

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

EDUARDA RUFATTO

**PODER MICROBICIDA DE ANTISSÉPTICOS UTILIZADOS NO
MANEJO DE ORDENHA FRENTE À *ESCHERICHIA COLI* E
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2018

EDUARDA RUFATTO

**PODER MICROBICIDA DE ANTISSÉPTICOS UTILIZADOS NO
MANEJO DE ORDENHA FRENTE À *ESCHERICHIA COLI* E
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Zootecnista.

Orientadora: Prof. Dra. Marcela Tostes Frata

DOIS VIZINHOS

2018



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Curso de Zootecnia



TERMO DE APROVAÇÃO
TCC

**PODER MICROBICIDA DE ANTISSÉPTICOS UTILIZADOS NO
MANEJO DE ORDENHA FRENTE À *ESCHERICHIA COLI* E
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Autor: Eduarda Rufatto

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marcela Tostes Frata

TITULAÇÃO: Zootecnista

APROVADA em 19 de novembro de 2018.

Prof^a. Dr^a. Andréia Anschau

Prof. Dr. Fernando Reimann
Skonieski

Prof^a. Dr^a. Marcela Tostes Frata

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Edson e à minha mãe Marilei por todo apoio, incentivo, carinho e amor. Que nos momentos de fraqueza estiveram ao meu lado, me dando força para seguir em frente, em busca da realização de um sonho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus que me deu força e coragem pra buscar meu sonho.

Aos meus pais Edson Rufatto e Marieli Brunetto, por me darem a educação necessária, força e apoio para que buscasse através do estudo meu sucesso profissional e pessoal. A vocês minha eterna gratidão.

Ao meu irmão André Felipe Rufatto, pelos momentos de carinho e descontração. Obrigada por tornar meus dias mais felizes e leves.

Ao meu namorado Matheus Luiz Padilha pelo apoio e compreensão diária. Agradeço pela companhia e pelo auxílio em todas as atividades, pela amizade, carinho e parceria que existe entre nós.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Marcela Tostes Frata por todo o tempo que foi dispensado no período de orientação. Pela paciência, incentivo, compreensão e as diversas correções em todos os momentos, que foram necessários para meu crescimento profissional e pessoal.

Às minhas amigas que dividiram diversos momentos em todo meu período acadêmico e fora dele. Agradeço pelo carinho, companheirismo, motivação e apoio diário.

RESUMO

Rufatto, Eduarda. Poder microbicida de antissépticos utilizados no manejo de ordenha frente à *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. 2018. 33 f. Trabalho de conclusão de curso – Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois vizinhos, 2018.

Uma das doenças que mais acomete o rebanho bovino leiteiro é a mastite, levando à diminuição na produção de leite e causando prejuízos econômicos ao produtor. Para controlar essa enfermidade, é de suma importância a execução de medidas higiênico-sanitárias dentre elas, o uso de produtos de pré e pós-ordenha. Este trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito *in vitro* de produtos antissépticos comerciais utilizados antes e após ordenha para imersão dos tetos de vacas leiteiras, analisando sua atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo um produto pré-ordenha e dois produtos pós-ordenha. Os procedimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, mediante as técnicas Microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) e Macrodiluição em caldo a fim de verificar se os produtos previnem e eliminam agentes contaminantes causadores de mastite em diferentes tempos de exposição. No teste de microdiluição a *E. coli* apresentou resistência, enquanto a *S. aureus* mostrou-se sensível a todos os produtos testados, permitindo verificar que apresentaram CIM e CBM mesmo diluídos. Nos testes de macrodiluição, o microrganismo *E. coli* também mostrou-se resistente a todos os tempos de exposição avaliados, o *S. aureus* foi sensível a todos os produtos, demonstrando que os produtos são eficazes para inibir esse microrganismo. Os antissépticos atuam com intuito de prevenir a ação dos microrganismos que causam mastite, dessa forma, à avaliação da eficácia desses produtos é de suma importância.

Palavras-chave: mastite, microrganismos, qualidade do leite.

ABSTRACT

Rufatto, Eduarda. Microbicidal action of antiseptics used in the management of milking against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. 2018. 33 p. Undergraduate thesis - Bachelor's degree in Animal science, Federal Technological University of Paraná. Dois Vizinhas, 2018.

One of the diseases that most affects the dairy herd is mastitis and it can lead to a decrease in milk production causing economic losses to the producer. In order to control this disease, it is important the implementation of hygienic-sanitary measures such as the use of pre and post-milking products. Therefore, this work aimed to evaluate the in vitro effect of commercial antiseptic products used before and after milking of dairy cows by immersion of the teats. For the experiment it will be used one pre-milking product and two post-milking products. The antimicrobial activity against the microorganisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were analyzed. The experiments was carried out using the micro-and macrodilution broth techniques in the Microbiology laboratory of the Federal Technological University of Paraná, Campus Dois Vizinhas. The technique of microdilution broth seeks to determine the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration while the macrodilution technique has the purpose of verifying if the products prevent and eliminate contaminants that causes mastitis in different times of exhibition. In the microdilution test, *E. coli* presented resistance, whereas *S. aureus* showed to be sensitive to all the products tested, allowing to verify that they presented MIC and even CBM diluted. In macrodilution tests, the *E. coli* microorganism also proved to be resistant to all evaluated exposure times, *S. aureus* was sensitive to all products, demonstrating that the products are effective in inhibiting this microorganism. The antiseptics act in order to prevent the action of the microorganisms that cause mastitis, so, to evaluate the efficacy of these products is of paramount importance.

Keywords: mastitis, microorganisms, milk quality.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1.2 Objetivo geral	10
1.1.3 Objetivos específicos	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 LEITE	11
2.2 QUALIDADE DO LEITE	12
2.3 MASTITE	13
2.4 ANTISSÉPTICOS	15
2.5 MICRORGANISMOS.....	15
2.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.5.2 <i>Escherichia coli</i>	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 MICRODILUIÇÃO EM CALDO	17
3.2 MACRODILUIÇÃO EM CALDO.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 MICRODILUIÇÃO	20
4.2 MACRODILUIÇÃO.....	22
5 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Até o 2º trimestre de 2018 a produção de leite no Brasil foi de 5,46 milhões de litros, ocupando a 5ª posição no *ranking* mundial. O leite de boa qualidade é aquele produto com características pré-definidas e apropriadas, que não traz malefícios à saúde humana, sem resíduos químicos e com baixa quantidade de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) (SIMÕES & OLIVEIRA, 2012; IBGE, 2018).

A mastite é uma doença inflamatória que acomete bovinos leiteiros e causam prejuízos econômicos impactantes ao produtor. Essa doença é geralmente causada por microrganismos patogênicos dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e alguns Coliformes (SIMÕES & OLIVEIRA, 2012).

