por serem constituídos por patógenos ou deteriorantes, podendo ocasionar enfermidades aos consumidores e prejuízos econômicos devido à depreciação do produto final por alterações físico-químicas e sensoriais.

Portanto, conclui-se e se enfatiza que a importância dessa revisão foi fornecer informações a respeito de um controle na mastite do gado leiteiro, contribuindo para prevenção da formação de biofilmes nas indústrias alimentícias bem como para a saúde do consumidor.

BIOFILM FORMATION IN FOOD INDUSTRY BY STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS

ABSTRACT

The milk makes up the daily meals of countless families, so there is a constant concern for quality and the elimination of contaminants factors in obtaining these products. Among the diseases affecting dairy cattle, is mastitis, which constitutes intramammary infection caused primarily by the presence of pathogenic microorganisms. Several studies show *Staphylococcus aureus* as the most common organism isolated from milk samples from this disease in many rural properties around the world. Analysis of genetic diversity of *S. aureus* and the study of different strains have been seen as essential steps for the effective control of the disease. The ability of *S. aureus* to adhere to the surface of the epithelium is associated with the production of biofilms, which is composed of multilayers of cells embedded in a matrix. The purpose of this article is to reflect briefly on the importance of the study and microbiological control of mastitis in order to mitigate its spread and increase the effectiveness of this control, aiming at health and human and animal welfare.

Keywords: Dairy products. Microbiological control. Virulence factors.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, B.; ITURRALDE, M. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, Geneva, v. 82, p. 165-175. 2001.

ALBUQUERQUE, L.C. **O leite em suas mãos**. Juiz de Fora: Concorde, 1997.

ALCARÃS, L. E. et al. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latino Americana**, Buenos Aires, v. 31, n. 219, p. 44-47, nov. 1997.

ALMEIDA, A.C.; MENDES, C.P.A.; SILVA, D.B. Fatores determinantes da ocorrência de mastite bovina, detectada em rebanhos através da análise de leite em latões. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 134, p. 81-87, ago. 2005.

AUSTIN, J.W.; BERGERON, G. Development of bacterial biofilmes in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**, New York, v. 62, n. 3, p. 509-519, aug. 1995.

BARRETO, N.S.E. et al. Microbiological quality and antimicrobial susceptibility of informally traded milk in Cruz das Almas county, Bahia. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2315-2326, nov./dez. 2012.

BEHME, R.J. et al. Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 12, p. 3075-3084, dec. 1996.

BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 100, n. 2, p. 91-100, mar. 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento - MAPA. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado. **Instrução Normativa nº 62**, de 29 de dezembro de 2011. Publicada no DOU de 30/12/2011, Brasília, DF. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/index.htm>>. Acesso em 13 fev. 2014.

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A.J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 254-262, feb. 2006.

BRITO, M.A.V.P. et al. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase positivos isolados de mastite bovina. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 79-82, jan. 2002.

CARVALHO, G. **Desempenho estadual das exportações brasileiras de lácteos: 2000 e 2007**. Panorama do Leite – Seapa. Edição nº 16 do informativo eletrônico, Embrapa Gado de Leite. 2008.

CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, n. 68, v. 1/2, p. 145–53. 2007.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, n. 284, p. 1318-1322. 1999.

DIAS, R.V.C. Principal methods for diagnostics and control of dairy mastitis. **Acta Veterinaria Brasilica**, n. 1, p. 23-27. 2007.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 130-138, jan. 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Estatísticas do leite: produção total de leite, sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil**. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0231.php>. Acesso em 20 jan. 2014.

EUZÉBY, J.P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Staphylococcus***, 2012. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em 09 mar. 2014.

FAO. Statistics Data Base. Agriculture Data. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>> Acesso em 05 mar. 2014.

FETHERSTON, C. Mastitis in lactating women: physiology or pathology? **Breastfeeding Review Journal**. n. 9, v. 1, p. 5–12. 2001.

FLACH, J.; KARNOPP, C; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em



contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**. n. 33, v. 3, p. 291-296. 2005.

