



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

**INFLUÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS SOBRE CONTAGEM
BACTERIANA E CÉLULAS SOMÁTICAS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU BOVINO**

EDUARDO DE ASSIS LIMA

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

INFLUÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS SOBRE CONTAGEM
BACTERIANA E CÉLULAS SOMÁTICAS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU BOVINO

EDUARDO DE ASSIS LIMA

Sob a Orientação da Professora

Rita de Cássia Campbell Machado Botteon

Co-orientação do Professor

Francisco de Assis Baroni

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração, Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ

Abril de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A732i

ASSIS, EDUARDO, 26031982-
INFLUÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS
SOBRE CONTAGEM BACTERIANA E CÉLULAS SOMÁTICAS EM
AMOSTRAS DE LEITE CRU BOVINO / EDUARDO ASSIS. - 2017.
48 f.

Orientadora: RITA BOTTEON.

Coorientador: FRANCISCO BARONE.

Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
MEDICINA VETERINÁRIA/ MEDICINA VETERINÁRIA, 2017.

1. LEITE. 2. CCS. 3. CBT. 4. FUNGOS . 5.
LEVEDURAS. I. BOTTEON, RITA , 08031964-, orient. II.
BARONE, FRANCISCO, -, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. PROGRAMA DE PÓS
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA/ MEDICINA
VETERINÁRIA. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

EDUARDO DE ASSIS LIMA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____.

Rita de Cássia Campbell Machado Botteon, *Dr. Sc.* – UFRRJ

Shana de Mattos de Oliveira Coelho, *Dr. Sc.* – UFRRJ

Elmiro Rosendo do Nascimento, *Dr. Sc.* – UFF

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, e pelas possibilidades de recomeçar todas as vezes que necessário.

Aos meus pais pelo amor, compreensão, apoio em todos os momentos que eu precisei.

À minha família, minha esposa Ana Carla Pinheiro Lima e aos meus filhos Eduardo de Assis Lima Filho e Pedro Pinheiro Lima de Assis, pela paciência, incentivo, companheirismo e apoio nos momentos mais críticos. Agradeço a compreensão nos momentos de ausência. Amo vocês.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade concedida e por ampliar a minha formação acadêmica.

À Prof^a. Rita de Cássia Campbell Machado Botteon, minha orientadora, pelos inúmeros ensinamentos, dedicação, compreensão, paciência e credibilidade imputadas à mim, em diversos momentos da minha caminhada. Tudo que eu escrever aqui, é pouco diante da gratidão que sinto por você. Muito Obrigado!

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni, pela parceria, atenção e empenho em me passar seus ensinamentos, auxiliando incessantemente na execução e análise das minhas amostras. Com certeza sem sua ajuda esse trabalho não teria adquirido êxito.

RESUMO

LIMA, Eduardo de Assis. **Influencia de fungos filamentosos e leveduras sobre contagem bacteriana e células somáticas em amostras de leite cru bovino**. 2017. 53p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

No Brasil, de um modo geral, o leite é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes, e em consequência, apresenta elevado número de microrganismos contaminantes. Por sua riqueza em nutrientes o leite favorece o desenvolvimento de uma diversidade de microrganismos. O crescimento microbiano no leite causa um grande prejuízo econômico para as indústrias de beneficiamento. Os fungos desempenham um importante papel na indústria de produtos lácteos, pois podem promover deterioração ou desencadear fermentação e/ou maturação indesejáveis aos derivados do leite. Por outro lado, pouco se conhece sobre a importância, sob o ponto de vista de qualidade e saúde pública, da presença destes microrganismos em leite cru. Sendo improvável em rebanhos com alta incidência de mastite e higiene precária, a obtenção de leite com alta qualidade microbiológica, investigou-se a relação entre CBT e o isolamento de fungos filamentosos e leveduras em amostras de leite do tanque de expansão de 120 propriedades com diferentes condições de higiene. O leite de 160 propriedades foi monitorado por seis meses quanto à CCS e CBT por métodos oficiais (BRASIL, 2011). Na média, o leite dessas propriedades apresentava baixa qualidade em relação a ambos os parâmetros. Contudo, em algumas propriedades o leite com alta CCS e higiene insatisfatória apresentava baixa CBT, portanto classificado como de ótima qualidade microbiológica. Em seguida, foram analisadas amostras de 120 propriedades quanto à CBT e isolamento de fungos. Em 102 amostras (85%) foram isolados fungos filamentosos (*Acremonium* sp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* spp., *Penicillium* sp.) e/ou leveduras *Candida* sp., *Geotrichum* sp., *Pichia* sp., *Prothotoca* sp., *Rodothorula* sp., *Trichosporon* sp.) com média de 1.284 UFC de fungos/mL e CBT de 133.000 UFC/mL. Em 14 amostras negativas para fungos obteve-se uma média de 652.000 UFC/mL para a CBT. A diferença da CBT entre amostras positivas e negativas para fungos foi significativa ($p < 0,001$), demonstrando a influência dos fungos sobre o crescimento bacteriano e a CBT do leite. A presença de fungos e o potencial risco de produção de toxinas no leite cru e seus derivados deve ser investigada, bem como deve ser melhor esclarecida a relação entre o isolamento de fungos e a baixa CBT do leite.

Palavras chave: Leite, qualidade do leite, microbiota, micologia.

ABSTRACT

LIMA, Eduardo de Assis. **Influence of filamental and leaved fungus on bacterial count and somatic cells in samples of crude bovine**2017. 53p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Medicine, Clinical Sciences). Institute of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

In Brazil, milk is generally obtained under hygienic-sanitary conditions and, as a consequence, it has a high number of contaminating microorganisms. Because of its nutrient richness, milk favors the development of a diversity of microorganisms. Microbial growth in milk causes great economic damage to the beneficiation industries. Fungi play an important role in the dairy industry as they may promote deterioration or trigger undesirable fermentation and / or ripening of milk derivatives. On the other hand, little is known about the importance, from the point of view of quality and public health, of the presence of these microorganisms in raw milk. It is unlikely that high quality beef cattle with high incidence of mastitis and poor hygiene would have been able to obtain milk with high microbiological quality. The relationship between CBT and the isolation of filamentous fungi and yeasts in milk samples from the expansion tank of 120 different conditions. The milk of 160 properties was monitored for six months for CCS and CBT by official methods (BRASIL, 2011). On average, the milk of these properties had low quality in relation to both parameters. However, in some properties milk with high CCS and unsatisfactory hygiene presented low CBT, therefore classified as of excellent microbiological quality. Then, samples of 120 properties were analyzed for CBT and fungal isolation. In 102 samples (85%) were filamentous fungi (*Acremonium sp.*, *Alternaria spp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Mucor spp.*, *Penicillium sp.*) and / or yeasts *Candida sp.*, *Geotrichum sp* , *Pichia sp.*, *Prothoteca sp.*, *Rodothorula sp.*, *Trichosporon sp.*) With a mean of 1,284 CFU fungi / mL and CBT of 133,000 CFU / mL in 14 samples negative for fungi, an average of 652,000 CFU / mL was obtained for CBT. The CBT difference between positive and negative fungi samples was significant ($p < 0.001$), demonstrating the influence of fungi on bacterial growth and CBT of milk. The presence of fungi and the potential risk of toxin production in raw milk and its derivatives should be investigated and the relationship between fungal isolation and low milk CBT should be better clarified.

Key words: Milk, milk quality, microbiota, mycology.

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

μg	Micrograma
AFB1	Aflatoxina B1
AFM1	Aflatoxina M1
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem Células Somáticas
DCPLRJ	Diagnóstico da Cadeia Produtiva do Leite no Rio de Janeiro (2010)
DMIV	Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV)
ESALQ – USP	Escola superior de Agricultura Luiz de Queiros – Universidade de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de geografia e Estatísticas
IN	Instrução Normativa
kg	Quilograma
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
ppb	Parte por bilhão
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite
DC	Resolução da Diretoria Coletiva
RJ	Rio de Janeiro
SP	São Paulo
UFC	Unidades formadoras de colônias
ufc/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UFCf	Unidades formadoras de colônias de fungos
UFCf/mL	Unidades formadoras de colônias de fungos por mililitro
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Divisão Político-Administrativa do Estado do Rio de Janeiro. Fonte: http://www.cultura.rj.gov.br/	11
Figura 2: Leite de propriedade no sul do estado do Rio de Janeiro, armazenado em latões de 50 mL de plástico e zinco, em caixa de alvenaria com água resfriada. Rio de Janeiro. 2016..	12
Figura 3: Tanque de resfriamento de leite de aço inoxidável, capacidade 10.000 litros. Propriedade no sul do estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2016.....	13
Figura 4: Frascos com bronopol (A) para determinação da composição e contagem de células somáticas (CCS), com adição de azidiol (B) para determinação da contagem bacteriana total (CBT) e sem conservantes (C) para cultura e isolamento de agentes fúngicos.....	13
Figura 5: Procedimentos para isolamento e identificação de agentes fúngicos em amostras de leite cru. Diluição em solução salina estéril (A), plaqueamento em ágar Sabouraud dextrose a 4%, incubação, contagem de unidades formadoras de colônias (C), plaqueamento e identificação das colônias isoladas (D).	15
Figura 6: Condições de higiene ambiental e da ordenha em algumas propriedades com alta contagem de células somáticas (CCS) e baixa contagem bacteriana total (CBT). Rio de Janeiro, 2016.....	18
Figura 7: Evolução do número de amostras de leite de 160 propriedades em conformidade com os critérios de qualidade (CCS e CBT) estabelecidos pela IN62/2011. Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de qualidade do laticínio Grupiara, de acordo com a legislação (IN 61/2011).....	19
Tabela 2: Média e desvio padrão da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) de janeiro a junho de 2016 em 160 propriedades fornecedoras de leite ao Laticínio Grupiara, Valença – RJ.	19
Tabela 3: Prazos e limites para redução de CBT e CCS no leite de acordo com a IN 62/2011 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste.	19
Tabela 4: Número e porcentagem de propriedades com amostras de leite em conformidade as normas legais. Valença, RJ. Janeiro a junho de 2016.....	20
Tabela 5: Número e porcentagem de amostras de leite com contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) em conformidade com os limites de referência (BRASIL, 2011). Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.	20
Tabela 6: Contagem bacteriana total (CBT) de amostras de leite segundo a contagem de células somáticas (CCS). Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.	22
Tabela 7: Parâmetros de qualidade estabelecidos pelo laticínio para bonificação por qualidade. Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.	22
Tabela 8: Contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) de amostras de leite de 160 propriedades classificadas segundo critérios de qualidade estabelecidos pelo laticínio. Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.....	23
Tabela 9: Média e desvio padrão da contagem bacteriana total (CBT - UFC/mL) e unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentos e leveduras em amostras de leite positivas e negativas para agentes fúngicos.	24
Tabela 10: Média e desvio padrão da contagem bacteriana total (CBT - UFC/mL) e unidades formadoras de colônias de fungos (UFCf) filamentos e leveduras em amostras de leite positivas para agentes fúngicos segundo as faixas de CBT menor e maior que 100.000 UFC/mL e negativas.....	25
Tabela 11: Fungos isolados em 102 amostras de leite cru em cultura pura ou mista (2 a 5 agentes).....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Legislação	2
2.1.1. Qualidade e Composição do Leite (Instrução Normativa 51/2002 – Instrução Normativa 62/2011).....	2
2.1.2. Fungos e micotoxinas no leite e alimentos	3
2.2. Qualidade do Leite.....	4
2.3. Leveduras e Fungos Filamentosos no Leite	5
2.4. Micotoxinas	7
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Área e Amostragem	11
3.2. Parâmetros de Qualidade	11
3.3. Contagem Bacteriana Total (CBT) e isolamento de fungos.....	12
3.3.1. Amostras de leite	12
3.3.2. Composição e Contagem de Células Somáticas (CCS).....	14
3.3.3. Contagem Bacteriana Total (CBT).....	14
3.3.4. Isolamento e Identificação de Agentes Fúngicos	14
3.4. Análise estatística	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Qualidade do Leite.....	17
4.2. Contagem Bacteriana Total e Isolamento de Fungos	23
5 CONCLUSÕES.....	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

Dois importantes fatores marcaram o setor leiteiro na última década, o aumento da produção e a redução do número de produtores. Neste período o volume médio por propriedade passou de 28 litros/dia para 52 litros/dia, um crescimento de 85,2% (IBGE, 2010). Em 2014, a produção de leite foi de 35,17 bilhões de litros, representando um aumento de 2,7% em relação ao ano anterior (IBGE 2014).