Para reduzir as perdas econômicas e obter leite com qualidade, é de suma importância que a coleta do produto na ordenha seja de forma higiênica, utilizando as boas práticas e seguindo todos os procedimentos para garantir bom produto e vida longa aos animais (DURR, 2012).

Dentre os procedimentos indispensáveis no uso diário do produtor, os antissépticos e desinfetantes são imprescindíveis para evitar e eliminar os microrganismos causadores de mastite bovina. *Pré-dipping* é o termo que se refere à limpeza e desinfecção dos tetos antes da ordenha, enquanto que o *pós-dipping* consiste no mesmo procedimento após a ordenha, porém, ainda possibilita a retirada da camada do leite residual que ficou nos tetos após ordenha e previne a entrada de microrganismos no canal, pois tem a função de selar o esfíncter do teto (ZSCHÖCK et al., 2011).

Desta forma, o presente projeto busca avaliar o efeito antimicrobiano de produtos pré e pós-*dipping* utilizados para imersão dos tetos antes e após ordenhas, respectivamente. Esses antissépticos são utilizados com o intuito de prevenir a ação dos microrganismos que causam mastite em vacas leiteiras, por isso, a avaliação desses produtos é de suma importância, pois muitos produtores o utilizam como única fonte preventiva.

1.1 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivo geral

Avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* de produtos antissépticos comerciais utilizados antes e após ordenha, sobre microrganismos patogênicos causadores de mastite bovina.

1.1.3 Objetivos específicos

- Analisar a atividade antimicrobiana de três produtos antissépticos utilizados na imersão de tetos, sendo um pré-ordenha e dois pós-ordenha frente as espécies *Echerichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), por meio das técnicas de Microdiluição e Macrodiluição em caldo.
- Definir a concentração inibitória mínima (CIM);
- Apontar a concentração bactericida mínima (CBM);
- Verificar se os três produtos previnem e/ou eliminam agentes contaminantes causadores de mastite.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE

Segundo a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, leite bovino é o produto procedente de ordenha completa e interrupta, em boas condições de higiene, de vacas sadias, devidamente alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011).

A produção de leite no Brasil aumentou em cerca de 1,0% em relação ao ano de 2016. Em 2015, de 35 milhões de toneladas produzidas, apenas 24 milhões foram compradas pelos laticínios e submetidas à inspeção sanitária, demonstrando que 31% da produção total de leite não é fiscalizada (CONAB, 2017). O Estado do Paraná é responsável por 671 mil litros do que é produzido em todo território nacional, correspondendo a 13% da produção brasileira (IBGE, 2018).

É importante relatar que na economia nacional, o leite possui papel fundamental no dia a dia da população brasileira. Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) o consumo *per capita* no ano de 2016 foi de 175,9 litros (CONAB, 2017).

O maior constituinte do leite é a água, seguida do alto teor de carboidratos e gordura, proteínas, cálcio, vitaminas e minerais, por isso é classificado como um dos mais ricos alimentos encontrados na natureza (Tabela 1). Os componentes sólidos do leite, exceto a água, podem ser classificados como Extrato Seco Total (EST) ou Sólidos Totais (ST). Os sólidos não Gordurosos (SNG) ou Extrato Seco Desengordurado (ESD) são a denominação dada à porção referente a todos os sólidos, exceto água e gordura (TRONCO, 2013).

Tabela 1 – Componentes do leite

Componentes	%
Água	87
Carboidratos	4 a 5
Proteínas	3
Lipídeos	3 a 4
Minerais	0,8
Vitaminas	0,1

Fonte: Adaptado de Tronco, 2013

Segundo Bowden (1981) o teor de sólidos presentes no leite varia de acordo com três fatores: ambientais, fisiológicos e genéticos. Os fatores ambientais estão ligados principalmente ao clima, temperatura e umidade relativa, influenciando diretamente no bem estar do animal. Já os fatores fisiológicos consistem no tempo de lactação, idade dos animais, número de lactações, estado sanitário, especialmente da glândula mamária, etc. Fatores genéticos correlacionam principalmente à raça do rebanho, pois algumas possuem pré-disposição para teores de sólidos enquanto em outras raças não é possível observar.

A fase de lactação do animal causa impacto direto na produção de sólidos, pois quanto maior o tempo de lactação de uma vaca, maior será o teor de gordura e proteína presentes no leite (OLIVEIRA, 2010). Outro fator determinante na composição nutricional do leite deve-se à alimentação dos animais, principalmente aos teores de fibra, energia, proteína e gordura (SIMILLI & LIMA, 2007).

A alimentação pode ser considerada o fator de maior influência quando relacionado ao teor de gordura e proteína do leite. Por isso, deve-se priorizar a disponibilidade de forragens com boa qualidade, balancear a quantidade de proteínas degradáveis e não degradáveis no rúmen, carboidratos fibrosos e não fibrosos, a quantidade de concentrado e período de oferta e por fim, a mudança gradativa na alimentação quando necessária (BERNARDES, 2014).

2.2 QUALIDADE DO LEITE

Desde a década de 90, cooperativas de laticínios iniciaram os incentivos de bonificação aos produtores que apresentassem qualidade no leite. Para que

obtivessem resultados utilizavam as técnicas de contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, crioscopia, gordura, redutase e em alguns casos a contagem de células somáticas (MULLER, 2002).

A contagem de células somáticas (CCS) expressa a saúde da glândula mamária. São células provenientes da descamação do alvéolo mamário e células de defesa do organismo como os leucócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos que são mobilizados para combater algum tipo de alteração, conforme aumenta a infecção aumenta o número de células de defesa (PHILPOT & NICKERSON, 1991).

O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da Instrução Normativa nº 31, de 29 de junho de 2018 decretou que, até junho de 2019 o máximo permitido de contagem de células somáticas será de 500.000 CS/mL para as regiões sul, sudeste e centro-oeste (BRASIL, 2018).

Outro critério de avaliação da qualidade do leite é a contagem bacteriana total (CBT) que diz respeito à higiene ambiental, com a higiene da ordenha, instrumentos, armazenamento, conservação, transporte e saúde do animal (ASSIS, 2005).

A mesma Instrução Normativa que é utilizada para contagem de células somáticas, também é utilizada para determinar o limite máximo de contagem bacteriana total. O limite estabelecido até junho de 2019 será de no máximo 300.000 UFC/mL para as mesmas regiões supracitadas (BRASIL, 2018).

2.3 MASTITE

A mastite é considerada um dos principais malefícios que acomete bovinos leiteiros. Segundo Bressan (2000) mastite é caracterizada por uma doença de cunho inflamatório que acomete a glândula mamária.