FLINT, S.H.; BREMER, P.J.; BROOKS, J.D. Biofilms in dairy manufacturing plant: description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 81-97. 1997.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, Pernambuco, v. 72, n. 2, p. 171-177, fev. 2005.

GARRITY, G.M.; **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v.3: The Low G+C Gram positives. Springer-Verlang, New York. ISBN 0-387-95041-9. 2006.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilmes. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 87, p. 41-48, jul. 1999.

HACEM, N.I. **Mastite bovina: descrição dos tipos mais frequentes e métodos de prevenção e tratamento visando à melhoria da qualidade do leite e saúde dos rebanhos**. 2005. Dissertação (Pós Graduação Lato Sensu em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite, Ovos e Pescado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2005.

HARRISON, J.J.; TURNER, R.J. CERI, H. 2005. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, Canada, n. 7, p. 981-994.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9, p. 1034-1037, 1997.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da produção pecuária 2012**. Disponível em: <www.ibge.gov.br/estatistica/indicadores/agropecuaria>. Acesso em jan 2014.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilmes in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1/2, p. 9-27, jun. 1998.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 3, p. 229-233, jun. 2006.

LIMA, V.M.B. et al. Gisleite: inovando a gestão de sistemas de produção de leite com uso de software livre. In: Yamaguchi, L.C.T. et al. (Org). **Aspectos sócio-econômicos da produção de leite**. 1. Ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. 2007.

MACEDO, J.A.B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação para a indústria de farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, v. 2, n. 7, p. 19-24. nov/dez. 2000.

MADANI, N.B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 2/3, p. 139-145, jan. 1998.

MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Jaboticabal, v. 60, n. 1, p. 278-282, fev. 2008.

MEDEIROS E.S. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from cases of mastitis in Buffalo in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 23, n. 4, p. 793-796. 2013.

MELO, P.D.C. et al. Phenotypic and molecular analysis of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated of bovine. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1. 2012.



MENEZES, J.S. **Ação antimicrobiana *in vitro* de *Psidium guajava* L. contra *Staphylococcus aureus* isolados de leite mastítico.** 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, MG. 2013.

NERO, L.A. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v.55, n.6, p.299-305, aug. 2008.

NETO, C. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

OLIVEIRA, M.M. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica.** 138 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2011.

OSTYN, A. et al. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. **Euro Surveillance**, Stockholm, v. 15, n. 13, p. 1-4, apr. 2010.

PEREIRA, U.P. et al. Mastite subclínica em bovinos leiteiros do sul de Minas Gerais. In: Encontro de pesquisadores em mastites. Botucatu, **Anais...** Botucatu, p.92. 2007.

PORTOCARRERO, S.M.; NEWMAN, M.; MIKEL, B. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. **Meat Science**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 267-273, oct. 2002.

QUINN, P.J. et al. **Veterinary microbiology and microbial disease**, 2. ed., John Wiley & Sons, 2011.

RICHARDS, N.S.P.S. Segurança alimentar: como prevenir contaminações na indústria. **Food Ingredients**, São Paulo, v.18, n.1, p.16-30, maio/jun. 2002.

SÁ, M.E.P. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Pernambuco, v. 7, n. 2, p. 100-103, fev. 2000.

SAUER, K.; RICKARD, A.H.; DAVIES, D.G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, Washington, v. 2, n. 7, p. 347-353. 2007.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 20, n. 9, p. 407-413, sept. 2009.

SILVA, E. R. et al. Associação entre o California Mastitis Test e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.38, p. 46-8, 2001.

TIRADO, C.; SCHIMDT, K. Who surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. **Journal of Infection**, London, v. 43, n. 1, p. 80-84, sept. 2001.

VERNOZY-ROSAND, J. et al. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated goat's milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 271-280, jul. 1996.

ZECCONI, A.; HANG, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin – FIL-IDF**, v. 345, n. 5, p. 15-18, dec. 2000.