Apesar dos recentes avanços em produtividade, o Brasil possui somente uma pequena parcela de produtores que atendem aos critérios de excelência de qualidade exigida pelo mercado internacional. A baixa qualidade do leite cru em algumas regiões é notoriamente conhecida, resultando em produtos beneficiados de qualidade insatisfatória, e perda de competitividade no mercado internacional. De um modo geral, no Brasil, o leite é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes, e em consequência, apresenta elevado número de microrganismos. Devido às suas características nutricionais, o leite favorece o desenvolvimento de uma diversidade de microrganismos, entre os quais, as leveduras. As perdas dos subprodutos devido às alterações físicas e organolépticas decorrentes do crescimento microbiano no leite causam grande prejuízo para as indústrias de beneficiamento.

Os programas eficazes para a produção de leite de qualidade, em sua maioria, são baseados em um conjunto de práticas simples de higiene e terapias antimicrobianas para tratamento e controle da mastite, e que utilizam a contagem células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT) como referência para avaliação dos resultados e remuneração diferenciada aos produtores. Além do pagamento de bonificações pelo leite de alta qualidade, podem ser praticadas penalizações para o leite de baixa qualidade.

Os fungos desempenham um importante papel na indústria de produtos lácteos, pois podem promover deterioração ou desencadear fermentação e/ou maturação indesejáveis aos derivados do leite. Por outro lado, pouco se conhece sobre a importância da presença destes microrganismos em leite cru.

Neste contexto, evidenciou-se que algumas propriedades produtoras de leite com higiene da ordenha e do ambiente ruins, apresentavam alta CCS e baixíssima CBT em testes realizados em laboratórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite. Sendo improvável em rebanhos com alta incidência de mastite e higiene precária a obtenção de leite com alta qualidade, objetivou-se investigar a relação entre a CBT e o crescimento de fungos em amostras de leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Legislação

2.1.1. Qualidade e Composição do Leite (Instrução Normativa 51/2002 – Instrução Normativa 62/2011)

A cadeia agroindustrial do leite passou por uma intensa transformação a partir de 2002, quando entrou em vigor, por meio da Instrução Normativa 51/2002 (IN 51/2002 - BRASIL, 2002), uma nova legislação para regulamentação dos critérios mínimos de qualidade e identidade do leite cru produzido no país. Dentre as suas principais características, a IN 51 estabeleceu limites máximos para a contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), determinou o resfriamento obrigatório do leite na fazenda e sua coleta em tanques refrigerados (coleta a granel), estabeleceu limites máximos para resíduos de antibióticos, além de prever medidas específicas de controle e profilaxia da mastite. Foi previsto um calendário para a progressiva adaptação dos produtores às novas exigências.

A CCS e a CBT que definem a sanidade do rebanho, respectivamente no que se refere, à mastite e higiene do processo de obtenção e resfriamento na propriedade são os principais indicadores dos objetivos da IN 51/2002.

Os parâmetros que começaram a vigorar a partir de julho de 2005 foram de 1 milhão de céls/mL para CCS e 1 milhão de ufc/mL para CBT, com previsão de redução gradual destes limites até atingir em 2011, os critérios de qualidade semelhantes aos de países da Europa e dos Estados Unidos (EUA). Em 2011, estimava-se que cerca de 30 a 40% das amostras de leite analisadas pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) estavam acima dos limites exigidos.

Diante das dificuldades de adaptação às novas regras, em 2011 o Ministério da Agricultura prorrogou por seis meses a entrada em vigor da etapa da IN 51, que estabelecia os limites de 100 mil UFC/mL para CBT e 400 mil cel./mL para CCS. A justificativa é que grande parte dos produtores não estariam aptos a produzir leite com as características exigidas. No final de 2011, a IN 51/2002 foi revogada com a publicação da IN 62/2011 (30/12/2011) que alterou o cronograma de entrada em vigor de limites mais rígidos de CCS e CBT, os quais não eram atendidos por uma parcela bastante significativa de produtores. Com o novo calendário estabelecido pela IN 62/2011, os requisitos mínimos de CCS e CBT em vigor a partir de julho/2014 eram de até 500.000 cél./mL e até 300.000 ufc/mL, respectivamente. Em 01 de julho de 2016 passaram a valer os limites de 400.000 para CCS e 100.000 para CBT.

A nova normativa evidenciou a realidade da cadeia produtiva do leite, demonstrando o quão distante do ideal o setor se encontrava. A IN 62/2011 propõe que a exigência seja progressiva, num processo permanente e sistêmico de avaliação de resultados, ajustes e revisão de metas. A nova normativa previa que em mais quatro anos seria possível aos produtores atingir as metas de CCS e CBT estabelecidas inicialmente para julho de 2011.

O uso de parâmetros como CCS e CBT já é realidade em muitos programas de pagamento por qualidade nas indústrias brasileiras. Contudo, a grande limitação da qualidade do leite produzido no Brasil ainda é a elevada carga microbiana e a alta CCS. Dados publicados através do Diagnóstico da Cadeia Produtiva do Leite no Rio de Janeiro (2010) confirmam que há ainda um longo caminho a ser percorrido para melhorar a qualidade do leite no Estado do Rio de Janeiro. A falta de crédito rural com juros compatíveis com a rentabilidade da produção de leite, a deficiência de informações técnicas e a deficiência na qualidade da mão de obra foram os três fatores mais citados como condicionantes da produção de leite com qualidade (DCPLRJ, 2010).

2.1.2. Fungos e micotoxinas no leite e alimentos

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos limites máximos em alimentos são previstos na legislação. Em 2002, foi publicada no Diário Oficial da União a resolução RDC nº 274 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece os limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite fluído, no leite em pó, no amendoim, na pasta de amendoim, no milho em grão, na farinha ou sêmola de milho para consumo humano, bem como os planos de amostragem e métodos de análise correspondentes (BRASIL, 2002). Para os demais produtos alimentícios destinados ao consumo humano, prevalece a legislação de 1974, do Ministério da Saúde, Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos Resolução nº 34/76, publicada no Diário Oficial da União, em 19 de janeiro de 1977, no qual o limite de aflatoxinas B1 + G1 é de 30 µg/kg (30 ppb) (BRASIL, 1977).

Os limites indicados no Quadro 1 são adotados no Brasil e demais países do MERCOSUL (Argentina, Paraguai e Uruguai). Outros países têm seus limites estabelecidos de acordo com o *Codex Alimentarius* ou legislações específicas, como a União Europeia e o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos.

Quadro 1: Limites máximos de concentração de aflatoxinas em alimentos no Brasil

Alimento	Aflatoxina	Limite
Leite		
Leite fluído	M1	0,5 µg/L (0,5 ppb)
Leite em pó	M1	5,0 µg/kg (5 ppb)
Milho		
Em grão (inteiro, partido, amassado, moído)	B1 + B2 + G1 + G2	20,0 µg/kg (20 ppb)
Farinhas ou sêmolos de milho		
Amendoim		
Com casca		
Descascado, cru ou tostado	B1 + B2 + G1 + G2	20,0 µg/kg (20 ppb)
Pasta de amendoim ou manteiga de amendoim		

Fonte: RDC nº 274, Brasil (2002)

2.2. Qualidade do Leite

O leite é importante na nutrição humana e conforme a variação das necessidades de alimentação e preferências do consumidor, o enfoque da produção tem sido modificado. Inicialmente houve interesse no volume. Desde a entrada em vigor da IN 51/2002, a composição e a qualidade higiênica passaram a ser determinantes para a indústria e pagamento ao produtor.

As exigências de qualidade e higiene para o leite cru e derivados lácteos são definidas com base em postulados estabelecidos para a proteção da saúde humana e preservação das propriedades nutritivas desses alimentos. Os testes empregados para avaliar a qualidade do leite fluido constituem normas regulamentares em todos os países, havendo pequena variação entre os parâmetros avaliados e/ou tipos de testes empregados (BRITO; BRITO, 1998).

Do ponto de vista higiênico, o leite deve ter as seguintes características e propriedades: agradável (preservação de sabor, cor, odor e viscosidade); limpo (livre de sujeiras, microrganismos e resíduos); íntegro (composição correta e conservação adequada); seguro (não cause riscos ao consumidor) (BRASIL, 1996). O preenchimento desses critérios depende de um programa de saúde do rebanho, baseado principalmente em prevenção; adoção de medidas de higiene antes, durante e após a ordenha; conservação e transporte em condições de higiene e temperatura adequadas (BRAMLEY, 1992).

O leite ao ser sintetizado e secretado nos alvéolos da glândula mamária é estéril, mas ao ser retirado, manuseado e armazenado pode se contaminar com microrganismos originários do interior da glândula mamária, da superfície das tetas e do úbere, de utensílios, como os equipamentos de ordenha e de armazenamento e de várias fontes do ambiente da fazenda. Esta contaminação pode incluir tanto microrganismos patogênicos como deterioradores. A contaminação microbiana prejudica a qualidade do leite, interfere na industrialização, reduz o tempo de prateleira do leite fluido e seus derivados lácteos e pode colocar em risco a saúde do consumidor (CITADIN et al., 2009).

Os principais microrganismos que contaminam o leite são as bactérias. Vírus, fungos e leveduras têm participação reduzida, embora importante em determinadas situações (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Estes podem ser originários do interior da glândula mamária, da superfície do úbere e das tetas, de utensílios, e de várias fontes do ambiente (DONNELLY, 1990). Dessa forma, a saúde e a higiene da vaca, o ambiente do estábulo e da sala de ordenha, a higienização do local de ordenha, dos tetos e das mãos dos ordenhadores, bem como os procedimentos usados para limpeza e desinfecção dos equipamentos são importantes com respeito à contaminação microbiana do leite cru e qualidade do produto final. De grande importância é também a temperatura e o período de tempo em que o leite é armazenado. Se o leite não é refrigerado (4 °C) rapidamente após a ordenha, a população bacteriana poderá aumentar, atingindo números elevados que podem levar à deterioração.

Do ponto de vista de consumo, os microrganismos presentes no leite podem ser patogênicos ou saprófitas (contaminantes ou deteriorantes). Microrganismos saprófitas em geral não causam doenças, mais podem atuar como patógenos oportunistas, quando o paciente apresenta algum tipo de debilitação. Esses microrganismos podem se multiplicar no leite onde

promovem deterioração, interferindo nos processos de fermentação e diminuindo a vida de prateleira (MINERVINI et al., 2001; JAY, 2005).

As variações na carga microbiana do leite além dos limites preconizados pela legislação podem ocasionar problemas de ordem tecnológica e econômica, resultando em produtos de baixa qualidade, podendo colocar em risco a saúde do consumidor. O resfriamento não melhora a qualidade do leite, mas contribui para a sua preservação.

O tratamento térmico elimina a grande maioria dos microrganismos, entretanto, as enzimas microbianas presentes no leite com alta carga microbiana inicial, permanecem nos produtos lácteos, deteriorando proteínas, gorduras e carboidratos (HAYES; BOOR, 2001; GUIMARÃES, 2008).

O tratamento térmico por si só não é suficiente para assegurar a qualidade do leite ou melhorar o rendimento industrial de seus derivados, já que nenhum método é capaz de corrigir os problemas oriundos da matéria-prima de qualidade comprometida. Portanto, todo produtor deve adequar o manejo geral do rebanho sem omitir, em qualquer instante, as boas práticas de manipulação, para manter a qualidade da matéria prima.