Considerando todas as doenças patológicas que podem acometer o rebanho bovino leiteiro a mastite ou mamite chama atenção, pois resulta em gastos com medicamentos e, conseqüentemente o descarte do leite, redução no consumo de alimento, resultando em queda produção leite e em casos mais severos, o descarte do animal, causando perda econômica significativa (SMITH, 2006).

Assim como a qualidade e a produção de leite podem ser influenciadas por diversos fatores, a mastite também detém alguns elementos que levam à sua

ocorrência. Estão relacionados ao patógeno causador, ao ambiente em que o animal está inserido e ao próprio animal (BRITO & BRITO, 2000).

A mastite pode ser dividida em dois tipos: clínica e subclínica. A mastite clínica é caracterizada por apresentar grumos, aumento da glândula mamária, enrijecimento da mesma, edema, presença de sangue no leite e até mesmo necrose da glândula (SANTOS & FONSECA, 2000). Essa forma de mastite é mais agressiva e facilmente detectada pelo produtor, através da avaliação do úbere e detecção da presença de pus, grumo ou sangue no leite.

A mastite subclínica na maioria dos casos é a mais perigosa, pois não manifesta sinais visíveis. O produtor não identifica o motivo da queda na produção e procede ordenhando o animal infectado, podendo transmitir patógenos aos animais saudáveis via ordenha. Essa forma pode ser identificada através do teste de CMT (*California Mastitis Test*), podendo ser realizado pelo produtor para analisar a intensidade da infecção ou também pode ser realizado a CCS (MARQUES, 2006).

Além disso, a mastite pode ser classificada em contagiosa ou ambiental. A mastite contagiosa geralmente é causada por microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* e está diretamente relacionada com o aumento na Contagem de Células Somáticas e queda na produção. A disseminação é feita entre os quartos mamários da vaca e entre vacas por meio da ordenha, equipamentos e utensílios compartilhados entre animais, etc. O úbere destes animais infectados é uma fonte de microrganismos patogênicos e, por consequência, pode apresentar infecções persistentes e na forma de mastite subclínica (SANTOS & TOMAZI, 2012).

A mastite ambiental normalmente leva a casos temporários, porém, em sua maioria, casos clínicos com maior relevância. Os agentes causadores de maior enfoque são os Coliformes e algumas espécies de *Streptococcus*. A maior fonte de contaminação é o próprio ambiente em que o animal está inserido (SANTOS & TOMAZI, 2012).

Em virtude das perdas produtivas e financeiras, é preferível que o produtor opte pela profilaxia, executando medidas higiênico-sanitárias que previnam o rebanho de ser acometido pela mastite. De modo a conter e reduzir os casos de mastite, o uso de antissépticos antes e após a ordenha é imprescindível (PANKEY et al., 1984).

2.4 ANTISSEPTICOS

Uso de antissépticos antes e após ordenha é uma das práticas mais simples e imprescindíveis para a redução nos casos de mastite bovina.

O pré-dipping ou pré-imersão é a desinfecção dos tetos antes de iniciar a ordenha, após a retirada dos três primeiros jatos de leite de cada teto para eliminar os microrganismos presentes no canal do leite (ZSCHÖCK et al., 2011).

O pós-dipping é aplicado logo após a retirada do conjunto de ordenha dos tetos e tem como função formar uma barreira protetiva, auxiliando no selamento do esfíncter e impedindo que microrganismos patogênicos penetrem dentro do úbere do animal (MARGATHO et al., 2014).

Locatelli & Junior (2016) realizaram um trabalho utilizando pré e pós-imersão durante o manejo de ordenha e concluíram que a utilização dessas práticas reduziu praticamente todos os casos de mastite, eliminando os gastos com medicamentos e descarte de animais.

Medeiros et al. (2009), observaram o perfil de sensibilidade da bactéria *S. aureus* frente as soluções de desinfetantes a base de iodo é obtiveram de 90 a 100%, porém na solução composta por cloro apresentou de 2 a 6% de sensibilidade. Houve maior eficácia antisséptica na utilização de pré-dipping e pós-dipping com princípio ativo de iodo e clorexidine frente ao *Staphylococcus aureus*. O hipoclorito de sódio utilizado na formulação de antissépticos também mostrou-se eficaz frente as bactérias *S. aureus* e *E.coli* (ANDRADE et al., 2009).

Outro estudo mostra que houve redução significativa da incidência de novos casos de mastite em um rebanho experimental, quando usado solução desinfetante para imersão dos tetos com princípio ativo de acido láctico (JUNIOR, 2005).

Desta forma, é clara a importância do uso de antissépticos para prevenção de doenças que acometem os tetos de vacas bovinas, principalmente a mastite, além de evitar o descarte do animal, evita gastos com tratamentos.

2.5 MICRORGANISMOS

2.5.1 *Staphylococcus aureus*

Trata-se de um microrganismo Gram positivo, possui forma de coco e está diretamente relacionado a infecções. É considerada uma bactéria contagiosa (BRASIL, 2007; BEER, 1988).

Esta pode acometer o canal do úbere bem como a pele que reveste a glândula mamária bovina. São liberados produtos para fora da célula no período de crescimento estafilocócico, aumentando a capacidade da bactéria em aderir-se na superfície das células epiteliais (SMITH, 2006).

A bactéria produz toxinas extracelulares que induzem o organismo animal a produzir anticorpos para combater a infecção, aumentando o número de células somáticas no leite. Quando a infecção não é tratada o úbere do animal pode ser necrosado, devido à degradação do tecido mamário (RADOSTITIS, 2000).

2.5.2 *Escherichia coli*

Pertencente ao grupo dos coliformes, a *E. coli* possui formato de bacilo Gram negativo. É considerado um indicativo de presença de contaminação fecal, pois é eliminada nas fezes e disseminada a partir da excreção, podendo sobreviver em um ambiente hostil por até meses (ANDRADE, 2005).

Esse microrganismo está presente no ambiente e naturalmente em baixas populações no animal. Quando um dos animais do plantel é contaminado, a chance de contaminação de todos os outros é grande, principalmente via conjunto de ordenha, equipamentos compartilhados entre animais, locais onde os mesmos urinam ou defecam com frequência (CASSOL, 2010).

Os microrganismos ambientais provocam altos níveis de prejuízos econômicos, pois na maioria dos casos, a mastite causada por *Escherichia coli* se apresenta da forma clínica, demonstrando sinais evidentes, apenas em alguns casos apresenta tratamento e controle, gerando descarte do leite e até descarte do animal em situações mais severas (PRESTES & LANDIN-ALVARENGA, 2006; PERES & ZAPPA, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa buscou determinar o poder microbicida de três produtos antissépticos comerciais, sendo um utilizado como pré-dipping possuindo princípio ativo de ácido láctico e outros dois como pós-dipping. O pós-dipping numerado como 1 é a base de ácido láctico e ácido salicílico, já o numero 2 é somente a base de ácido láctico. Todos os produtos foram testados frente às bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Foram executadas análises de Microdiluição e Macrodiluição em caldo, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos.

