

**Influência de fungos filamentosos e leveduras sobre contagem bacteriana e células somáticas em amostras de leite cru bovino**

**Influence of filamentous fungi and yeasts on bacterial count and somatic cells in samples of raw bovine milk**

**Influencia de hongos filamentosos y levaduras en el recuento bacteriano y las células somáticas en muestras de leche cruda de bovino**

Recebido: 01/05/2020 | Revisado: 03/05/2020 | Aceito: 06/05/2020 | Publicado: 12/05/2020

**Eduardo de Assis Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0437.3651>

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brasil

E-mail: [assiseduvet@gmail.com](mailto:assiseduvet@gmail.com)

**Rita de Cássia Campbell Machado Botteon**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9837-7532>

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: [ritabotteon@gmail.com](mailto:ritabotteon@gmail.com)

**Francisco de Assis Baroni**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0582-1911>

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: [baroni@ufrj.br](mailto:baroni@ufrj.br)

**Ana Carla Pinheiro Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2926-6086>

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: [carlabiomar@bol.com.br](mailto:carlabiomar@bol.com.br)

**Resumo**

No Brasil, de um modo geral, o leite é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes, em consequência, apresenta elevado número de microrganismos contaminantes. 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

láticos, pois podem promover deterioração ou desencadear fermentação e/ou maturação indesejáveis aos derivados do leite. O presente trabalho objetivou investigar a relação entre contagem bacteriana total (CBT) e o isolamento de fungos filamentosos e leveduras em amostras de leite do tanque de expansão. O leite de 160 propriedades foi monitorado por 6 meses quanto à contagem de células somáticas (CCS) e CBT por métodos oficiais. 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., *Prothoteca* sp., *Rodothorula* sp., *Trichosporon* sp.) com média de 1.284 UFC/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 devem ser investigadas, bem como a relação entre o isolamento de fungos e a baixa CBT do leite.

**Palavras-chave:** Leite; Microbiota; Micologia; Qualidade do leite.

### Abstract

In Brazil, in general, milk is obtained in deficient hygienic-sanitary conditions, consequently, it presents a high number of contaminating microorganisms. Microbial growth in milk causes great economic damage to the processing industries. Fungi play an important role in the dairy industry, as they can promote deterioration or trigger undesirable fermentation and / or maturation to milk derivatives. The present study aimed to investigate the relationship between total bacterial count (TBC) and the isolation of filamentous fungi and yeasts in milk samples from the expansion tank. Milk from 160 farms was monitored for 6 months for somatic cell count (SCC) and TBC by official methods. Samples of 120 properties were analyzed for TBC and fungal isolation. In 102 samples (85%) filamentous fungi (*Acremonium* sp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* spp., *Penicillium* sp.) and / or *Candida* sp., *Geotrichum* sp., *Pichia* sp., *Prothoteca* sp., *Rodothorula* sp., *Trichosporon* sp.) with an average of 1,284 UFC/mL and TBC of 133,000 UFC/mL. In 14 negative samples for fungi, an average of 652,000 CFU/mL was obtained for TBC. The difference in TBC between positive and negative samples for fungi was significant ( $p < 0.001$ ), demonstrating the influence of fungi on bacterial growth and milk TBC. The presence of fungi and the potential risk of toxin production in raw milk and its derivatives

should be investigated, as well as the relationship between fungal isolation and low milk TBC.