2.3. Leveduras e Fungos Filamentosos no Leite

Os fungos são organismos vivos eucarióticos e heterotróficos, pluricelulares filamentosos (bolors) ou unicelulares (leveduras), que revelam notável capacidade de adaptação e crescimento em condições variáveis. São pouco exigentes quanto aos nutrientes disponíveis, razão pela qual o crescimento pode ocorrer praticamente em qualquer tipo de alimento (LAZZARI, 1997; LEITÃO et al., 1987).

Em condições ideais, as leveduras possuem um tempo de geração maior do que as bactérias. Os fungos filamentosos multiplicam-se mais lentamente que as leveduras (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Desta forma, em um alimento que forneça condições para o desenvolvimento dos três grupos de microrganismos, as bactérias dominarão e, por conseguinte são a causa da deterioração do alimento. Por outro lado, leveduras e bolors são importantes na deterioração de alimentos que não ofereçam condições ao rápido desenvolvimento das bactérias.

A atividade de fungos nos alimentos ocasiona alterações no sabor e na qualidade. Algumas destas alterações são utilizadas na elaboração de queijos. Todavia, em muitos casos, os fungos podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, causados por diferentes graus de deterioração (DINIZ, 2002).

Cousin (1982) e Bishop e White (1986) destacaram que as leveduras raramente se desenvolvem em leite durante o armazenamento em temperaturas de refrigeração, no entanto, a multiplicação pode ocorrer quando o desenvolvimento de bactérias é inibido por resíduos de antibióticos.

O sistema de criação, o tipo de ordenha (mecânica ou manual), e aspectos relativos à higiene das instalações, dos equipamentos e dos funcionários influenciam o aparecimento de fungos no leite (MACHADO et al., 2012; RUZ-PERES et al., 2010; CITADIN et al., 2009; COOREVITS et al., 2008; TEBALDI et al., 2007).

Apesar de os fungos filamentosos estarem amplamente distribuídos na natureza, eles são apenas esporadicamente isolados de casos de mastite, enquanto que as leveduras são os fungos mais frequentemente relacionados às infecções da glândula mamária em animais produtores de leite (KELLER et al., 2000).

A presença de fungos no leite pode também estar associada à ocorrência da mastite micótica no rebanho (COUSINS; BRAMLEY, 1981; RUZ-PEREZ et al., 2004; YAMAMURA et al., 2007; BAUMGARTNER et al., 2008).

Os casos de mastite fúngica geralmente são de curta duração, manifestam-se de forma aguda e têm maior concentração no pré e pós-parto. Podem ocorrer em casos isolados ou sob a forma de surtos (CHAHOTA et al., 2001), mais comuns em animais que receberam tratamentos prolongados com antibióticos (CHAHOTA et al., 2001; CRAWSHAW et al., 2005; SPANAMBERG et al., 2009). O uso de antimicrobiano intramamário por um período prolongado foi implicado como o principal fator relacionado à ocorrência de mastite micótica e presença destes microrganismos no leite (LOFTSGARD; LINDQUIST, 1960).

Os fungos podem ser contaminantes de medicamentos para mastite, diluentes de antibióticos e da água de lavagem dos equipamentos de ordenha (CRAWSHAW et al., 2005; WILLIAMSON; MENNA, 2007). Leveduras são comumente isoladas a partir do epitélio dos tetos dos animais, dos tanques de resfriamento do leite (SPANAMBERG et al., 2004; RUZ-PEREZ et al., 2004), do ambiente da sala de ordenha (KELLER et al., 2000) e também estão presentes em amostras de leite provenientes de animais com mastite (KUO; CHANG, 1993; KRUKOWSKI et al., 2006).

Os principais agentes envolvidos nos casos de mastite micótica são: *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Aspergillus* sp. e *Trichosporum* sp., além de outros como *Geotrichum* e *Pichia* (KUO; CHANG, 1993; LAGNEAU, 1996; KRUKOWSKI et al., 2000; RUZ-PERES et al., 2004; SANTOS; MARIN, 2005). *Rhodotorula* também foi relacionada à mastite (SPANAMBERG et al., 2009).

Candida sp. tem sido associada à mastite de bovinos, e em alguns casos, predominando em relação às demais leveduras. No Brasil há diversos relatos de mastite micótica em vacas, especialmente por leveduras (KRUKOWSKI et al., 2000; SPANAMBERG et al., 2009; COSTA et al., 2008) como no estudo de Costa et al. (2008) que evidenciaram *Candida* spp. em 25,5% em um rebanho, e 40 rebanhos *Candida albicans* foi a espécie dominante (28,1% das cepas). Sobre a frequência de infecções intramamárias provocadas por leveduras são descritos índices entre 0% (CHAGAS et al., 2012) e 25,4% (COSTA et al., 1993), sendo também muito variáveis as taxas de infecções mistas envolvendo estes agentes (COSTA et al., 2008).

Em estudo etiológico da mastite bovina no Município de Indianópolis – MG, Chagas et al. (2012) não isolaram este agente, o que evidencia segundo os autores a pouca relevância de microrganismos deste gênero na etiologia da mastite no rebanho estudado.

A riqueza de nutrientes presentes no leite propicia um excelente substrato para diversos microrganismos incluindo fungos filamentosos e leveduras com diferentes perfis bioquímicos e fisiológicos os quais utilizam os constituintes lácteos para seus benefícios (CASAREGOLA, 2008).

A contaminação do leite por microrganismos indesejáveis como os fungos pode causar alterações físico-químicas e conseqüentemente, de suas propriedades organolépticas, o que limita sua durabilidade e de seus derivados, ocasionando problemas econômicos e de saúde pública (CITADIN et al., 2009). Por sua vez, há a possibilidade da persistência de fungos no leite pasteurizado e fervido, especialmente pasteurização rápida (RUZ-PERES et al., 2010).

Geotrichum sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. foram isolados em amostras de leite pasteurizado (JODRAL et al., 1993). A partir de amostras de leite de tanques de expansão e de latões de propriedades de exploração leiteira, foram isolados: *Candida* spp., *Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp., *Penicillium* spp., e *Aspergillus* spp (MELVILLE et al., 2006).

As condições microbiológicas do leite cru destinado ao consumo e alguns fatores relacionados à sua qualidade foram estudadas por Machado et al. (2012), Schedler et al. (2009) e Citadin et al. (2009) que observaram altas contaminações do leite por leveduras e bolores. Em todas as propriedades havia falhas nos procedimentos de higiene e limpeza. Melville et al. (2006) e Ruz-Peres et al. (2004) detectaram a presença de fungos filamentosos e leveduras em contagens elevadas em todas as amostras de diferentes procedências.

Segundo Fleet (1990) e Taniwaki e Silva (2001) algumas propriedades específicas estão associadas ao desenvolvimento e predominância de leveduras em leite e produtos lácteos, dentre elas a habilidade de se desenvolver em baixas temperaturas e alta concentração de sal, capacidade de fermentação ou assimilação de lactose, produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, assimilação de ácido cítrico ou lático e síntese de enzimas.

Uma das estratégias utilizadas pelos microrganismos para proteção, competição por nutrientes, e espaço é a produção de metabólitos secundários ou peptídeos com atividade antimicrobiana (SCHULZ; BONELLI; BATISTA, 2005). Estes agentes interferem em diversos sítios vulneráveis na célula, como a síntese da parede celular, as funções da membrana citoplasmática, a síntese proteica, o metabolismo de ácidos nucleicos e o metabolismo intermediário (CHABNER et al., 2011).

A síntese de metabólitos secundários segundo Khaldi et al. (2010) pode garantir ao fungo vantagens em ambientes no qual necessite competir com outros organismos. Portanto, muitos desses metabólitos apresentam efeitos tóxicos ou inibitórios em outros grupos de organismos.

Para os fungos se desenvolverem e produzirem micotoxinas são necessárias condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial redox (PEREIRA; CARVALHO; CASTRO, 2002). No Brasil o clima favorece o crescimento de praticamente todo tipo de fungo produtor de micotoxina (MAZIERO et al., 2010).

2.4. Micotoxinas

Alguns fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria* podem produzir metabólitos secundários que apresentam efeito tóxico para o homem e outros vertebrados (HUANG et al., 2013), além de alguns invertebrados, plantas e microrganismos (BENNETT; KLICH, 2003).

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixa massa molecular, formadas por uma série de compostos de diferentes toxicidades e produzidos por fungos filamentosos especialmente dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (RITTER; HOELTZ; NOLL, 2011). São termoestáveis, não sendo afetadas por métodos de processamento, cozimento ou peletização, e nem pelo frio ou pela luz (LAZZARI, 1997). Além disso, podem permanecer no alimento mesmo após o desaparecimento do fungo (HUANG et al., 2013; MOTA et al., 2015).

Uma micotoxina pode ser produzida por mais de uma espécie de fungo, assim como uma mesma espécie pode produzir diferentes tipos de micotoxinas (MAZIERO et al., 2010) e os efeitos tóxicos das micotoxinas podem ser potencializados pelo sinergismo elas (HUSSEIN; BRASSEL, 2001).

A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo (DINIZ, 2002). A maioria das micotoxinas são termoestáveis, resistindo a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram (MOLIN; VALENTINI, 1999).

Estudos têm revelado a existência de cerca de 400 micotoxinas (BETINA, 1984). As micotoxinas mais importantes são divididas em três grandes grupos: aflatoxinas, produzidas pelo gênero *Aspergillus* (*A. flavus* e *A. parasiticus*); fusariotoxinas, produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, representadas pela zearalenona, tricotecenos e fumonisinas; e ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus alutaceus* (*A. ochraceus*) e algumas espécies do gênero *Penicillium* além de patulina, e desoxinivalenol (MURPHY et al., 2006).

As principais micotoxinas encontradas em alimentos são aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1), ácido fusárico, fumonisinas (B1 e B2), ocratoxinas (A, B e C), patulina, citrinina, zearalenona e tricoteceno (HUSSEIN; BRASSEL, 2001; RODRÍGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002; MURPHY et al., 2006).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana através do consumo de cereais, oleaginosas e derivados, ou indiretamente pela ingestão de produtos de origem animal como leite, carne e ovos procedentes de animais que se alimentam com rações previamente contaminadas (YIANNIKOURIS et al., 2002; MOLIN; VALENTINI, 1999).

A ingestão, inalação ou absorção por via dérmica destes compostos pode causar graves efeitos sobre a saúde animal e humana, provocando um grupo de doenças ou distúrbios, chamado micotoxicoses (SHEPHARD, 2008; BENNETT; KLICH, 2003). Muitas micotoxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso frequentemente os mais atingidos (SANTURIO, 2000). Esses efeitos são conhecidos como micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, e dos possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos aos quais está exposto (PERAICA et al., 2000, BHATNAGAR et al., 2002).

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. flavus*, *A. parasiticus* e, mais raramente *A. nomius* (MARNISSI et al., 2012; PRANDINI, et al., 2007; RAHIMI et al., 2012) e representam o grupo com mais resultados positivos em

alimentos (PEREIRA et al., 2002). Colonizam, principalmente, milho, algodão e frutas secas (*A. flavus*) e amendoim (PRANDINI et al., 2007).

São conhecidos, 20 compostos análogos de aflatoxina, que compreende as toxinas B1, B2, G1, G2, M1, M2 (LAZZARI, 1997). As principais aflatoxinas de interesse médico-sanitário são B1, B2, G1 e G2 (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

As aflatoxinas M1 e M2 são derivadas da B1 e B2 (LAZZARI, 1997). A aflatoxina B1 (AFB1) é ingerida por animais através de alimentos contaminados (MOTTA et al., 2015) e após absorção no trato gastrointestinal é metabolizada, no fígado, a 4-hidroxilado, metabólito conhecido como aflatoxina M1 (AFM1) (PRANDINI et al., 2007) excretada na urina e no leite de vacas lactantes (MARNISSI et al., 2012). Estudos sugerem que a taxa de passagem (*carry-over*, em inglês) de AFB1 a AFM1 é influenciada por fatores nutricionais e fisiológicos, como dieta, taxa de ingestão, taxa de digestão, sanidade, capacidade de biotransformação hepática e produção leiteira (DUARTE et al., 2013; OLIVEIRA, 2010). A pasteurização e a esterilização não afetam a quantidade de AFM1 no leite (PRANDINI et al., 2007).