3.1 MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Para obter a concentração inibitória mínima (CIM), tomou-se como base a metodologia descrita na norma M07-A10, do *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically* (CLSI, 2018). A concentração bactericida mínima (CBM) obteve-se conforme metodologia descrita por Koneman (2001).

No teste de microdiluição em caldo, foi adicionado 100 µL de meio de cultura Müller Hinton utilizado para cultivo das bactérias em micropoços de uma microplaca estéril de 96 poços. Adicionou-se 100 µL dos produtos somente nos primeiros poços de cada linha que foram testados em cada poço e esses adicionados em triplicata. As diluições foram seriadas, e cada poço foi diluído o produto em 50%, de forma a transferir o volume de um poço para o poço seguinte e eliminando o volume do último poço. Por fim, adicionou-se 10 µL microrganismo nesses poços. Utilizou-se uma e/ou duas microplacas por microrganismo, para facilitar na leitura dos resultados.

Duas linhas da microplaca foram utilizadas como os controles positivos, para controles de meio de cultivo, do crescimento do inóculo das substâncias teste. Às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram testadas diluições de Ampicilina e de Gentamicina. A microplaca foi incubada em estufa a 35°C/24horas. Após o período de incubação, adicionou-se em cada poço da microplaca 5 µL de solução de cloreto de trifeniltetrazólio 1% e incubou-se por mais de duas horas antes

da realização da leitura de CIM. O produto revelador confere a coloração vermelha para os micropoços que possui células vivas.

Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), após a incubação das microplacas, retirou-se uma alíquota de 10 µL de cada poço: dos dois poços antes e após a concentração inibitória mínima (CIM), inclusive o poço de CIM, e as mesmas foram replicadas em placas de Petri com meio ágar Müeller Hinton com o auxílio da alça de Drigalski. Incubaram-se as placas em temperatura de 35°C/24horas. Para obtenção do resultado, as colônias foram contadas e considerou-se a concentração em que houver inibição maior ou igual a 90% de crescimento bacteriano.

3.2 MACRODILUIÇÃO EM CALDO

Para a execução da técnica de eficiência de desinfetante, tomou-se como base a Portaria nº101, de 11 de agosto de 1993 (BRASIL, 1993).

A técnica de Macrodiluição consiste na adição de uma fonte de matéria orgânica juntamente com o produto desinfetante e as bactérias em tubos estéreis, afim de, cronometrar o tempo de exposição da cultura referida ao desinfetante.

Os produtos foram testados sem diluí-los, visto que sua utilização nos tetos do animal é de forma pura. Adicionou-se 9 mL do produto desinfetante em um tudo de ensaio estéril, juntamente com 1 mL de leite integral como fonte de matéria orgânica e por fim adicionou-se 0,1 mL da cultura teste (*Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*) nos tubos.

A padronização dos microrganismos foi feita no espectrofotômetro, com absorbância variando de 0,1 a 0,08 e o comprimento de onda utilizado foi de 600 nanômetros, equivalente à escala 1 de Mac Farland (MEDEIROS, 2009).

Cronometrou-se o tempo de exposição do momento exato em que foi adicionada a cultura teste ao desinfetante. Os tempos foram 15, 30 e 60 minutos de exposição. Em cada tempo foi replicado (volume de 100 µL) em tubos contendo 5 mL de caldo BHI (Caldo infusão cérebro e coração). A diluição do meio BHI foi adicionada nos tubos para confirmação da presença ou ausência do microrganismo testado frente aos diferentes antissépticos e tempo de exposição. Após a incubação a suspensão foi repicada em meio sólido Muller Hinton.

Realizou-se o controle negativo que apresentou a seguinte composição: 1 mL de leite e 9 mL de goma Xantana 200 mesh (Synth) para simular a viscosidade dos produtos pós-dipping e para o produto pré-dipping foram utilizados 9 mL de água destilada estéril, visto que este produto não apresenta consistência. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

A incubação foi em temperatura de 37°C por 96 horas. A leitura dos tubos e das placas foi realizada após 48 horas de incubação e após 96 horas. Os critérios utilizados para avaliação de crescimento microbiano foram: turbidez, formação de película na superfície e precipitação. Nas placas a leitura dos resultados foi por meio da contagem de colônias. A ausência do crescimento bacteriano nas placas indica a eficácia do produto em questão.

A análise estatística empregada foi do tipo descritiva (SAMPAIO, 1998).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MICRODILUIÇÃO

Através desta técnica, buscou-se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), por meio da literatura descrita por CLSI (2018) e Koneman (2001), respectivamente.

Neste teste verificou-se que não houve CIM e CBM para o microrganismo *Escherichia coli* frente aos três produtos testados, visto que a bactéria apresentou-se resistente aos produtos testados e nas diluições empregadas.

Um estudo que utilizou a técnica de microdiluição testou a eficiência da oleuropeína em ação conjunta com antissépticos comerciais, para inativação de microrganismos, entre eles, a *E. coli*, que apresentou menor resistência para produtos a base de cloreto de benzalcônio 1%, peróxido de hidrogênio 3%, ácido peracético 2% e digluconato de clorexidina 2% (DOMINCIANO, 2015).

Um trabalho realizado por Pedrini & Margatho (2003) mostrou boa eficiência, de produtos com principio ativo de hipoclorito de sódio a 2% inibindo o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp.* e *Corynebacterium sp.*, porém essa concentração apresentou irritabilidade na pele dos animais.