**Keywords:** Milk; Microbiota; Mycology; Milk quality.

## Resumen

En Brasil, en general, la leche se obtiene en condiciones deficientes higiénico-sanitarias, por lo tanto, presenta una gran cantidad de microorganismos contaminantes. El crecimiento microbiano en la leche causa un gran daño económico a las industrias de procesamiento. Los hongos juegan un papel importante en la industria láctea, ya que pueden promover el deterioro o desencadenar fermentación y / o maduración no deseadas en los productos lácteos. El presente estudio tuvo como objetivo investigar la relación entre el recuento bacteriano total (TCC) y el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras en muestras de leche del tanque de expansión. La leche de 160 granjas se monitoreó durante 6 meses para el recuento de células somáticas (CCS) y la TCC por métodos oficiales. Se analizaron muestras de 120 propiedades para detectar TCC y aislamiento fúngico. En 102 muestras (85%) de hongos filamentosos (*Acremonium* sp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* spp., *Penicillium* sp.) y / o *Candida* sp., *Geotrichum* sp., *Pichia* sp., *Prothoteca* sp., *Rodothorula* sp., *Trichosporon* sp.) con un promedio de 1,284 UFC/mL y CBT de 133,000 UFC /mL. En 14 muestras negativas para hongos, se obtuvo un promedio de 652,000 UFC/mL para TCC. La diferencia en la TCC entre muestras positivas y negativas para hongos fue significativa ( $p < 0.001$ ), lo que demuestra la influencia de los hongos en el crecimiento bacteriano y la TCC de la leche. Se debe investigar la presencia de hongos y el riesgo potencial de producción de toxinas en la leche cruda y sus derivados, así como la relación entre el aislamiento de hongos y la baja TCC de la leche.

**Palabras clave:** Leche; Microbiota; Micología; Calidad de la leche.

## 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. Os programas 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, que utilizam a contagem células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT) como referência para avaliação dos resultados e remuneração diferenciada aos produtores.

Devido às suas características nutricionais, o leite favorece o desenvolvimento de uma diversidade de microrganismos, entre os quais, fungos filamentosos e leveduras. 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.

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). 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.

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixa massa molecular, formadas por uma série de compostos de diferentes toxicidades são produzidos por fungos filamentosos, especialmente dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (Ritter; Hoeltz & Noll, 2011).

Partindo da hipótese, que propriedades produtoras de leite, com higiene da ordenha e do ambiente insatisfatórias, apresentavam alta CCS e baixa CBT em testes realizados em laboratórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite, devido à presença de fungos filamentosos e leveduras, o presente trabalho de pesquisa teve por objetivo investigar a relação entre a CBT e o crescimento de fungos em amostras de leite cru de tanques de expansão.

## 2. Metodologia

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas: uma a campo (propriedades rurais) e uma em laboratório (processamento das amostras), (Pereira, Shitsuka, Parreira & Shitsuka, 2018). Foram coletadas amostras de leite cru 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.

As amostras de leite para CCS e CBT 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 microbiológica no Laboratório Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV) na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### **Parâmetros de Qualidade**

Inicialmente foi realizado um acompanhamento da qualidade do leite em 160 propriedades fornecedoras de leite a um Laticínio localizado no Município de 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.

### **Contagem Bacteriana Total (CBT) e isolamento de fungos**

Em julho e agosto foram colhidas amostras de 120 propriedades, devido à 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).

### **Amostras de leite**

As amostras de leite de propriedades individuais foram colhidas diretamente dos tanques de refrigeração ou dos latões, 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, 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.

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.

### **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 (*Ibid*, 2011).

### **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).

### **Isolamento e Identificação de Agentes Fúngicos**

Para isolamento de fungos filamentosos e de leveduras, alíquotas de cada amostra foram submetidas aos seguintes procedimentos: 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  $26^\circ\text{C}$ ,  $32^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$ . As leituras foram diárias até o 10º dia.

As colônias emergentes com características de fungos filamentosos foram identificadas de acordo com De Hoog, Guarro, Gene & Figueras (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, fiáldes, 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 & Fell (1998), utilizando o protocolo de identificação de leveduras do Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (DMIV/UFRRJ).

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.

### **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 contagem de fungos totais (CFT) para cada amostra foram convertidos em  $\log_{10}$ , 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% ( $p \leq 0,05$ ).

### 3. Resultados e Discussão

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.

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.

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 1.

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

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

Fonte: Laticínio.

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. 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).

**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, Valença – RJ.

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

Fonte: Autores.

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.

**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

Fonte: a IN 62/2011 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste.