A produção de aflatoxinas é favorecida pela temperatura de 23°C a 26°C, sendo produzida em maior quantidade quando o substrato é rico em carboidratos, gorduras e proteínas (FRANCO; LANDGRAF, 2003). São solúveis em água e em solventes como metanol e etanol, mas não são solúveis em gorduras e óleos. São termoestáveis, não sendo afetadas por métodos de processamento, cozimento ou peletização, e nem pelo frio ou pela luz (LAZZARI, 1997).

Os fungos do gênero *Fusarium* podem produzir pelo menos três tipos de micotoxinas: fumonisinas, zearalenona, desoxinivalenol, toxina T-2. São seis as toxinas pertencentes ao grupo das fumonisinas (81, 82, 83, 84, A1 e A2). A desoxinivalenol (vomitoxina ou DON) é produzida por diversas espécies de *Fusarium* e pertence ao grupo das toxinas conhecidas como tricotecenos (LAZZARI, 1997).

No Brasil, alguns trabalhos têm levantado os níveis de micotoxinas, especialmente AM1 em leite cru (PEREIRA et al., 2005; SASSAHARA et al., 2005), pasteurizado (IHAA et al., 2013; PEREIRA et al., 2005; PRADO et al., 1999), UHT (OLIVEIRA et al., 2013, PRADO et al., 1999) e em pó (IHAA et al., 2013; PRADO et al., 1999). A presença de micotoxinas em leite processado confirma observações de Galvano et al. (1998) sobre a resistência ao tratamento térmico, como pasteurização ou esterilização e que a micotoxina não é degradada no processamento para fabricação de derivados lácteos (PRADO et al., 2000; PRADO et al., 2001; SANTOS et al., 2014).

Durante a fabricação de queijos, a AFM1 concentra-se na caseína, ficando nela retida durante as diversas etapas do processamento (DEVECI et al., 2007; FALLAH, 2010). Esta interação torna os níveis de AFM1 nos queijos maiores em relação ao leite, constituindo um problema de saúde pública e preocupação mundial, já que tais derivados são intensivamente consumidos por crianças, adultos e idosos. As mesmas conclusões são apresentadas nos trabalhos de Kamkar (2008) e Manetta et al. (2009).

A maioria dos alimentos e rações pode permitir o crescimento e o desenvolvimento de fungos toxigênicos, tanto durante a produção, quanto durante o processamento, o transporte e

o armazenamento (FRISVAD; SAMSON, 1992). Embora nem todas causem danos à saúde, elas estão amplamente incorporadas aos alimentos e seus derivados, constituindo-se em um sério problema de saúde pública (BENNETT; KLICH, 2003).

Para a maioria das micotoxinas, exceto AFM1, no Brasil não são estabelecidos os valores máximos em leite e derivados. De acordo com a Resolução RDC nº 274, da ANVISA (Ministério da Saúde - Diário Oficial da União, de 16/10/2002) o limite máximo para aflatoxinas M1 em leite fluido é 0,5µ/kg, e para leite em pó 5,0µg/kg.

Em muitos países legislações têm sido adotadas visando à proteger os consumidores contra os efeitos nocivos das micotoxinas em alimentos *in natura* e processados, bem como em rações para animais. As legislações mais conhecidas regulamentam os níveis de aflatoxinas. A importância das micotoxinas na alimentação e na saúde humana e animal é um dos principais focos dessas legislações. Freire et al. (2007) salientaram com base na literatura disponível os aspectos políticos e econômicos, principalmente com relação aos interesses comerciais e aos impactos na disponibilidade da oferta de alimentos. Os países que possuíam legislação para micotoxinas até 2003 têm, pelo menos, limites regulamentares para a presença de aflatoxina B1 ou para a soma B1+B2+G1+G3, M1, tricotecenos desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol, para as toxinas T2 e HT2, fumonisinas B1, B2 e B3, ocratoxina A, patulina, esterigmatocistina, zearalenona, alcalóides ergóticos, ácido agárico e as fomopsinas. Os limites de tolerância têm mostrado uma tendência para decrescerem, enquanto que os métodos de amostragem e de análise têm se tornado mais diversificados e detalhados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área e Amostragem

O presente trabalho foi desenvolvido em 120 propriedades de produção de leite nos Municípios de Resende, Vassouras e Valença, na região do Médio Paraíba, no Sul do Estado do Rio de Janeiro (Figura 1), em duas etapas.



Figura 1: Divisão Político-Administrativa do Estado do Rio de Janeiro. Fonte: <http://www.cultura.rj.gov.br/>

As amostras foram processadas em Laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP) e Laboratório Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV) na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.2. Parâmetros de Qualidade

Inicialmente foi realizado um acompanhamento da qualidade do leite em 160 propriedades, fornecedoras de leite ao Laticínio Grupiara, localizado em Valença, RJ, entre janeiro e junho de 2016. Para esta finalidade, amostras de leite foram colhidas mensalmente, do tanque de expansão ou latão de leite de cada propriedade, identificadas e encaminhadas para análise de composição, CSS e CBT.

3.3. Contagem Bacteriana Total (CBT) e isolamento de fungos

Em julho e agosto foram colhidas amostras de 120 propriedades, devido a exclusão de 40 das 160 propriedades iniciais, por término do contrato com o laticínio ou por interrupção no fornecimento de leite ao mesmo; para isolamento, identificação e determinação das UFC de fungos filamentosos e leveduras, ao mesmo tempo em que as amostras foram avaliadas em um Laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) quanto à CBT por método de referência (BRASIL, 2011).

3.3.1. Amostras de leite

As amostras de leite de propriedades individuais foram colhidas diretamente dos tanques de refrigeração (Figura 2) ou dos latões (Figura 3), contando com a colaboração do responsável técnico pela coleta de leite a granel para abordagem aos produtores. Amostras de leite do conjunto foram coletadas em frascos esterilizados, diretamente da parte superior e central do tanque de expansão ou latões, após agitação por cinco minutos, utilizando-se coletor de aço inoxidável.

Alíquotas de 40 mL de leite foram acondicionadas assepticamente em recipientes plásticos específicos (Figura 4), previamente identificados, contendo: 1) bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) na concentração de 8 mg do ingrediente ativo para cada 40 mL da amostra; 2) azidiol (3 gotas) para 40 mL da amostra; 3) frascos isentos de conservantes.



Figura 2: Leite de propriedade no sul do estado do Rio de Janeiro, armazenado em latões de 50 mL de plástico e zinco, em caixa de alvenaria com água resfriada. Rio de Janeiro. 2016.



Figura 3: Tanque de resfriamento de leite de aço inoxidável, capacidade 10.000 litros. Propriedade no sul do estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2016.



Figura 4: Frascos com bronopol (A) para determinação da composição e contagem de células somáticas (CCS), com adição de azidiol (B) para determinação da contagem bacteriana total (CBT) e sem conservantes (C) para cultura e isolamento de agentes fúngicos.

Os frascos com conservantes foram homogeneizados por inversão, imediatamente identificados com o nome ou número da respectiva propriedade da qual foram procedentes, mantidos sob-refrigeração e encaminhados por Sedex, a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, em até 48 horas, para um

Laboratório da RBQL na Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz (ESALQ) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

Os frascos sem conservantes, após identificação foram acondicionados em recipientes isotérmicos contendo gelo e transportados até a UFRRJ onde foram destinados ao isolamento e identificação de agentes fúngicos no Laboratório de Micologia do DMIV na UFRRJ.

3.3.2. Composição e Contagem de Células Somáticas (CCS)

Amostras acondicionadas em frascos com bronopol foram destinadas ao estudo de composição (gordura, proteína, lactose e sólidos totais e não gordurosos - %), CCS (cél./mL) em Laboratório da RBQL (ESALQ – USP), onde foram realizadas as análises por métodos de referência (BRASIL, 2011).

3.3.3. Contagem Bacteriana Total (CBT)

Uma alíquota acondicionada em frascos com azidiol foi encaminhada à ESALQ - USP, onde foi determinada a CBT (UFC/mL) por citometria de fluxo (BRASIL, 2011).

3.3.4. Isolamento e Identificação de Agentes Fúngicos

Para isolamento de fungos filamentosos e de leveduras, alíquotas de cada amostra foram submetidas aos seguintes procedimentos (Figura 5): homogeneização e diluição em tampão salina estéril (NaCl a 0,85% em solução aquosa) até a diluição 10^{-3} .

Uma alíquota de 1 mL da parte não diluída e das respectivas diluições foi semeada em duplicata nos meios Sabouraud dextrose com cloranfenicol, com incubações a 26 °C, 32 °C e 37 °C. As leituras foram diárias até o 10º dia.

As colônias emergentes com características de fungos filamentosos foram identificadas de acordo com Hoog e Guarro (2000), considerando-se características macromorfológicas como relevo, textura e coloração das colônias e micromorfológicas. Nas análises micromorfológicas, foram preparadas lâminas empregando-se lactofenol azul de algodão ou clarificante (hidróxido de sódio - NaOH a 20% em solução aquosa), conforme fossem respectivamente de fungos hialinos ou escuros. Levou-se em conta a presença de conídios característicos que permitissem uma identificação imediata e/ou a presença de outras estruturas como conidióforos ou estípedes, vesículas, fiálides, esporângios e esporangióforos, esporangiosporos e outras estruturas de importância. Também foram verificados os arranjos de conídios ao redor de conidióforos, tipos de ramificações e aspectos da conidiogênese. Em algumas situações, foi necessário o cultivo em lâmina para que se observassem as estruturas de forma íntegra e fosse possível fazer o acompanhamento do crescimento.

As identificações de fungos unicelulares foram realizadas prioritariamente com base em chaves taxonômicas de Kurtzman e Fell (1998) e Kurtzman; Fell e Boekhout (2011), e complementarmente utilizando o protocolo de identificação de leveduras do Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (DMIV/UFRRJ).