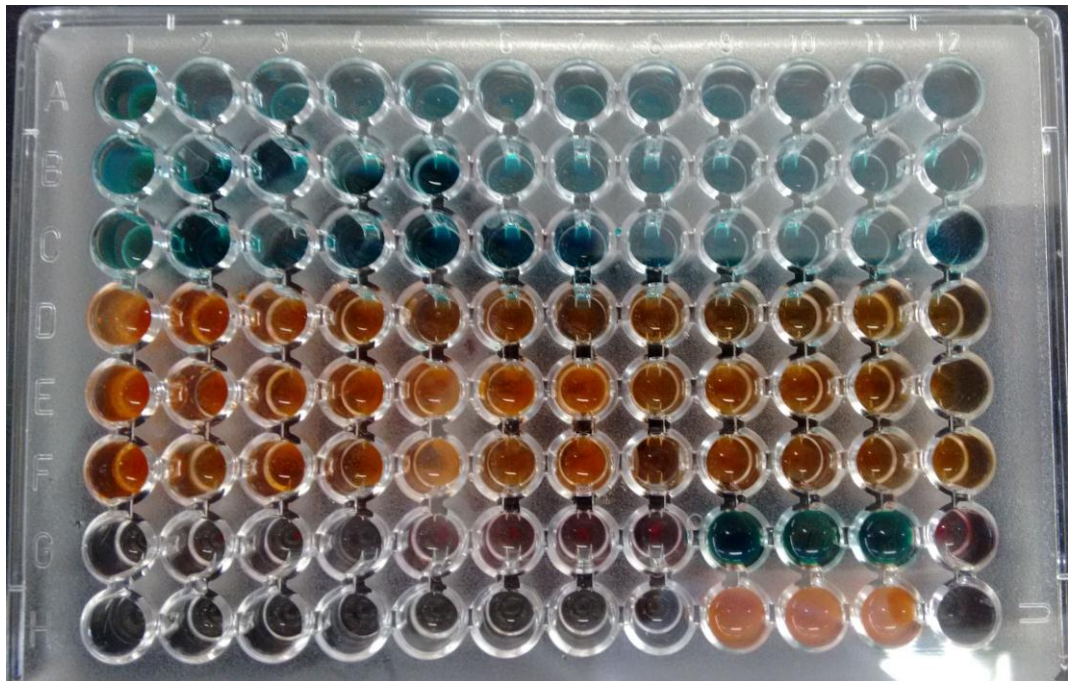
O mesmo trabalho revelou que a clorexidine apresentou eficácia contra os microrganismos que são responsáveis pela mastite bovina contagiosa e ambiental. Quanto maior a concentração, maior foi o efeito nos microrganismos, porém a concentração de 2% e 1%, demonstraram resultados semelhantes a concentração de 0,5% (PEDRINI & MARGATHO, 2003).

A solução de clorexidine é bastante utilizada para controle de infecções de pele em bovinos, possui atividade em material orgânico e quando comparado a soluções de iodo, é menos agressivo a pele do animal quando utilizada a diluição prescrita (PHILLIPS et al., 1991).

A solução de cloreto de benzalcônio a 1% a apresenta-se eficiente para controle de microrganismos do gênero *Streptococcus* e *Corynebacterium sp.* Porém, o mesmo composto na mesma concentração foi ineficaz para o controle de bactérias Gram negativas (PEDRINI & MARGATHO, 2003).

Na figura 1 observa-se a microplaca contendo os produtos e suas respectivas diluições. Devido a coloração verde e laranja de dois produtos, não é possível observar a coloração vermelha conferida aos poços que tiveram crescimento microbiano. Na linha G a partir da coluna 5, já é possível identificar a coloração vermelha, pois houve crescimento.

Figura 1 – Microplaca contendo os produtos após a incubação.



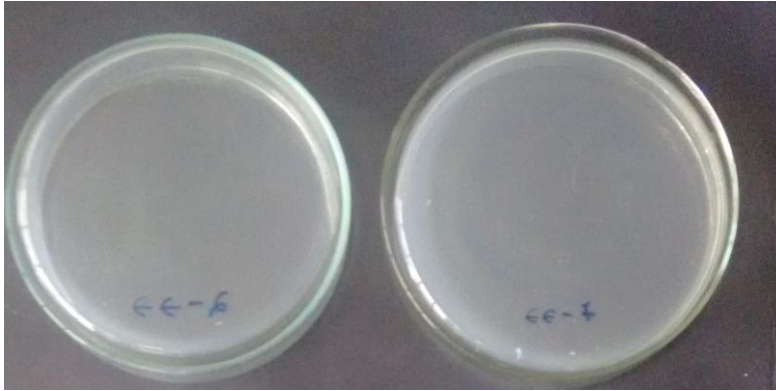
Fonte: A autora

Já para a bactéria *Staphylococcus aureus* a concentração inibitória mínima do produto pós-dipping 1, com composição básica de ácido láctico e ácido salicílico, foi de 0,39% a 0,19% e a concentração bactericida mínima foi de 0,04% de ácido láctico.

Para o produto pós-ordenha 2, à base de ácido láctico, a inibição do microrganismo foi com CIM de 1,56% a 0,78% e com concentração bactericida mínima de 0,39%. Já o produto pré-ordenha testado, tendo como princípio ativo o ácido láctico, obteve como concentração inibitória mínima frente a bactéria *S. aureus* 0,39% do produto e a CBM foi o mesmo encontrado para CIM 0,39%.

Com base nos resultados o produto pós-dipping 1 foi o mais eficiente para inibir o crescimento desse microrganismo, pois mesmo diluído a uma concentração de até 0,04% apresentou eficácia.

Figura 2 – Placas de Petri com *S. aureus*



Fonte: A autora.

Na figura 2 é possível verificar que não houve crescimento da *S. aureus* nas placas de Petri, demonstrando a eficiência dos produtos.

Não foram encontrados na literatura informações a respeito da eficácia de produtos antissépticos à base da combinação de ácido láctico e ácido salicílico sobre os microrganismos testados utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo.

Em relação ao microrganismo *Staphylococcus aureus* e seu perfil de sensibilidade, um trabalho mostra eficácia de 97,8% de produtos cujo princípio ativo é com iodo e de 17,8% à base de ácido láctico, com 30 segundos de ação nos tetos do animal (MEDEIROS et al., 2009).

Avaliando o perfil de sensibilidade de leveduras os resultados foram de 16,7% com cloro, 66,7% com amônia quaternária e 58,3% com ácido láctico, também expondo por um período de 30 segundos de ação nos tetos (COUTINHO, 2012).

Soluções de clorexidine a 0,5% e iodo a 0,5% estão descritos como princípios ativos de ótima eficácia para serem utilizados no manejo pré e pós-ordenha comercializados no Brasil (LOPES, 2013).

4.2 MACRODILUIÇÃO

Os produtos foram testados de acordo com a Portaria nº101, de 11 de agosto de 1993 (BRASIL, 1993), com algumas modificações de acordo com a necessidade do trabalho, a fim de verificar o perfil de sensibilidade das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* frente aos produtos com princípio ativo de ácido láctico e ácido salicílico nos tempos de 15, 30 e 60 minutos.

Para avaliação qualitativa dos tubos de ensaio foi verificada presença ou ausência de turbidez, formação de película na superfície e precipitação (Figura 3 e

Tabela 2). Na figura 3 observa-se alteração no produto pós-dipping 2, sendo que o tudo de 15, 30 e 60 minutos apresentam alterações visíveis.