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).

**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	%
<b>Janeiro</b>	42	26,3	20	12,5
<b>Fevereiro</b>	37	23,1	18	11,3
<b>Março</b>	37	23,1	23	14,4
<b>Abril</b>	40	25,0	26	16,3
<b>Maió</b>	45	28,1	26	16,3
<b>Junho</b>	53	33,1	28	17,5

Fonte: Autores.

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 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	
<b>Jan</b>	119	74,4	89	55,6	54	33,8	33	20,6
<b>Fev</b>	129	80,6	94	58,8	45	28,1	27	16,9
<b>Mar</b>	115	71,9	94	58,8	52	32,5	36	22,5
<b>Abr</b>	115	71,9	92	57,5	52	32,5	37	23,1
<b>Mai</b>	124	77,5	97	60,6	53	33,1	35	21,9
<b>Jun</b>	125	78,1	95	59,4	61	38,1	42	26,3

Fonte: Autores

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			

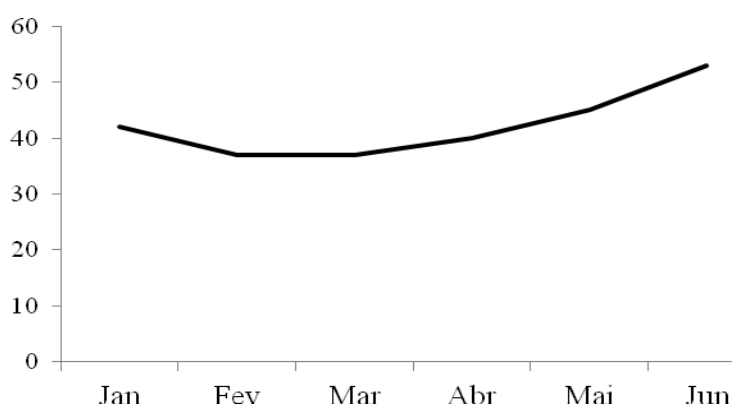
Na linha de CBT, números seguidos de letras diferentes indicam diferença significativa a 95% de confiança pelo Teste T. Fonte: Autores

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 1).

**Figura 1:** 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.



Fonte: Autores

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 et al. (2014), a infecção no úbere provoca mudanças nas concentrações dos principais nutrientes (proteína, gordura, lactose) do leite, o que não se confirmou no presente estudo.

Contudo, os dados publicados são divergentes, quando comparamos 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.

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.

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

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

Fonte: Autores

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.

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

Fonte: Autores

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.

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 fungos filamentos e leveduras em amostras de leite positivas e negativas para agentes fúngicos (UFC/ml)

	Positivas	Negativas	Total de amostras
<b>CBT</b>	133±193*	652±748*	233±411
<b>Fungos</b>	1284±1501	0	1129±1468
<b>Nºamostras</b>	102	14	116

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

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. Como 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. Fonte: Autores

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 a granel 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, conseqüentemente, 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				
	Cultura Pura	2	3	5	Total
<b>FILAMENTOSOS</b>					
<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
<b>LEVEDURIFORMES</b>					
<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
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>65</b>	<b>27</b>	<b>5</b>	<b>160</b>

Fonte: Autores

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 & 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 et al, 2014; Oliveira et al., 2010; Pereira et al., 2005; Gonzalez 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 (ANVISA, 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; Gonzalez 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.

#### **4. Considerações Finais**

A presença de fungos filamentosos e leveduras pode 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, mesmo sendo esta menor em amostras positivas para fungos.

