MONICA RUZ-PERES

Avaliação da presença de fungos em amostras de leite cru e estudo da susceptibilidade destes microrganismos às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização e fervura

SÃO PAULO

2005

MONICA RUZ-PERES

Avaliação da presença de fungos em amostras de leite cru e estudo da susceptibilidade destes microrganismos às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização e fervura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicadas às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:
Epidemiologia Experimental e Aplicadas às Zoonoses

Orientadora:
Dra. Priscilla Anne Melville

São Paulo

2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
27/6/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1541
FMVZ

Ruz-Peres, Monica
Avalização da presença de fungos em amostras de leite cru e estudo da susceptibilidade destes microrganismos às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização e fervura. – São Paulo : M. Ruz-Peres, 2005.
92 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Dra. Priscilla Anne Melville.

1. Leite. 2. Pasteurização. 3. Fervura. 4. Levedura. 5. Fungo filamentoso. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da presença de fungos micelianos e leveduras em amostras de leite provenientes de tanques de refrigeração (tanques de expansão) de propriedades de exploração leiteira e estudo da susceptibilidade dos mesmos às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização", protocolo nº 187/2002, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/08/2002.

(We certify that the Research "Evaluation of the presence of moulds and yeasts in samples of milk from bulk tanks from dairy herds and study of their susceptibility to the ratios temperature/time used in pasteurization processes" protocol number 187/2002, under the responsability of Prof.Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commision of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 28/08/2002 meeting.)

São Paulo, 29 de agosto de 2002

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-900 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fone/Fax: (011) 3032-2224 / 3091-7671 / 3091-7676

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RUZ-PERES, Monica

Título: Avaliação da presença de fungos em amostras de leite cru e estudo da susceptibilidade destes microrganismos às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização e fervura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicadas às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Assinatura:_____Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

A todos os profissionais que de alguma forma, se dedicam ou se dedicaram aos estudos dos fungos.

Aos meus pais, João Manoel Ruz Peres e Therezinha Bordini Ruz que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me ajudando a realizar os sonhos mais difíceis.

Ao meu marido Alex Palermo Ramos pela cumplicidade, companheirismo, dedicação e amor.

A minha orientadora Priscilla Anne Melville e seu marido Nilson Roberti Benites, pela amizade, confiança e credibilidade.

E ao responsável pela minha paixão pelo mundo encantado dos fungos, Ary Elias Aboud Dutra.

“*A natureza não se entrega sem carícias. Ganhem-se os triunfos a preço da aplicação, porque do contrário não haverá vitória digna deste nome.*

O que distingue os homens entre si é a capacidade do esforço e da tenacidade”.

MIGUEL COUTO (1865-1934)

AGRADECIMENTOS

Em cada uma dessas pessoas é possível ver uma parte deste estudo.

Adauto Luis Veloso Nunes, Adriana Araújo Reis Menezes, Ana Renata Volpini Litfalla, Andrea Broch, Andrezza Kyunmi Kim, Anna Catharina M.D.G. von Sydow, Antonia Ruz Peres, Carlos Eduardo Meneghel, Clarisse Yukari Minagawa, Daniel de Almeida Pires, Daniela Pontes Chiebao, Danielle Passarelli, Denise Cristina Curi Spadella, Eugênio Yokoya, Família Palermo Ramos, Felício Garino Júnior, Fernanda Marvulo, Francine Holtz Santos, Giovanna Letícia Hernández Arriagada, Gisele Simões Pires, Kléber Santos Patrício, Luís Ivan Martinhão Souto, Jennifer Anne Coggan, Josana Kapronezai, Juliana Kataguiri, Letícia Matsuda, Lindiane Henríquez, Luciana Scanavini, Marcio Augusto Garbuglio, Mariana Martins, Mauro Cintra Giudice, Mirian Lippolis, Priscila Pontremolez, Profª Drª Claudete Rodrigues Paula, Profª Drª. Marinete Amorim, Prof. Dr. Nicolau Maués Serra-Freire, Prof. Dr. Walderez Gambale, Valquiria Regina Alcântara Santos, Renata Tomitake,

Rita Ruz Peres Masquieto, Robson Piagentini, Shirley A. Vieira Marques, Silvio Carlos Alves Moura, Simone Angélica Salzgeber, Simone da Cruz Cantarino, Simone May, Sonia Tatsumi Sakata, Tatiana Fadel, Teresinha Ruz Peres, Valentina Pigozzi, Vânia Paula.