Figura 3 – Presença de turbidez, película na superfície e precipitação nos tubos



Fonte: A autora

Pôde-se observar os resultados de crescimento bacteriano encontrados nos tubos de ensaio para o microrganismo *E. coli* (Tabela 2).

Tabela 2 - Diferentes tempos de exposição dos produtos frente à bactéria *E. coli* e a alteração em tubos de ensaio dos respectivos tempos.

Tempo de contato (min)	Pós-dipping 1 - Ácido lático e ácido salicílico	Pós-dipping 2 - Ácido lático	Pré-dipping - Ácido lático
15	Presença de turbidez	Presença de turbidez	Presença de precipitação
30	Ausência de turbidez e precipitação	Presença de precipitação	Ausência de turbidez e precipitação
60	Ausência de turbidez e precipitação	Presença de precipitação	Ausência de turbidez e precipitação

O produto pós-dipping 1 apresentou crescimento apenas no tempo de exposição por 15 minutos. O pós-dipping 2 apresentou crescimento nos tempos 15, 30 e 60 minutos. O antisséptico pré-ordenha apresentou alteração visual no tempo de exposição de 15 minutos.

Ao testar antissépticos com princípio ativo de cloreto alquil em diferentes concentrações frente ao microrganismo *E.coli* observou-se ausência de turvação nos tubos de ensaio em todas as concentrações e tempos de exposição (BRAGA, 2010).

De todos os tubos, semeou-se uma alíquota, podendo-se observar o perfil de sensibilidade da bactéria *Escherichia coli* frente aos produtos nos tempos de 15, 30 e 60 minutos (Tabela 3).

Tabela 3 – Diferentes tempos de exposição dos produtos frente à bactéria *E.coli* e a contagem de colônias em Placas de Petri dos respectivos tempos

PRODUTOS E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)	Tempo de leitura	
	48 HORAS	96 HORAS
Pós-dipping 1 - Ácido láctico e ácido salicílico	Média das contagens (UFC/mL)	Média das contagens (UFC/mL)
15	67	39
30	48	56
60	54	74
Pós-dipping 2 - Ácido láctico	Média das contagens (UFC/mL)	Média das contagens (UFC/mL)
15	164	131
30	143	183
60	140	180
Pré-dipping - Ácido láctico	Média das contagens (UFC/mL)	Média das contagens (UFC/mL)
15	32	27
30	46	34
60	28	39

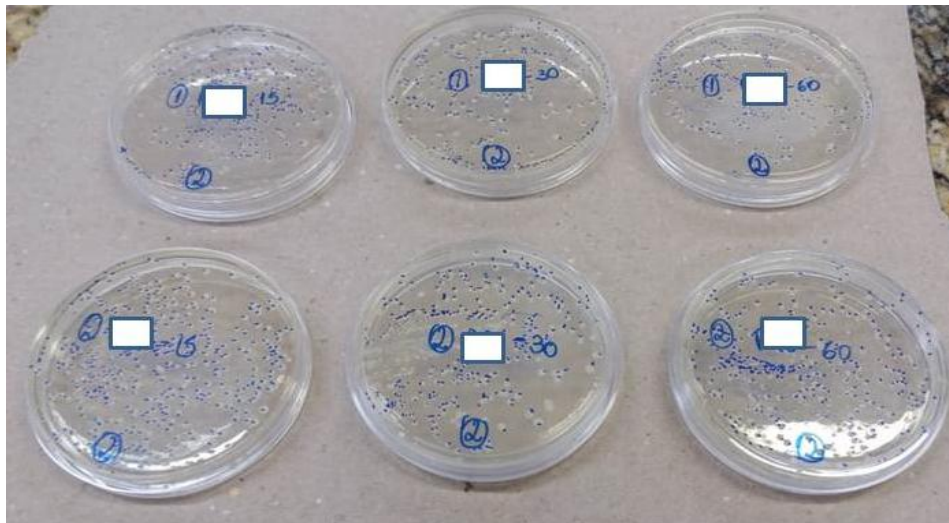
A sensibilidade para a bactéria *E.coli* frente aos produtos testados não foi observada, pois houve crescimento das colônias em todos os tempos de exposição e nos dois tempos de leitura após incubação (Figura 4). Apesar de não se verificar visualmente a turvação em alguns tubos, houve crescimento microbiano,

provavelmente devido à coloração dos produtos que dificultou a visualização da turvação.

Para esse microrganismo as duas técnicas utilizadas que se mostraram imparciais para verificação de resistência ou sensibilidade do mesmo frente ao produto, pois houve crescimento e alteração nos dois testes.

Provavelmente, os princípios ativos utilizados ou suas concentrações foram ineficientes para penetrar na membrana externa desta bactéria Gram negativa. Esse microrganismo possui alta capacidade de adaptação, é extremamente mutável geneticamente e fenotipicamente, dificultando seu controle e eliminação (ALMEIDA & ANDRADE, 2013). A resistência desse microrganismo pode ser explicada pela sua capacidade de produzir lipossacarídeos termo-resistentes que lhe conferem proteção da membrana externa com o meio extracelular (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Figura 4 – Crescimento das colônias de *E.coli* em Placas de Petri



Fonte: A autora

Também foram encontrados resultados da visualização dos tubos de ensaio para a bactéria *Staphylococcus aureus* (Tabela 4).

Tabela 4 - Diferentes tempos de exposição dos produtos frente à bactéria *S. aureus* e a alteração em tubos de ensaio dos respectivos tempos

Tempo de contato (min)	Pós-dipping 1 - Ácido láctico e ácido salicílico	Pós-dipping 2 - Ácido láctico	Pré-dipping - Ácido láctico
15	Ausência de turbidez e precipitação	Ausência de turbidez e precipitação	Ausência de turbidez e precipitação
30	Ausência de turbidez e precipitação	Ausência de turbidez e precipitação	Ausência de turbidez e precipitação
60	Ausência de turbidez e precipitação	Ausência de turbidez e precipitação	Ausência de turbidez e precipitação

Verificou-se que não houve alteração visual em nenhum dos tempos em que o microrganismo foi exposto aos três produtos, indicando sensibilidade do *S. aureus* aos mesmos.

Tabela 5 – Tempos de exposição dos produtos frente a bactéria *S. aureus* e a contagem de colônias em Placas de Petri dos respectivos tempos

PRODUTOS E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (minutos)	Tempo de leitura	
	48 HORAS	96 HORAS
Pós-dipping 1 - Ácido láctico e ácido salicílico	Média das contagens (UFC/mL)	Média das contagens (UFC/mL)
15	<1	<1
30	<1	<1
60	<1	<1
Pós-dipping 2 - Ácido láctico	Média das contagens (UFC/mL)	Média das contagens (UFC/mL)
15	<1	<1
30	<1	<1
60	<1	<1
Pré-dipping - Ácido láctico	Média das contagens (UFC/mL)	Média das contagens (UFC/mL)
15	<1	<1
30	<1	<1
60	<1	<1

Para a bactéria *S. aureus* pôde-se confirmar através da semeadura dos tubos de ensaio, que houve perfil de sensibilidade perante os produtos pós-dipping 1, pós-dipping 2 e pré-dipping (ácido láctico), tanto na leitura realizada após 48 horas quanto na leitura após 96 horas de inoculação (Tabela 5).