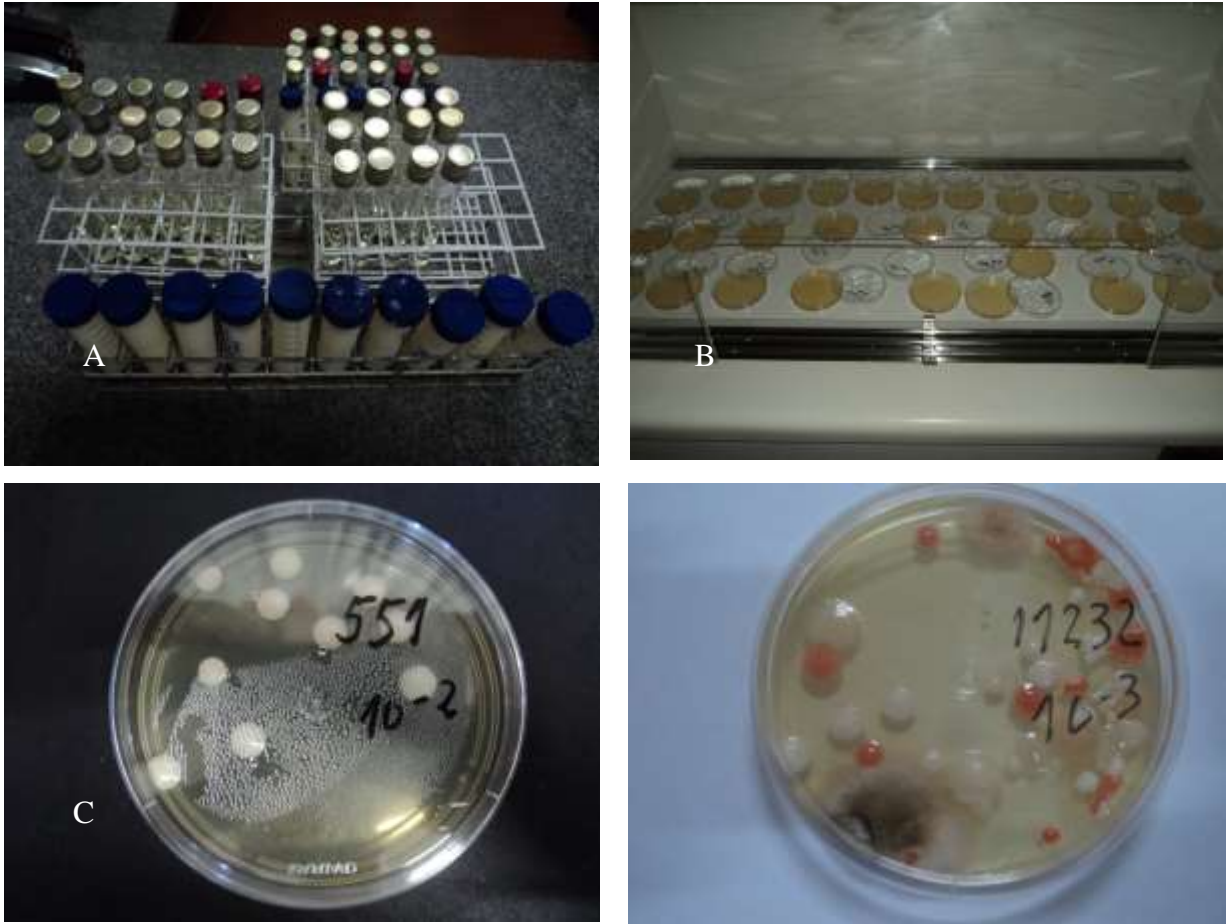


Figura 5: Procedimentos para isolamento e identificação de agentes fúngicos em amostras de leite cru. Diluição em solução salina estéril (A), plaqueamento em ágar Sabouraud dextrose a 4%, incubação, contagem de unidades formadoras de colônias (C), plaqueamento e identificação das colônias isoladas (D).

Após triagem inicial que permitiu separar leveduras de fungos filamentosos, estas foram submetidas a provas bioquímicas e fisiológicas, tais como microcultivo em “corn meal” para verificação de produção de pseudohifas, clamidoconídeos e blastoconídeos, prova de tubo germinativo, produção de urease, síntese de amido, crescimento na presença de cicloheximida e principalmente a realização de provas de auxanograma (assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas), utilizando-se aproximadamente 24 fontes, zimograma (fermentação de fontes carbonadas), utilizando-se 7 fontes e realização de demais provas complementares, incluindo-se o cultivo CHROMagar® *Candida*. De posse dos dados obtidos, foram empregadas chaves taxonômicas para identificação dos isolados.

3.4. Análise estatística

Dos valores de CCS, CBT e unidades formadoras de colônias de fungos foram calculadas as médias e o desvio padrão e os fungos isolados apresentados como porcentagem

(%) dos isolamentos em relação ao número de amostras. Os valores de CCS, CBT e CFT para cada amostra foram convertidos em log de base 10, avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-wilk e analisados pelo teste de teste de Wilcoxon-Mann-Whitney a um grau de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Qualidade do Leite

A cadeia agroindustrial do leite passou por uma intensa transformação a partir de 2002, quando entrou em vigor, por meio da Instrução Normativa 51/2002 (IN 51/2002 - BRASIL, 2002), uma nova legislação para regulamentação dos critérios mínimos de qualidade e identidade do leite cru produzido no país. Com a nova legislação foram instituídos padrões mínimos de CCS e de CBT e passou a valer a exigência legal de resfriamento do leite na fazenda. Quando a IN51 foi promulgada em 2002 foi previsto um calendário para adequação dos produtores e laticínios às novas exigências.

Os parâmetros que começaram a vigorar a partir de julho de 2005 foram de 1 milhão de céls./mL para CCS e 1 milhão de ufc/mL para CBT, com previsão de redução gradual destes limites até atingir em 2011, os critérios de qualidade semelhantes aos de países da Europa e dos EUA.

No final de 2011, a IN 51/2002 foi revogada com a publicação da IN 62/2011 que alterou o cronograma de entrada em vigor de limites mais rígidos de CCS e CBT, os quais não eram atendidos por uma parcela significativa de produtores.

Com o novo calendário os requisitos mínimos em vigor a partir de julho/2014 eram de até 500.000 cél./mL e até 300.000 ufc/mL para CCS e CBT, respectivamente. Em 01 de julho de 2016 passaram a valer os limites de 400.000 para CCS e 100.000 para CBT. Neste contexto, observa-se que em propriedades com altos índices de mastite (alta CCS) e higiene da ordenha insatisfatória apresentavam baixa CBT (Figura 06).

Nas propriedades amostradas, no período de janeiro a junho de 2016 os critérios legais para CCS eram de 500.000 cél./mL e para CBT até 300.000 ufc/mL. Dessa forma, observa-se que na média, o leite das propriedades apresentava baixa qualidade em relação a ambos os parâmetros (Tabela 2), exceto CBT em abril e maio cujas médias foram próximas do limite.

Na ausência de medidas eficazes de controle microbiológico do leite, em algumas propriedades o leite obtido em condições precárias de higiene apresenta-se classificado como de ótima qualidade conforme demonstrado na tabela 01.

Observa-se que enquanto a CCS manteve-se constantemente alta e relativamente estável, a CBT apresentou variações mais significativas e abaixo do limite em abril e maio.

Segundo estes critérios entre 23,1% (fevereiro e março) e 33,1% (junho) das propriedades teriam o leite de acordo com as normas de qualidade estabelecidas para o período de coleta (Tabela 2).

Observa-se que o número de propriedades com amostras em conformidade com a legislação é muito baixo, demonstrando a inadequação das condições de saúde da glândula mamária (CCS) e higiene (CBT). Contudo, o aspecto positivo é o número crescente de amostras em conformidade, o que pode ser justificado pela proximidade do período (01 de julho) para entrada em vigor de critérios mais rígidos (Tabela 3), pelos quais apenas 17,5% (junho) das propriedades estariam em conformidade com os critérios de qualidade estabelecidos.



Figura 6: Condições de higiene ambiental e da ordenha em algumas propriedades com alta contagem de células somáticas (CCS) e baixa contagem bacteriana total (CBT). Rio de Janeiro, 2016.

Tabela 1: Critérios de qualidade do laticínio Grupiara, de acordo com a legislação (IN 62/2011).

	Ótimo	Regular	Ruim
CBT (x mil/mL)	0 – 20.000	21.000 – 100.000	> 101.000
CCS (x mil/mL)	0 – 200.000	201.000 – 400.000	> 401.000
Gordura (%/mL)	> 3,7	3,0 – 3,7	< 3,0
Proteína (%/mL)	> 3,2	3,0 – 3,2	< 3,0

Tabela 2: Média e desvio padrão da contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) de janeiro a junho de 2016 em 160 propriedades fornecedoras de leite ao Laticínio Grupiara, Valença – RJ.

	CCS (x mil cél./mL)	CBT (x mil ufc/mL)
Janeiro	838 ± 541	557 ± 1312
Fevereiro	877 ± 571	448 ± 1130
Março	903 ± 627	520 ± 1113
Abril	848 ± 583	298 ± 518
Maiο	808 ± 563	297 ± 661
Junho	796 ± 634	494 ± 1264

Tabela 3: Prazos e limites para redução de CBT e CCS no leite de acordo com a IN 62/2011 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste.

Parâmetro	01/01/2012 a 30/06/2014	01/07/2014 a 30/06/2016	01/07/2016
CCS (x mil cél./mL)	<600	<500	<400
CBT (x mil ufc/mL)	<600	<300	<100

Um grande número de amostras apresentaram CCS e CBT acima dos limites estabelecidos pela legislação, sendo que a CCS foi o critério mais frequentemente fora da conformidade e, portanto o critério mais limitante à qualidade do leite nas propriedades amostradas (Tabela 4).

O número de propriedades em não conformidade embora decrescente entre janeiro e junho, foi elevado, tanto em relação aos limites atuais quanto aos anteriores. Questiona-se se o limite de CCS é relevante do ponto de vista de saúde pública e de atendimento ao mercado consumidor, pois as células somáticas estão naturalmente presentes no leite. É improvável que haja diferença de segurança quanto ao consumo de leite com 500.000 ou 400.000 cél./mL, exceto nas condições em que a alta CCS esteja relacionada à mastite causada por microrganismos como *Staphylococcus aureus* e outros com relevância em saúde pública. Por outro lado, a CBT que reflete diretamente as condições de higiene na ordenha, no armazenamento e no transporte do leite tem um impacto mais evidente na qualidade do leite.

Para parâmetros individuais, observa-se que entre 55,6% (janeiro) e 60,6% (maio) das propriedades apresentaram leite com CBT menor que 100 ufc/mL e quanto à CCS de 16,9% (fevereiro) a 26,3% (junho) tiveram amostras com CCS menor que 400 cél./mL. Entre as propriedades amostradas observou-se um maior número de amostras em conformidade quanto aos parâmetros CCS em junho (38,1%) e CBT em maio. Sendo estes valores indicativos dos índices de mastite e higiene, constata-se que o leite foi de baixa qualidade em pelo menos 134 (83,75%) propriedades (Tabela 5).

Tabela 4: Número e porcentagem de propriedades com amostras de leite em conformidade as normas legais. Valença, RJ. Janeiro a junho de 2016.

	Até 30.06.2016		01.07.2016	
	CCS<500.000 e CBT<300.000		CCS<400.000 e CBT<100.000	
	Nº amostras	%	Nº amostras	%
Janeiro	42	26,3	20	12,5
Fevereiro	37	23,1	18	11,3
Março	37	23,1	23	14,4
Abril	40	25,0	26	16,3
Mai	45	28,1	26	16,3
Junho	53	33,1	28	17,5

Tabela 5: Número e porcentagem de amostras de leite com contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) em conformidade com os limites de referência (BRASIL, 2011). Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.

	CBT (ufc/mL)				CCS (cél./mL)			
	Até 30.06.2016		01.07.2016		Até 30.06.2016		01.07.2016	
	≤ 300		≤ 100		≤ 500		≤ 400	
Jan	119	74,4	89	55,6	54	33,8	33	20,6
Fev	129	80,6	94	58,8	45	28,1	27	16,9
Mar	115	71,9	94	58,8	52	32,5	36	22,5
Abr	115	71,9	92	57,5	52	32,5	37	23,1
Mai	124	77,5	97	60,6	53	33,1	35	21,9
Jun	125	78,1	95	59,4	61	38,1	42	26,3

Considerando que CCS elevada indica alta prevalência de mastite, em geral relacionada ao manejo inadequado e ausência de medidas eficazes para o controle da doença no rebanho, é possível que a alta CCS também esteja relacionada à baixa qualidade

microbiológica do leite, demonstrada por alta CBT. Neste sentido, observa-se que em grande número de propriedades a CCS não esteve relacionada à CBT, mesmo em situações em que a higiene ambiental e da ordenha foram insatisfatórias.

A CCS e CBT no conjunto das propriedades mostra uma evolução favorável, com número crescente de propriedades com estes parâmetros em conformidade com o que estabelece a legislação (Figura 7).

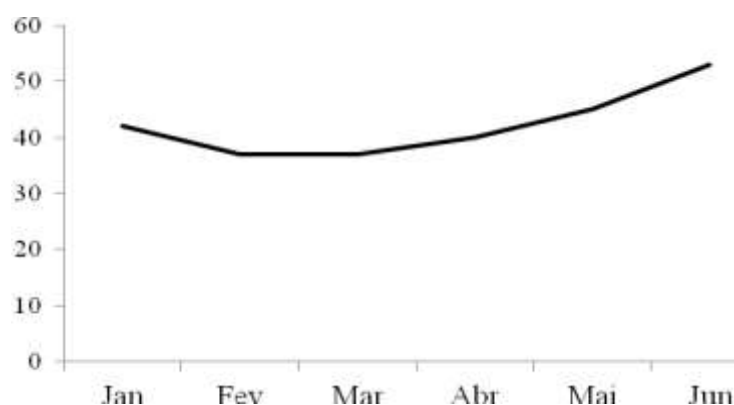


Figura 7: Evolução do número de amostras de leite de 160 propriedades em conformidade com os critérios de qualidade (CCS e CBT) estabelecidos pela IN62/2011. Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.