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

#### **Referências**

Angelis, D, Sousa, MRP & Oliveira, V. (2016). Qualidade do leite, obtido por ordenha manual e mecanizada, recebido em um laticínio do município de Argirita – MG. *Veterinária Notícias* 22(1): 27-31. [Http://revistas.bvs-vet.org.br/vetnot/article/view/30694/33514](http://revistas.bvs-vet.org.br/vetnot/article/view/30694/33514)

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (2006). 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. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

ANVISA. Brasil. (2002) Resolução RDC nº 274, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Diário Oficial da União*, Brasília. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

Baron, CP, Sachet, AP, Silva-Neto, AF & Franciscato, C. (2017). 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* 10(4): 693-707. Disponível em :  
<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/380>

Bava, L, Zucali, M, Sandrucci, A, Brasca, M, Vanoni, L, Zanini, L & Tamburini, A. (2011). Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. *Journal of Dairy Research* 78: 211-219. Disponível em:  
<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/380>. Acesso em: 28 de abril de 2020.

Beloti, V, Ribeiro Jr, JC, Tamanini, R, Yamada, AK, Cavaletti, L, Shecaira, CL, Novaes, DG, Silva, FF, Giombelli, CJ, Mantovani, FB & Silva, MR. (2011). Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* 16(2). Disponível em:  
[http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/gvRfHOQjI5PmOHd\\_2013-6-25-16-55-49.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/gvRfHOQjI5PmOHd_2013-6-25-16-55-49.pdf). Acesso em: 28 de abril de 2020.

Bennett, JW & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 16:497-516.

Bozo, GA, Alegro, LCA, Silva, LC, Santana, EHW, Okano, W & Silva, LCC. (2013). 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* 65(2): 589-594. Disponível em:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352013000200040](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352013000200040).

Brasil. (2011). 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. Seção 1: 1-24.

Brasil. (2002). 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. Seção 1: 13.

Bueno, VFF, Mesquita, AJ, Nicolau, ES, Oliveira, AN, Oliveira, JP, Neves, RBS, Mansur, JRG & Thomaz, L. (2005). Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural* 3(4): 848-854.

Diniz, SPSS. (2002). *Micotoxinas*. Livraria e Editora Rural. 181p.

Freire, FCO, Vieira, IPG, Guedes, MIF & Mendes, FNP. (2007). Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. *Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical*. [http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc\\_110.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Dc_110.pdf)

Gonçalez, E, Felicio, JD, Pinto, MM, Rossi, MH, Nogueira, JHC & Manginelli, S. (2005). Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico* 72(4): 435-438.

Guerreiro, PK, Machado, MRF, Braga, GC, Gasparino, E & Franzener, ASM. (2005). Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. *Ciência e Agrotecnologia* 29(1): 216-222.

De Hoog, GS, Guarro, J, Gene, J & Figueras, M. (2000). Atlas of clinical fungi, 2nd ed. *Centraalbureau voor Schimmelcultures*, Utrecht, The Netherlands.

IBGE. (2014). Sidra – Banco de tabelas estatísticas do IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>.

IBGE. (2010). *Produção da Pecuária Municipal*, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro 38:1-65.

Khalidi, N, Seifuddin, FT, Turner, G, Haft, D, Nierman, WC, Wolfe, KH & Fedorova, ND. (2010). Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetic and Biology* 47(9): 736-741.

Kurtzman, CP & Fell, JW. (1998). *The yeasts: a taxonomic study*. 4. ed. [ S. I. ]: Elsevier.

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

Machado, PF, Pereira, AR & Silva, LFP. (2000). Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. *Scientia Agricola* 57(2): 359-361.

Molineri, AI, Signorini, ML, Cuatrín, AL, Canavesio, VR, Neder, VE, Russi, NB, Bonazza, JC & Calvino, LF. (2012). Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. *Revista Argentina de Microbiologia* 44:187-194.

Oliveira, CAF & Ferraz, JCO. (2007). Occurrence of aflatoxina M1 in pasteurized, UHT milk and milk powder from goat origin. *Food Control* 18: 375–378.

Oliveira, CAF, Sebastião, LS, Fagundes, H, Rosim, RE & Fernandes, AM. (2010). Determinação de aflatoxina B1 em rações e aflatoxina M1 no leite de propriedades do Estado de São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30 (1): 22-225.