Os resultados encontrados nas duas técnicas mostraram-se semelhantes, comprovando a eficácia dos produtos para este microrganismo.

Medeiros et al. (2009) observaram em seu estudo que o microrganismo *S. aureus* mostrou-se sensível quando testados antissépticos com princípio ativo de ácido láctico e que os resultados são melhores quando aumenta-se o tempo de exposição do microrganismo ao produto.

Em estudo onde foi verificada a exposição do microrganismo ao produto desinfetante, foi observado maior efeito sensitivo da *S. aureus* quando utilizados produtos à base de clorexidine e cloro (RAMALHO et al., 2012). O composto clorexidine foi testado e recomendado o uso para tratamento nos tetos de lesões na superfície do tecido, possuindo efeito contínuo permitindo aderência no úbere do animal por períodos prolongados (SPINOSA, et al., 2002).

Nos testes realizados de macrodiluição em caldo, a *S. aureus* mostrou sensibilidade para o produto pré-dipping, já o microrganismo *E. coli* apresentou resistência para todos dos produtos testados e em todos os tempos de exposição. Pode-se constatar que a combinação dos componentes utilizados na formulação dos produtos, não é eficaz para o controle de *E. coli* que causa mastite bovina ambiental. Por outro lado, *S. aureus* apresentou sensibilidade aos produtos em todos os tempos de exposição.

O microrganismo *E. coli* é um dos maiores agentes causadores de mastite bovina do tipo ambiental. A falta de eficiência dos produtos antissépticos para esse microrganismo é preocupante, pois se o ambiente em que os animais se encontram não estiver em boas condições de higiene, como por exemplo, presença de lama, esterco, e outros contaminantes, o produto não irá proteger os animais de serem acometidos por essa enfermidade. Por isso, reforça-se a importância do manejo higiênico-sanitário nos animais e principalmente no ambiente em que os mesmos habitam.

Os produtos foram eficazes para controlar e eliminar *S. aureus*, ou seja, na prática, esses produtos protegem os animais e eliminam a incidência de mastite contagiosa, sendo essa um grande problema de controle e econômico.

5 CONCLUSÃO

A bactéria *Escherichia coli* mostrou-se resistente a todos os produtos antissépticos utilizados na imersão de tetos (pré e pós-dipping), não sendo possível definir concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM).

O microrganismo *Staphylococcus aureus* apresentou sensibilidade frente aos produtos testados, apresentando CIM e CBM mesmo diluídos, concluindo-se que as combinações dos componentes utilizados nas formulações mata um dos principais agentes causadores de mastite bovina.

Muitos produtos antissépticos possuem capacidade de destruir os agentes causadores de mastite, o que influencia é o princípio ativo utilizado, a concentração do mesmo, forma de uso pelo produtor, armazenamento entre outros fatores que podem interferir no seu efeito.

Portanto, reforça-se a importância da utilização destes meios de profilaxia para evitar agentes causadores de mastite bovina.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. de S; ANDRADE, M. A. **Características biológicas e antigênicas de escherichia coli com ênfase aos genes de virulência.** Goiânia, 2013.
- ANDRADE, Cláudia. L. **Histopatologia e Identificação da *Escherichia coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte.** 2005. 65f. (Pós Graduação em medicina Veterinária/HVPTPOA), Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2005.
- ANDRADE, Débora C.C.; ARAGÃO, Cicera C.V.; FURLAN, Cássia M. **Avaliação da estabilidade físico-química da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% utilizada pela FarmaUSCS, e de sua eficácia bactericida sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.** Revista Brasileira de Ciência da Saúde, São Caetano do Sul, v.7, n.21, p.16-25, julho/setembro 2009
- ARCANJO, Angelo. H. M., et al. **Programa dos seis pontos de controle em rebanhos leiteiros.** Global Science And Technology, Rio Verde, v. 10, n. 01, p.78-88, abril, 2017
- ASSIS, Airdem. G., et al. **Sistemas de produção de leite no Brasil.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 6p. (Circular Técnica, 85).
- BEER, Joaquim. **Doenças Infeciosas em Animais Domésticos.** Volume 2 .São Paulo: Editora Roca, 1988. P.457.
- BERNARDES, Bárbara. S.(Coord.). **Sólidos no leite: As vantagens de produzir leite com teores elevados de proteína e gordura.** 4. Arco W Comunicação & Design, 2014.
- BRAGA, Sílvia M. S.; FURTADO, Vera C. de S.; FURLAN, Cássia M. **Avaliação in vitro da eficácia bactericida de desinfetantes de uso geral frente a amostras de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.** Revista Científica FEPI, v. 2, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resistência microbiana- mecanismos e impacto clínico.** 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 7, de 03 de maio de 2016.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, p. 11, Seção 1, 04 de maio de 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 101, de 11 de agosto de 1993.**
- BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). **Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011.**
- BRASIL. Ministério do meio Ambiente. Resolução nº 065/2005. **Regulamento da inspeção sanitária e industrial para leite e seus derivados,** 2005.

BRESSAN, Matheus. ed . **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite/Área de Comunicação Empresarial, 2000. 65p.

BRITO, José. R.F; BRITO, Maria A.V.P. **Mastite bovina**. São Paulo: Manole, 2000, p. 114 - 129.

BOWDEN, D.M. **Feed utilization for calf production in the first lactation by 2 years-old F1 crossbred beef cows**. Journal of Animal Science, v.51, p. 304-315, 1981.

CASSOLI, Laerte D.; MACHADO, Paulo. **Mapa da qualidade do leite: Contagem Bacteriana Total**. Clínica do Leite. Piracicaba: ESALQ/USP, 2016.

CASSOL, Daniela. M.S et al. **Introdução Agentes da Mastite Diagnóstico e Tratamento**. **A Hora Veterinária** – Ano 29, nº175, maio/junho/2010. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/260424497/A-Hora-Veterinaria-Mastite-Bovina>>. Acesso em: 13 de Fevereiro de 2018.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically-M07**, 11th Edition Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2018.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Leite e derivados**. Abril 2017. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_15_14_13_38_leite_abril_2017.pdf. Acesso em 03 de fevereiro de 2018.