RESUMO

RUZ-PERES, M. **Avaliação da presença de fungos em amostras de leite cru e estudo da susceptibilidade destes microrganismos às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização e fervura. Estudo experimental.** [Evaluation of the presence of fungi in samples of raw milk and study of the susceptibility of these microorganisms to the temperature/time rates employed in pasteurization and boiling processes]. 2005. 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

O presente trabalho foi delineado considerando-se a importância de fungos filamentosos e leveduras, os quais estão associados a diversas patologias no homem e animais. Deve-se considerar ainda que o leite e seus derivados lácteos contaminados com estes microrganismos podem constituir potenciais vias de transmissão de zoonoses a eles relacionados. Foram analisadas amostras de leite cru dos tipos A, B e C colhidas nas próprias propriedades leiteiras, bem como amostras de leite comercializado diretamente ao consumidor, visando-se a comparação da qualidade destes produtos quanto à presença e quantidade de fungos. Procedeu-se ainda à avaliação da susceptibilidade dos fungos isolados das amostras de leite às relações temperatura/tempo empregados nos processos de pasteurização e avaliação da sensibilidade destes isolados à fervura do leite. Foram analisadas 70 amostras de leite, sendo 50 de tanques de refrigeração de propriedades leiteiras, 10 de latões de propriedades de exploração leiteira e 10 de latões de transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino, sendo que não houve diferença estatisticamente significante entre as medianas das quantidades de unidades formadoras de colônias de fungos/mL de

Leite das diferentes procedências, indicando que o nível de contaminação por fungos nas amostras destas três origens foi similar. Foram isolados, em diferentes percentagens, fungos filamentosos e leveduras de todas as amostras de leite das diferentes procedências: *Candida* spp. (*C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis, C. kefyr,* dentre outras), *Geotrichum* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp., *Aureobasidium* sp., *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Chrysosporium* sp., *Mucor* spp., *Aspergillus* spp. Todos os gêneros e espécies isoladas foram submetidos aos testes de pasteurização rápida e lenta, bem como a fervura. O processo de pasteurização rápida foi o procedimento no qual houve maior resistência (72,18%) por parte dos isolados de leveduras e fungos filamentosos submetidos ao teste na metodologia aplicada, seguido pelo processo de fervura (15,89%) e o de pasteurização lenta (0,99%).

Palavras-chave: Leite. Pasteurização. Fervura. Levedura. Fungo filamentoso.

ABSTRACT

RUZ-PERES, M**. Evaluation of the presence of fungi in samples of raw milk and study of the susceptibility of these microorganisms to the temperature/time rates employed in pasteurization and boiling processes.** [Avaliação da presença de fungos em amostras de leite cru e estudo da susceptibilidade destes microrganismos às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização e fervura]. 2005.92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina.veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The present study was outlined considering the importance of filamentous fungi and yeasts, associated to various pathologies in man and animals. It must be considered that milk and dairy products when contaminated with these microorganisms can represent a potential means of zoonosis transmission related to them. Samples of raw milk types A, B and C, collected in dairy farms, as well as milk sold directly to the consumer, were analysed, aiming the comparison of the quality of these products as to the presence and quantity of fungi. The susceptibility of the isolates to the temperature/time rates employed in pasteurization and boiling was also evaluated. Seventy samples of raw milk were analysed, 50 from bulk tanks, 10 from small tanks of milk from dairy farms, and 10 from transportation tanks and distributors that store and sell clandestine milk. No statistically significant difference was observed between medians of the quantity of colonies forming units of fungi/mL of milk from the different sources, indicating that the level of contamination by fungi was similar when the three sources were compared. Filamentous fungi and yeasts were isolated in different percentages from all the samples from the different sources: *Candida* spp. (*C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis, C. kefyr,* etc.), *Geotrichum* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp., *Aureobasidium* sp., *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Chrysosporium* sp., *Mucor* spp., *Aspergillus* spp. All isolates were submitted to pasteurization and boiling. Quick pasteurization was the procedure in which the highest resistance (72.18%) of the isolates was verified, followed by boiling (15.89%) and slow pasteurization (0.99%).