A análise estatística dos dados não evidenciou correlação entre os parâmetros CBT e CCS ($r=0,203$), CBT e gordura ($r=0,071$) ou proteína ($r=0,149$), bem como entre a CCS e gordura ($r=0,208$) ou proteína ($r=0,060$). Valores de r próximos de zero indicam que é muito baixa a correlação entre as variáveis, o que contraria os destacados efeitos da mastite no decréscimo de qualidade do leite, afetando a qualidade dos produtos derivados e tempo de prateleira (PETROVISKI, 2006). Segundo Santos (2002), a infecção no úbere provoca mudanças nas concentrações dos principais nutrientes (proteína, gordura, lactose) do leite, o que não se confirmou no presente estudo.

Os dados publicados contudo são divergentes. Comparando o efeito da composição do leite em diferentes resultados de CCS do leite do tanque de resfriamento, Machado et al., (2000) verificaram aumento significativo do teor de gordura em amostras de tanques com CCS acima de 1.000.000 céls./mL. Bueno et al., (2005), observando os teores médios de gordura com o aumento da CCS, verificaram que praticamente não houve diferenças significativas nesses valores entre amostras com diferentes níveis de CCS.

Quando se divide as propriedades segundo a CCS, utilizando-se faixas de até 400 cél./mL, de 401 a 700, de 701 a 1000 e maior que 1000 e se analisa a CBT das amostras nestas respectivas faixas de variação observa-se diferença significativa a 95% de confiança

($p=0,0410$) por análise de variância (Tabela 05). A diferença foi verificada entre as faixas de 401.000 a 700.000 e 701.000 a 1.000.000 ($p=0,0162$) e maior que 1.000.000 de células ($p=0,00584$). A CBT foi maior nas amostras que apresentaram CCS entre 401.000 e 700.000 e acima de 1 milhão de cél./mL (Tabela 6).

Tabela 6: Contagem bacteriana total (CBT) de amostras de leite segundo a contagem de células somáticas (CCS). Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.

CCS (cél./mL)	< 400.000	401.000 a 700.000	701.000 a 1.000.000	>1.000.000
CBT (ufc/mL)	386AB	520B	292AC	508B
Valor de p	0,04103			

Na linha de CBT, números seguidos de letras diferentes indicam diferença significativa a 95% de confiança pelo Teste T.

Vale destacar que a IN 51/2002 teve um enorme mérito por determinar critérios mínimos de qualidade para o leite cru produzido no país, entretanto não foram previstas as consequências sobre os produtores que não atendessem aos requisitos mínimos e como estes novos critérios afetariam a cadeia produtiva do leite como um todo. Além disso, a velocidade com que as exigências legais de qualidade foram implantadas não foi compatível com a capacidade de resposta dos produtores e da indústria. Ocorreu que muitos estabelecimentos responsáveis pela coleta de leite nas propriedades e processamento do mesmo, estabeleceram medidas de caráter punitivo, com condenação total de grande volume de leite fora dos critérios de qualidade, sendo a bonificação por qualidade implantada na maioria dos estabelecimentos, mas com critérios muito mais rígidos que os estabelecidos pela própria legislação como demonstrado na tabela 7.

Em relação aos critérios de qualidade estabelecidos pelo laticínio responsável pela captação do leite nas propriedades, o leite para ser classificado como de qualidade ótima deve conter no máximo 20.000 ufc/mL e CCS menor que 200.000 cél./mL. Neste contexto, embora em conformidade com a legislação, muitos produtores não recebem bonificação por qualidade, ou recebem menos, sendo os critérios para classificação como ruim equivalente ao mínimo estabelecido pela legislação.

Tabela 7: Parâmetros de qualidade estabelecidos pelo laticínio para bonificação por qualidade. Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.

	PARÂMETROS		
	Ótimo	Regular	Ruim
CBT (ufc/mL)	≤ 20.000	21.000 a 100.000	>100.000
CCS (cél./mL)	≤ 200.000	201.000 a 400.000	CCS > 400.000
Gordura (%/mL)	$> 3,7$	3,0 – 3,7	$< 3,0$
Proteína (%/mL)	$>3,2$	3,0 – 3,2	$< 3,0$

Quanto à CBT apenas um quarto das propriedades estariam produzindo leite de qualidade ótima e menos de 10% das amostras seriam ótimas quanto à CCS (Tabela 8), sendo que pelos critérios mínimos de qualidade estabelecidos pela legislação vigente, um número muito maior de amostras estaria em conformidade.

Tabela 8: Contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) de amostras de leite de 160 propriedades classificadas segundo critérios de qualidade estabelecidos pelo laticínio. Valença, RJ, janeiro a junho de 2016.

	CBT (x mil ufc/mL)						CCS (x mil cél./mL)					
	Ótimo		Regular		Ruim		Ótimo		Regular		Ruim	
	≤ 20	21 a 100	21 a 100	31,3	71	44,4	≤200	200 a 400	200 a 400	127	79,4	
Jan	39	24,4	50	31,3	71	44,4	2	1,3	31	19,4	127	79,4
Fev	39	24,4	55	34,4	66	41,3	3	1,9	24	15,0	133	83,1
Mar	37	23,1	57	35,6	66	41,3	5	3,1	32	20,0	123	76,9
Abr	38	23,8	54	33,8	68	42,5	7	4,4	30	18,8	124	77,5
Mai	41	25,6	56	35,0	63	39,4	8	5,0	27	16,9	125	78,1
Jun	38	23,8	57	35,6	65	40,6	10	6,3	33	20,6	117	73,1

Nas condições de produção da maioria das pequenas e médias propriedades produtoras de leite, como as amostradas no presente estudo, o atendimento ao critério máximo 100 ufc/mL exige intensa monitoração dos pontos fracos da produção e controle extremamente rígido das fontes de contaminação do leite e dos utensílios.

Contagens bacterianas menores que 10 UFC/mL como observadas entre janeiro e junho nas amostras avaliadas são improváveis. Contudo de janeiro a junho de 2016 em 21 das 160 propriedades o leite apresentou CBT abaixo de 10 ufc/mL e baixa CCS, confirmando a qualidade do leite produzido no que se refere à saúde da glândula mamária (mastite) e higiene na obtenção e armazenamento do leite.

4.2. Contagem Bacteriana Total e Isolamento de Fungos

Buscando-se justificar a baixa CBT em amostras de leite obtido em condições diversas de manejo, avaliou-se o crescimento de fungos filamentosos e leveduras no leite de 120 propriedades. Das 120 amostras analisadas, em 14 (11,7%) não foi evidenciada a presença de colônias características de fungos filamentosos ou leveduras, bem como de bactérias, sendo caracterizadas como negativas e em quatro amostras (3,33%) não foi possível evidenciar a presença de fungos em função de alta contaminação por bactérias.

Em 102 amostras (102/120 - 85%) foram isolados fungos filamentosos e/ou leveduras. Nestas, obteve-se como média para a CBT o valor de 133.000 UFC/mL, sendo contadas em

média, 1.284 UFC de fungos/mL (UFCf/mL) (Tabela 9). No total das amostras (120) a CBT média foi 233.000 UFC/mL, e foram contadas 1.139 UFCf filamentosos e/ou leveduras.

Os valores obtidos para as UFC de colônias de bactérias (CBT) e de fungos (CTCF) foram convertidos em log de base 10 e analisadas pelo teste T (variâncias diferentes), sendo observada diferença significativa a 99% de confiança ($p < 0,001$) entre a CBT de amostras com e sem crescimento de fungos (Tabela 9), sendo a CBT menor nas amostras positivas para fungos. Destaca-se que o número de amostras sem crescimento de fungos foi baixo (14) em relação ao número de amostras positivas (102).

Tabela 9: Média e desvio padrão da contagem bacteriana total (CBT - UFC/mL) e unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos filamentos e leveduras em amostras de leite positivas e negativas para agentes fúngicos.

	Positivas	Negativas	Total de amostras
CBT	133±193*	652±748*	233±411
UFC (fungos)	1284±1501	0	1129±1468
Nºamostras	102	14	116

*Diferença significativa pelo teste T (log base 2) a 95% de confiança ($p=0,02910$)

Por meio do teste de correlação de Pearson avaliou-se a relação entre as variáveis CBT e o crescimento de fungos (UFCf), sendo observada uma correlação negativa fraca ($r = -0,1214$), validando possibilidade de fungos influenciarem negativamente o crescimento bacteriano e a CBT nas amostras de leite. Esta possibilidade foi levantada por meio de observações de campo, onde o leite de propriedades produtoras de leite em condições de higiene insatisfatória apresentava baixa CBT, em conformidade com as normas. Sendo pouco provável obter CBT abaixo de 20.000 ou mesmo 100.000 UFC/mL nestas condições, buscou-se investigar o isolamento de fungos em amostras de leite do tanque de expansão em diferentes condições de higiene ambiental e da ordenha em relação à CBT analisada em laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite, por citometria de fluxo.

Avaliando-se amostras de leite com CBT menor e maior que 100.000 UFC/mL em relação ao número de UFCf observa-se que houve diferença significativa ($p < 0,001$) com maior contagem de colônias de fungos em amostras com CBT menor que 100 UFC/mL (Tabela 10).

A legislação brasileira através da IN 62/2011 (BRASIL, 2011) estabeleceu para a CBT que a partir de julho/2014, o leite cru refrigerado, nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul não deve exceder o limite máximo de 300.000 UFC/mL. Segundo Mesquita et al. (2008), a exemplo do que foi observado nas propriedades amostradas no presente estudo a CBT, uma medida direta da contaminação do leite, é responsável pelas maiores não conformidades com o padrão de qualidade estabelecido pela IN-62.

Tabela 10: Média e desvio padrão da contagem bacteriana total (CBT - UFC/mL) e unidades formadoras de colônias de fungos (UFCf) filamentos e leveduras em amostras de leite positivas para agentes fúngicos segundo as faixas de CBT menor e maior que 100.000 UFC/mL e negativas.

Média	CBT < 100	CBT > 100	Negativas
CBT (UFC/mL)	49±30	380±250	602±1541
CFT (UFCf/mL)	1110±1379*	1791±1742*	0
Nº amostras	76	27	13

*Diferença significativa a 99% de confiança ($p=7,7905E-06$) pelo teste T.

A baixa CBT do leite destas propriedades contraria, em parte, resultados de estudos recentes sobre a qualidade microbiológica do leite cru em diferentes regiões do Brasil onde foram observadas CBT acima do limite estabelecido pela legislação (ANGELIS et al., 2016; REZENDE, 2013; SIMIONI et al., 2013; RIBEIRO NETO et al., 2012; BELOTI et al., 2011; SILVA et al., 2010; SANTOS, 2008; PINTO et al., 2006; ZANELA et al., 2006).

O resfriamento do leite logo após a ordenha, a coleta granelizada e a contagem máxima de bactérias são importantes critérios para garantir a qualidade microbiológica do leite. No entanto, como destacado por Langoni (2013), para que a indústria possa receber leite com qualidade é necessário o comprometimento de todos os envolvidos na cadeia produtiva e o uso de práticas higiênicas adequadas, em todas as etapas de produção.