CORRÊIA, Fernando. A. F. **Características do Patótipos de *E. coli* e implicações de *E. coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos**. Disponível em: <https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/Ferando_Augusto_1c.pdf?1349206212>. Acesso em: 15 de Maio de 2018.

COSER, S. M.; LOPES, Marcos A.; Costa, Geraldo M. 2012. **Mastite bovina: Controle e Prevenção**. Boletim Técnico - Lavras/MG, 93, 1-30. Disponível em: <<http://livraria.editora.ufla.br/upload/boletim/tecnico/boletim-tecnico-93.pdf>> Acesso em: 05 de abril de 2018.

COUTINHO, LUCIANA C.A. et al. **Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados na antiseptia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite**. Pesq. Vet. Bras. v.32, n.1, p.61-65, janeiro 2012.

DOMICIANO, L. C. C. **Avaliação de oleuropeína e de sanitizantes químicos, isolados ou associados, para eliminação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em superfícies inertes**. FZEA - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos. Pirassununga, 2015.

DÜRR, João. W. **Como produzir leite de qualidade** – 4ª. Ed. Brasília. SENAR, 2012.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. **Enfermidades bacterianas**. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doenças das aves. Campinas: Facta, 2009. cap.4, p. 457-474.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa trimestral do leite**: 2º semestre de 2018., 2018

JÚNIOR, Lucif Abrão Nascif. **Avaliação da eficácia do ácido láctico frente ao iodo na anti-sepsia dos tetos após a ordenha na prevenção da mastite bovina**. 2005.

KONEMAN, Elmer. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro, 2001. 1456p.

LOCATELLI, Fernanda. P.L; JUNIOR, Geraldo. N. **Importância do pré-dipping e pós-dipping no controle da mastite bovina**. Jornada Científica e Tecnológica da FATEC, Botucatu, out. 2016. Disponível em: <<http://www.fatecbt.edu.br/ocs/index.php/VJTC/VJTC/paper/viewFile/634/893>>. Acesso em 12 de maio de 2018.

LOPES, L. O; LACERDA, M. S; RONDA, J. B; **Eficiência em desinfetantes em manejo de ordenha em vacas leiteiras na prevenção de mastite**. Rev. Científica de medicina veterinária, nº 21, 2013

MAIA, Guilherme. B. S. et al. **Produção leiteira no Brasil**. BNDES Setorial, v. 2, n. 37, p. 371-398, 2013.

MARGATHO, Luiz Florêncio Franco; PEDRINI, Sílvia Cristina Barboza; CURCI, Vera Cláudia Magalhães. **MASTITE BOVINA E O USO DE ANTISSÉPTICOS**. Apta Regional, 2014.

MARQUES, Dorcimar C. **Criação de Bovinos**. 7. ed. rev., atual e ampl., Belo Horizonte: CVP Consultoria Veterinária e publicações, 2006.

MEDEIROS, Elizabeth Sampaio de et al . **Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de Staphylococcus spp. isoladas de mastite bovina**. Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro , v. 29, n. 1, p. 71-75, Jan. 2009 .

MULLER, Ernst. E. **Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite**. In: II Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá, Maringá: UEM, 2002. p. 206-217. Disponível em: <<http://www.nupel.uem.br/qualidadeleitem.pdf>>. Acesso em: 20 de Março de 2018.

OLIVEIRA, Emanuel. N. A.,et al. **Composição físico-química de leites em diferentes fases de lactação**. Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais., Curitiba, v. 8, n. 4, p. 409-415, 2010.

PANKEY, J.W.W.R.J. et al. **Update on postmilking teat antiseptics**. J. Dairy Sci. 67:1336. 1984.

PHILLIPS, M.F.; VASSEUR, P.B.; GREGORY, C.R. **Clorhexidine Diacetate versus povidone-iodine for preoperative preparation of the skin: a prospective randomized comparison in dogs and cats.** J. Am. Anim. Hosp. Assoc., v.27, p.105-108, 1991.

PHILPOT, Nelson W.; NICKERSON, Stephen C. **Mastitis: Counter Attack. A strategy to combat mastitis.** Illinois: Babson Brothers Co., 1991. 150p.

PIRES NETO, Otaviano S. et al. **Aspectos práticos na produção de leite para atingir os parâmetros da instrução normativa Nº 62 (MAPA).** Caderno de Ciências Agrárias, v.4, n.10, p.151-162, 2012.

PERES NETO, Floriano.; ZAPPA, Vanessa. **Mastite em vacas leiteiras – Revisão de Literatura,** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça – SP, ano IX, n.16, 2011.

PRESTES, Nereu. C.; LANDIM-ALVARENGA, Fernanda. C. **Obstetrícia Veterinária,** Rio de Janeiro, 2006.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: Um tratado de Doenças dos Bovinos, Suínos, Caprinos e Equinos.** 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 541-629.

RAMALHO A.C. et al. 2012. **Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pre e pós-dipping frente a Staphylococcus spp. isolados em rebanhos leiteiros.** Pesq. Vet. Bras.

SANTOS, Marcos. V.; TOMAZI, Tiago. **Mastite contagiosa ou ambiental: Um diagnóstico em nível de rebanho.** Revista Leite Integral, Belo Horizonte, MG: Lastro, 06, n.44, p.30-34, 2012.

SAMPAIO I.B.M. 1998. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal.** UFMG, Belo Horizonte. 221p.

SANTOS, Marcos V.; FONSECA, Luís F.L.. **Qualidade do leite e controle de mastite.** São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

SIMILI, Flávia F.; LIMA, Maria. L. P. **Como os alimentos podem afetar a composição do leite das vacas.** *Pesquisa & Tecnologia Apta Regional*, v. 4, n. 1, p.123-127. (2007).

SIMÕES, Tânia. V.M.D.; OLIVEIRA, Amaury. .A. 2012. **Mastite bovina: considerações e impactos econômicos.** 1. ed. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Disponível em< http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf>. Acesso em 8 de abril de 2018.

SMITH, BRADFORD P. **Medicina interna de grandes animais.** 3. ed. Barueri: Manole, 2006.

SPINOSA H.S., GORNIAC S.L. & BERNADINI M.M. 2002. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 489p.

TOZZETTI, Danilo S., et al. **Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de literatura**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano 6, n.10, 7p, 2008. . Disponível em: <http://www.faeef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/YFbjMNRGCotOL73_2013-5-28-15-25-40.pdf>. Acesso em: 19 de Março de 2018.

TRONCO, Vania. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 5 ed. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

ZSCHÖCK, Michael., et al. **Resistencia a penicilina G y oxacilina, de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis bovina subclínica**. Veterinária México, Coyoacán, v. 42, n. 3, p. 207-217, 2011.