Oliveira, MS. (2010). 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. [http://cascavel.ufsm.br/tede/tde\\_arquivos/22/TDE-2010-08-11T104646Z-2785/Publico/OLIVEIRA,%20MAURICIO%20SCHNEIDER.pdf](http://cascavel.ufsm.br/tede/tde_arquivos/22/TDE-2010-08-11T104646Z-2785/Publico/OLIVEIRA,%20MAURICIO%20SCHNEIDER.pdf)

Petrovski, KR, Trajcev, M & Buneski, G. (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *Journal of the South African Veterinary Association* 77: 52–60.

Pereira, AS, Shitsuka, DM, Parreira, FJ & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da Pesquisa Científica. [e-book]. Santa Maria: UAB/NTE/UFSM. Acessado: maio 2020. Disponível em: [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic\\_Computacao\\_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1).

Pereira, MMG, Carvalho, EP, Prado, G, Rosa, CAR, Veloso, T, Souza, LAF & Ribeiro, JMM. (2005). Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil. *Ciência Agrotecnologia* 29(1):106-112.

Pinto, CLO, Martins, ML & Vanetti, MCD. (2006). Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotóxicas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26(3): 645-51.

Prado, G, Oliveira, MS, Abrantes, FM, Santos, LG, Soares, CR & Veloso, T. (1999). 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* 19 (3): 420- 423.

Prado, G, Oliveira, MS, Pereira, ML, Abrantes, FM, Santos, LG & Veloso, T. (2000). Aflatoxin M1 in samples of “Minas” cheese commercialized in the city of Belo Horizonte – Minas Gerais/ Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 20(3): 398-400.

Prado, G, Oliveira, MS, Carvalho, EP, Veloso, T, Sousa, LAF & Cardoso, ACF. (2001). Aflatoxina M1 em queijo prato e parmesão determinada por coluna de imunoafinidade e cromatografia líquida. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 60(2):147-151.

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

Ribeiro Neto, AC, Barbosa, SBP, Jatobá, RB, Silva, AM, Silva, CX, Silva, MJA & Santoro, KR (2012). Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste.



*Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64(5): 1343-1351.

<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v64n5/v64n5a35.pdf>

Ritter, AC, Hoeltz, M & Noll, IB. (2011). Potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 31(3): 623-628.

Santos PA. (2008). 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*.

Santos, AL, Bando, E & Machinski Jr, M. (2014). Ocorrência de aflatoxina M1 em leite bovino comercializado no estado do Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias* 35(1): 371-4.

Sassahara, M, Netto, DP, Yanaka, EK. (2005). Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxina M1 in raw milk in the North of Paraná state. *Food and Chemical Toxicology* 43: 981-984.

Schulz, D, Bonelli, RR & Batista, CRV. (2005). Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. *Alimentos e Nutrição* 16(4): 403-411.

Silva, MAP, Santos, PA, Silva, JW, Leão, KM, Oliveira, AN & Nicolau, ES. (2010). Variação da qualidade do leite cru refrigerado em função do período do ano e do tipo de ordenha. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 69(1):112-118. <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/6553>

Simioni, FJ, Baretta, CRDM, Stefani, LM, Lopes, LS & Tizziani, T. (2013). Qualidade do leite proveniente de propriedades com diferentes níveis de especialização. *Revista Sêmima: Ciências Agrárias* 34(4): 1901-912.

Disponível em:<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/11733/pdf> .

Taffarel, LE, Cost, PB, Oliveira, NTE, Braga, GC & Zonin, WJ. (2013). Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento. *Arquivo Instituto Biológico* 80(1): 7-11.

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-16572013000100002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572013000100002)

Zanela, MB, Fischer, V, Ribeiro, MER, Stumpf Jr, W, Zanela, C, Marques, LT & Martins, PRZ. (2006). Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41(1): 153-159.

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Eduardo de Assis Lima – 30%

Rita de Cássia Campbell Machado Botteon – 30%

Francisco de Assis Baroni – 20%

Ana Carla Pinheiro Lima – 20%