De acordo com Molineri et al. (2012) as principais fontes de contaminação microbiana do leite cru são os equipamentos de ordenha e tanques de expansão, a superfície externa dos tetos e úbere, e os patógenos causadores de mastite no interior do úbere. A temperatura e o tempo de armazenamento do leite também são importantes, pois estão diretamente relacionados com a multiplicação dos microrganismos presentes no leite, afetando, consequentemente, a CBT (GUERREIRO et al., 2005). A limpeza periódica dos tanques de expansão (MOLINERI et al., 2012), a temperatura da água durante o ciclo de limpeza dos equipamento de ordenha e a concentração de detergente (BAVA et al., 2011) contribuem significativamente com a alta ou baixa CBT no leite do tanque. Neste contexto, em todas as propriedades amostradas no presente estudo, o leite era mantido em tanques de refrigeração, atendendo ao que foi estabelecido pela legislação. Contudo, os critérios de higiene da ordenha e a forma de higienização dos equipamentos não foram avaliados, tendo-se colhido as amostras para pesquisas de fungos no mesmo momento em que foram colhidas amostras para análises mensais de CBT, CCS e composição pelo responsável pela captação do leite nas propriedades. Utilizou-se para efeito de análise o laudo de CBT emitido pelo Laboratório credenciado, sendo este o resultado utilizado para pagamento ao produtor.

Resultados de CBT inferiores a 20.000 UFC/mL refletem boas práticas de higiene (RIBEIRO NETO et al., 2012; BOZO et al., 2013). Neste contexto, contrariando a relevância da CBT como critério de qualidade microbiológica do leite, a maioria das amostras analisadas no presente estudo não deve ser considerada de ótima qualidade, visto que apresentaram em diferentes níveis contaminação por fungos filamentosos e/ou leveduras.

Mesmo 15 anos após a entrada em vigor das normas instituídas pela IN51/2002, condição higiênica insatisfatória é uma condição comum no sistema de produção de leite no Brasil. Baron et al. (2017) ao avaliarem as condições de higiene de ordenha na produção leiteira da agricultura familiar no município de Realeza - Sudoeste Paranaense, concluíram que a maioria dos produtores do município não possui conhecimento suficiente sobre manejo do rebanho e práticas de higiene de ordenha para produção de um leite de qualidade, e que atenda as especificações estabelecidas pela legislação vigente, condição esta não muito diferente dos produtores amostrados no presente estudo, ainda que nem todos atendam às especificações de agricultura familiar.

Neste trabalho foram isolados fungos filamentosos (*Acremonium* sp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* spp., *Penicillium* sp.) e leveduras (*Candida* sp., *Geotrichum* sp., *Pichia* sp., *Prothoteca* sp., *Rodothorula* sp., *Trichosporon* sp.) em 102 amostras (Tabela 11).

Tabela 11: Fungos isolados em 102 amostras de leite cru em cultura pura ou mista (2 a 5 agentes).

	NÚMERO DE AGENTES ISOLADOS/AMOSTRA				Total
	Cultura Pura	2	3	5	
FILAMENTOSOS					
<i>Acremonium</i>		1			1
<i>Alternaria</i> sp.			1		1
<i>Aspergillus</i> sp.	4	1		1	6
<i>Cladosporium</i> sp.	2	3	2		7
<i>Fusarium</i> sp.	1	2	2		5
<i>Mucor</i> sp.			1	1	2
<i>Penicillium</i> sp.		1	1		2
Não identificados	4	5			9
LEVEDURIFORMES					
<i>Candida</i> sp.	27	20	9	1	57
<i>Geotrichum</i> sp.	7	9	2		18
<i>Pichia</i> sp.	2	2	1		5
<i>Prothoteca</i> sp.	1				1
<i>Rodothorula</i> sp.	6	10	4	1	21
<i>Trichosporon</i> sp.	4	6	3	1	14
Não identificada	5	5	1		11
Total	63	65	27	5	160

Alguns grupos de bactérias encontradas em leite cru são capazes de produzir enzimas como proteases e lipases, catalisadoras da hidrólise de proteínas e lipídeos, respectivamente, e assim podem alterar as características tanto do leite fluido quanto dos derivados lácteos (TAFFAREL et al., 2013). Do ponto de vista da indústria, a maioria destas enzimas é resistente aos tratamentos térmicos empregados no processamento do leite e, assim, podem

continuar causando problemas de qualidade mesmo após a pasteurização. Esses são alguns aspectos que justificam o uso da CBT como critério de qualidade para o leite e seus derivados. No entanto, como evidenciado no presente trabalho, a baixa CBT não implica necessariamente em ótima qualidade microbiológica. Soma-se aos prováveis efeitos dos fungos sobre a carga bacteriana do leite, o potencial risco desses agentes para a saúde dos consumidores e os efeitos dos metabólitos de fungos sobre a qualidade do leite.

No contexto deste trabalho, alguns grupos de fungos isolados (Tabela 3) como *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Alternaria* sp. são capazes de produzir toxinas, sendo estas uma ameaça para a saúde do consumidor (FREIRE et al., 2007).

Questiona-se se as condições de armazenamento e o tempo decorrido entre a contaminação e o processamento são suficientes para a produção de toxinas em níveis considerados tóxicos para os humanos, visto que as micotoxinas são produzidas, ainda que não exclusivamente, à medida em que o fungo atinge a maturidade (FREIRE et al., 2007). E ainda, a presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxina, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo (DINIZ, 2002).

Segundo Bennett e Klich (2003), as micotoxinas podem contaminar os alimentos ou matérias-primas e a ingestão, inalação ou absorção por via dérmica de alguns metabólitos de fungos pode produzir efeitos adversos sobre a saúde dos animais e dos seres humanos. Em vários países, existem legislações que estabelecem limites máximos para a presença de micotoxinas em alimentos *in natura* e processados e em rações.

No Brasil, a presença de micotoxinas em leite *in natura* e pasteurizado foi descrita por diversos autores, especialmente aflatoxina M1 (AFM1) (SANTOS, 2014; SANTOS; BANDO; MACHINSKI, 2014; OLIVEIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2005; GONÇALEZ et al., 2005). Contudo, no Brasil não são estabelecidos os valores máximos em leite e derivados, exceto aflatoxina M1, (Resolução RDC nº 274/2002, ANVISA). A Portaria nº 50, de 20 de fevereiro de 2006 (BRASIL, 2006), através do Plano de Controle de Resíduos em Leite - PCRL, estipula o envio de amostras de leite ou gordura, pelos estabelecimentos sob Inspeção Federal, para o Laboratório de Referência Animal – LARA, para pesquisa de antibióticos, aflatoxina M1, antiparasitários e pesticidas organoclorados.

A presença de fungos e o potencial risco de produção de toxinas no leite cru e seus derivados são preocupantes, pela grande importância nutricional do leite em todas as fases da vida do ser humano (OLIVEIRA, 2010).

Diversos estudos foram conduzidos com a finalidade de detectar a presença de micotoxinas em alimentos destinados aos animais e avaliar a dinâmica de sua eliminação no leite. São comuns os relatos da presença de aflatoxina M1 em leite pasteurizado, esterilizado e em pó (PRADO et al., 1999; SASSAHARA et al., 2005; GONÇALEZ et al., 2005; OLIVEIRA; FERRAZ, 2007), em queijo Minas (frescal, canastra e padrão) (PRADO et al., 2000c), queijo ralado e tipo parmesão (PRADO et al., 2001). Neste contexto, os dados aqui obtidos somam-se aos resultados de estudos já publicados, ao detectar-se no leite cru, a presença de fungos com potencial para produção de micotoxinas e causar danos à saúde dos consumidores.

A presença de fungos no leite dos tanques de refrigeração de 102 propriedades além do potencial risco da produção de micotoxinas, apresenta um provável efeito inibidor da microbiota bacteriana do leite, evidenciado pela menor CBT nas amostras positivas em relação às negativas para fungos ($p < 0,05\%$).

A inibição do crescimento bacteriano, resultando em baixa CBT da amostra mascara a qualidade do produto, simulando em condições de higiene ruim uma ótima qualidade microbiológica do leite. E ainda, a baixa CBT além de desejável e adequada às normas vigentes é economicamente favorável, uma vez que o leite recebe bonificação dos estabelecimentos responsáveis pela captação e processamento do leite.

Questiona-se se a produção de queijo, especialmente minas frescal, amplamente consumido pela população brasileira permite a manutenção dos fungos e a produção de micotoxinas, e se os níveis dessas substâncias podem ser relevantes do ponto de vista de saúde pública.

5 CONCLUSÕES

A presença de fungos em amostras de leite foi relevante do ponto de vista da qualidade microbiológica da amostra, especificamente em relação a contagem bacteriana total, sendo esta menor em amostras positivas para fungos.

Fungos filamentosos e leveduras podem influenciar a avaliação da qualidade do leite, sendo que nas condições desse estudo, a baixa contagem bacteriana não esteve relacionada à um leite de boa qualidade microbiológica.

Os mecanismos e interações entre fungos e bactérias em amostras de leite cru devem ser investigados para garantia da obtenção de um leite de boa qualidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELIS, D.; SOUSA, M.R.P.; OLIVEIRA, V. Qualidade do leite, obtido por ordenha manual e mecanizada, recebido em um laticínio do município de Argirita – MG. **Veterinária Notícias**, v.22, n.1, p.27-31. 2016. <http://revistas.bvs-vet.org.br/vetnot/article/view/30694/33514>

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução de 4 de setembro de 2006. Dispõe sobre o regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Leite Humano. Diário Oficial da União, Brasília, 5set. 2006. Disponível em: www.anvisa.gov.br

ANVISA. BRASIL. Resolução RDC no 274, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da União, 16/10/2002.

BARON, C.P.; SACHET, A.P.; SILVA-NETO, A.F.; FRANCISCATO, C. Caracterização das condições de higiene de ordenha na produção leiteira da agricultura familiar no município de Realeza - Sudoeste Paranaense. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.4, p.693-707, 2017. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/380>

BAUMGARTNER, M.; SPERGSEER, J.; SCHODER, G.; WINTER, P. Outbreak of clinical yeast mastitis in a dairy herd following simultaneous intramammary antibiotic treatment of 23 cows. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v.95, p.15-21, 2008.

BAVA, L.; ZUCALI, M.; SANDRUCCI, A.; BRASCA, M.; VANONI, L.; ZANINI, L.; TAMBURINI, A. Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, v.78, p.211-219, 2011. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/380>. Acesso em: 03 maio 2017.

BELOTI, V.; RIBEIRO JÚNIOR, J.C.; TAMANINI, R., YAMADA, A.K., CAVALETTI, L., SHECAIRA, C.L., NOVAES, D.G, SILVA, F.F., GIOMBELLI, C.J., MANTOVANI, F.B., SILVA, M.R. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.16, n.2, 2011. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/gvRfHOQjI5PmOHd_2013-6-25-16-55-49.pdf. Acesso em: 03 maio 2017.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.497-516. 2003.

BETINA, V. **Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification**. Amsterdam: Elsevier, 1984. 528p.

BISHOP, J.R.; WHITE, C.H. Assessment of Dairy Product Quality and Potential Shelf-Life - A Review. **Journal of Food Protection**, v.49, n° 9, p. 739-753,1986.

BOZO, G.A.; ALEGRO, L.C.A.; SILVA, L.C.; SANTANA, E.H.W.; OKANO, W.; SILVA, L.C.C. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.589-594, 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352013000200040. Acesso em: 03 maio 2017.

BRAMLEY, A.J. **Factors affecting milk quality**. In: ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; EDDY, R.G. (Ed). *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle*. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1992. p.291-334.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p.1-24.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p. 13, Seção 1, 21 setembro de 2002.

BRASIL. Portaria 146, de 07 de março de 1996. Ministério da Agricultura. Regulamentos Técnicos de Identidades e Qualidades de Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, 1996.

BRASIL. Resolução no 34/76, Ministério da Saúde, Diário Oficial da União, 19/01/1977.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P: **Qualidade higiênico leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL-ADT, (EMBRAPA-CNPGL Documentos, 62). 1998. 17p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/593346/1/Qualidadehigienicadoleite.pdf>. Acesso em: 03 maio 2017.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; THOMAZ, L. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.848-854, 2005.

CHAGAS, L.G.S.; MELO, P.C.; BARBOSA, N.G.; GUIMARÃES, E.C.; BRITO, D.V.D. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* E *Candida sp.* em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil.

CHAHOTA, R.; KATOCH, R.; MAJAN, A.; VERMA, S. Clinical bovine mastitis caused by *Geotrichum candidum*. **Veterinarski ARHIV**, v.71, p.197-201, 2001.

CITADIN, A.S.; POZZA, M.S.S.; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.10, n°1, p.52-59, 2009.

COOREVITS, A.; DE JONGHE, V.; VANDROEMME, J.; REEKMANS, R.; HEYMAN, J.; MESSENS, W.; DE VOS P.; HEYNDRICKX, M. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. **Systematic and Applied Microbiology**, v.31, p.126-140, 2008.

COSTA, E.O., GANDRA, C.R., PIRES, M.F., COUTINHO, S.D., CASTILHO, W., TEIXEIRA, C.M. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, vol. 124, p.13–17, 1993.

COSTA, G. M.; SILVA, N.; ROSA, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA, U. P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do sul do estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1938- 1942, 2008.

COUSINS, C.M.; BRAMLEY, A. J. **The microbiology of raw milk**. In: ROBINSON, R.K. (Ed.). *Dairy microbiology*, v.1, p.119-163, 1981.

DIAGNÓSTICO DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (DCPL RJ): Relatório de pesquisa. Coordenação do projeto Carla Ribeiro Valle, Maurício César Gomes de Salles; elaboração Sebastião Teixeira Gomes. - Rio de Janeiro: FAERJ: SEBRAE-RJ, 2010.

DINIZ, S.P.S.S. **Micotoxinas**. Livraria e Editora Rural. 181p. 2002.

DONNELLY, C.W. Concerns of microbial pathogens in association with dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.6, p.1656-1661, 1990.

DUARTE, S.C.; ALMEIDA, A.M.; TEIXEIRA, A.S.; PEREIRA, A.L.; FALCÃO, A.C.; PENA, A.; LINO, C.M. Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 411-417, 2013.

FRANCO, B.G.M.F; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.P.G.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48p. http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf

GENTILINI, E; DENAMIEL, G; BETANCOR, A; REBUELTO, M; RODRIGUEZ-FERMEPIN, M; DE TORREST, R.A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1913-1917, 2002.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J.D.; PINTO, M.M.; ROSSI, M.H.; NOGUEIRA, J.H.C., MANGINELLI, S. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.4, p.435-438, 2005.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.216-222, 2005.

GUIMARÃES, C.P.A. **Impacto da assistência técnica sobre a qualidade do leite**. Mestrado (Dissertação), Higiene e Tecnologia de Alimentos - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008. Disponível em: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraDownload.do?select_action=&cobra=166784&co_midia=2. Acesso em: 11 nov.2015.

HAYES, M.C.; BOOR, K. **Raw milk and fluid milk products**. In: HAYES, M. C.; BOOR, K. *Applied dairy microbiology*. 2 th ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.59-76.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, v.38, p.1-65. 2010.

IHAA, M.H., BARBOSA, C.B., OKADA, I.A., TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M1 in milk and distribution and stability of aflatoxin M1 during production and storage of yoghurt and cheese. **Food Control**, v.29, p.1-6, 2013.

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

JODRAL, M.; LINAN, E.; ACOSTA, I.; GALLEGOS, C.; ROJAS, F.; BENTABOL, A. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, p.171-174, 1993.

KELLER, B.; SCHEIBL, P.; BLECKMANN, E.; HOEDEMAKER, M. Differentiation of yeasts in mastitis milk. **Mycoses**, v.1, p.17-19, 2000.

KHALDI, N.; SEIFUDDIN, F.T.; TURNER, G.; HAFT, D.; NIERMAN, W.C.; WOLFE, K.H.; FEDOROVA, N.D. Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetic and Biology**, v.47, n.9, p.736-741, 2010.

KRUKOWSKI, H. Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.9, p.181-184, 2006.

KRUKOWSKI, H., TIETZE, M., MAJEWSKI, T., ROZANSKI, P. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. **Mycopathologia**, v.150, p.5-7, 2000.

KUO, C.C.; CHANG, C.H. Isolation of yeasts from mastitis milk of dairy cattle. **Journal of the Chinese Society of Veterinary Science**, v.19, p.221-227, 1993.

LAGNEAU, P.E. Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. **Mycopathologia**, v.135, p.99-102, 1996.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.5, p.620-626, 2013. <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v33n5/12.pdf>

LEITÃO, M. F., TEIXEIRA, L.T., MORI, E.E.M. Bactérias termodúricas não esporogênicas e seu significado na qualidade do leite comercial pasteurizado. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 1, p. 54-64, 1987.

MACHADO, N.J.B., LAUREANO. M.M.M., MOTA, D.A. ÍTALO TIAGO SILVEIRA ROCHA MATOS, I.T.S.R, BRASIL, R.J.M., HOSHIBA, M.A. Caracterização da qualidade microbiológica do leite cru de propriedades do município Parintins-AM. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 55, n. 4, p. 327-331, 2012.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SILVA, L.F.P. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.359-361, 2000.

MARNISSI, B.E, BELKHOUB, R., MORGAVI, D. P., BENNANI, L., BOUDRA, H. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk collected from traditional dairies in Morocco. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.2819-2821, 2012.

MARTINEZ, R.; GIRONI, R.H.A.R.; SANTOS, V.R. Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos, usados na prática médica - Ribeirão Preto - SP - 1994. Medicina, Ribeirão Preto, v.29, p.278-284, 1996.

MELVILLE, P.A.; RUZ-PERES, M.; YOKOIA, E.; BENITES, N.R. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.3, p.295-301, 2006.

MINERVINI, F.; MONTAGNA, M.T.; SPILOTROS, G.; MONACI, L.; SANTACROCE, M.P.; VISCONTI, A. Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p.141-162, 2001.

MOLINERI, A. I.; SIGNORINI, M. L.; CUATRÍN, A. L.; CANAVESIO, V.R.; NEDER, V.E.; RUSSI, N.B.; BONAZZA, J. C.; CALVINHO, L.F. Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.44, p.187-194, 2012.

MOTTA, T.P., FRIZZARIN, A., MARTINS, T., MIRANDA, M.S., ARCARO, J.R.P., AMBRÓSIO, L.A., POZZI, C.R. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B1 na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.º1, p.23-28, 2015.

MURPHY, P. A., HENDRICH, S., LANDGREN, C., BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, p.51-65, 2006.

NASCIMENTO, M.S.; SOUZA, P.A. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em placa, a contagem de psicotróficos e a prova de redutase em leite cru refrigerado. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.97, p.81-86, 2002.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940, West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLIVEIRA, C.A.F.; FERRAZ, J.C.O. Occurrence of aflatoxina M1 in pasteurized, UHT milk and milk powder from goat origin. **Food Control**, v.18, p.375–378, 2007.

OLIVEIRA, C.A.F.; SEBASTIÃO, L.S.; FAGUNDES, H.; ROSIM, R.E.; FERNANDES, A.M. Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, S.1, p.22-225, 2010.

OLIVEIRA, M. S. **Validação de metodologia analítica para análise de aflatoxina M1 e sua ocorrência no leite bovino comercializado no sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 2010. http://cascavel.ufsm.br/tede/tde_arquivos/22/TDE-2010-08-11T104646Z-2785/Publico/OLIVEIRA,%20MAURICIO%20SCHNEIDER.pdf

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G.; ROSA, C.A.R.; VELOSO, T.; SOUZA, L.A.F.; RIBEIRO, J.M.M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em

amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. **Ciência Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.106-112, 2005.

PEREIRA, M.L.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*. e *B. ceppa*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.1, p.141-156, 2002.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.645-51, 2006.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; SOARES, C.R.; VELOSO, T. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais / Brasil – agosto/98 a abril/99. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.3, p.420- 423, 1999.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; CARVALHO, E.P.; VELOSO, T.; SOUSA, L.A.F.; CARDOSO, A.C.F. Aflatoxina M1 em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.2, p.147-151, 2001.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M.S.; PEREIRA, M.L.; ABRANTES, F.M.; SANTOS, L.G.; VELOSO, T. Aflatoxin M1 in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte – Minas Gerais/ Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.3, p.398-400, 2000.

PRANDINI, A.; TANSINI, G.; SIGOLO, S.; FILIPPI, L.; LAPORTA, M.; PIVA, G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 5, p. 984-991, 2007.

RAHIMI, E.; AMERI, M. A Survey of Aflatoxin M₁ Contamination in Bulk Milk Samples from Dairy Bovine, Ovine, and Caprine Herds in Iran. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v.89, p.158-160, 2012.

REZENDE, E. S. J. Instrução Normativa 51: **Adequação do leite em três mesorregiões de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado ciência e tecnologia de Alimentos). Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2013. 54p. <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/2839> 2013.

RIBEIRO NETO, A.C.; BARBOSA, S.B.P.; JATOBÁ, R.B.; SILVA, A.M.; SILVA, C.X.; SILVA, M.J.A.; SANTORO, K.R. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1343-1351, 2012. <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v64n5/v64n5a35.pdf>

RITTER, A.C., HOELTZ, M., NOLL, I. B. Potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, no.3, p.623-628, 2011.

RUZ-PERES M., BENITES, N. R., YOKOYA, E. MELVILLE, P. A. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino à pasteurização e fervura. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, n°1: p.62-70, 2010.

RUZ-PEREZ, M.; YOKOYA, E; PASSARELLI, D; CANTARINO, S.C; BENITES, N.R; MELVILLE, P.A. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.663-665, 2004

SANTOS P.A. **Avaliação do leite cru refrigerado produzido na região sudoeste do estado de Goiás estocado por diferentes períodos** [Tese de Doutorado]. Goiania, Goiás: Universidade Federal de Goiás, 2008. 50 p.

SANTOS, A. L.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite bovino comercializado no estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.1, p.371-374, 2014.

SANTOS, M.V. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL J.A.B. (Org.). Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. Juiz de Fora, p.139-149, 2003.

SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida spp* from mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.59, p.251-253, 2005.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.1, 2000.

SASSAHARA, M.; NETTO, D.P.; YANAKA, E.K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxina M1 in raw milk in the North of Paraná state. **Food and Chemical Toxicology**, v.43 p.981-984, 2005.

SCHULZ, D.; BONELLI, R.R.; BATISTA, C.R.V. **bacteriocinas e enzimas produzidas por Bacillus spp.** para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição.**, v.16, n.4, p.403-411., 2005.

SILVA, M.A.P.; SANTOS, P.A.; SILVA, J.W.; LEÃO, K.M.; OLIVEIRA, A.N.; NICOLAU, E.S. Variação da qualidade do leite cru refrigerado em função do período do ano e do tipo de ordenha. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.1, p.112-118, 2010. <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/6553>

SIMIONI, F.J.;BARETTA,C.R.D.M.; STEFANI, L.M.; LOPES, L.S.; TIZZIANI, T. Qualidade do leite proveniente de propriedades com diferentes níveis de especialização. **Revista Sêmia: Ciências Agrárias**, v.34, n.4, p.1901-912, 2013. Disponível em:<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/11733/pdf> .

SPANAMBERG, E.; SANCHES, E.M.C.; SANTURIO, J.N.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.282-290, 2009.

TAFFAREL, L. E.; COST, P.B.; OLIVEIRA, N.T. E.; BRAGA, G. C.; ZONIN, W. J. Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento. **Arquivo Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.7-11, 2013. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572013000100002

TEBALDI, V.M.R.; RESENDE, J.G.O.S.; RAMALHO, G.C.A.; OLIVEIRA, T.L.C.; ABREU, L.R.; PICCOLI, R.H. Avaliação Microbiológica de Bebidas Lácteas Fermentadas Adquiridas no comércio varejista do Sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.4, p.1085-1088, 2007.

USDA. United States Department of Agriculture. 2014. Disponível em: <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>

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

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J.P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Reserch**, v.51, n.2..p.81-99, 2002.

ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; ZANELA, C.; MARQUES, L.T.; MARTINS, P.R.Z. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.153-159, 2006. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/118434/1/41n01a21.pdf>