Key words: Milk. Pasteurization. Boiling. Yeast. Filamentous fungi.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Constituintes de meio de cultura Agar niger 40

Quadro 2 - Constituintes do meio de cultura Agar Pagano –Levine.....42

Quadro 3 - Contagens de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) e identificação de fungos (fungos filamentosos e leveduras) de leite colhido de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C - Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004 51

Quadro 4- Contagens de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) e identificação de fungos (fungos filamentosos e leveduras) de leite colhido de latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C – Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004. 54

Quadro 5- Contagens de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) e identificação de fungos (fungos filamentosos e leveduras) em leite colhido de latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino – Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004. 55

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1- Placa de Petri contendo colônias de fungos crescidas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol 42

Fotografia 2- Placa de Petri contendo colônias de fungos crescidas em ágar Pagano-Levine 43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição das quantidades de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) de fungos em amostras de leite obtidas de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C – Pirassununga, Campinas e Itu, 2003/2004. 53

Gráfico 2 - Distribuição das quantidades de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) de fungos nas amostras de leite obtidas em latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C – Pirassununga, Campinas e Itu, 2003/2004 54

Gráfico 3 - Distribuição das quantidades de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) em amostras de leite obtidas e latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino – Pirassununga, Campinas e Itu, 2003/2004 56

Gráfico 4 - Medianas das quantidades de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) de fungos em amostras de leite obtidas de tanques de refrigeração, latões de propriedades produtoras de leite e latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino –Pirassununga, Campinas e Itu, 2003/2004 56

Gráfico 5 - Percentagens de resistência ao processo de pasteurização rápida apresentadas pelos fungos isolados de amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10

latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino. 60

Gráfico 6- Percentagens de resistência ao processo de pasteurização lenta apresentadas pelos fungos isolados de amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10 latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino. 61

Gráfico 7- Percentagens de resistência ao processo de fervura apresentadas pelos fungos isolados de amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10 latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino. 62

Gráfico 8- Comparação dos resultados referentes às percentagens dos fungos aos processos de pasteulização rápida, lenta e fervura. 62

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 41

Fluxograma 2. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Freqüências de isolamentos de leveduras e fungos filamentosos em amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10 latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino – Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004. 57

Tabela 2- Freqüências de resistência (em número absoluto e porcentagem) aos processos de pasteurização rápida, lenta e fervura, apresentadas pelos isolados de leveduras (N=275) e fungos filamentosos (N=27) isolados de amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10 latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino – Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004. 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMT	California Mastitis Test
et al	e outros
g	grama
h	hora
mcL	microlitro
mcg	micrograma
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milimetro
p	página
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	potencial de hidrogênio
PO	puro de origem
C.P.P	contagem padrão em placa
seg	segundo
sp	espécie
spp	espécies
U.F.C	unidades formadoras de colônias

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
≤	menor ou igual
=	igual
°C	graus Celsius
/	“por” ou “e”
<	menor
nº	número
KH_2PO_4	Nitrato de potássio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO. 23

2 OBJETIVOS. 36

3 MATERIAL E MÉTODOS. 38

3.1 Isolamento, contagem de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) e identificação de fungos filamentosos e leveduras a partir de amostras de leite, colhidas de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C, bem como amostras de leite oriundas de latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e amostras de leite de latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino. 38

3.2 Avaliação da susceptibilidade de fungos filamentosos e leveduras, isolados das amostras de leite analisadas no ítem 3.1., às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização permitidos para uso no Brasil e avaliação da sensibilidade dos isolados à fervura do leite. 43

3.3 Estatística. 47

4 RESULTADOS. 49

4.1 Isolamento, contagem de unidades formadoras de colônias e identificação de fungos filamentosos e leveduras a partir de amostras de leite, colhidas de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C, bem como amostras de leite oriundas de latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e amostras de leite de latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino. 49

4.2 Avaliação da susceptibilidade de fungos filamentosos e leveduras, isolados das amostras de leite analisadas no ítem 4.1., às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização permitidos para uso no Brasil e avaliação da sensibilidade destes isolados à fervura do leite. 58

5 DISCUSSÃO. 65

6 CONCLUSÕES. 81

REFERÊNCIAS. 83

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos comuns na natureza, estando presentes em ambientes aquáticos, terrestres e no ar. O desenvolvimento destes microrganismos pode determinar doenças infecciosas ou tóxicas, em vegetais e animais, incluindo o homem. A simples presença do fungo não é fator determinante de doença, a qual depende da relação parasita / hospedeiro (LACAZ et al., 1998).

Os fungos são microrganismos ubíquos, encontrando-se em vegetais, animais, no homem, em detritos e em abundância no solo. A sua dispersão é realizada pelos animais, homem, insetos, água e, principalmente, pelo ar atmosférico, através dos ventos (TRABULSI et al., 1999). São seres eucarióticos, com um só núcleo, como as leveduras ou multinucleados, como os filamentosos ou bolores. São heterótrofos e nutrem-se de matéria orgânica em decomposição (fungos saprófitas) ou viva (fungos parasitários) (TRABULSI et al., 1999). Os fungos saprófitas geralmente não são patogênicos, mas podem atuar como patógenos oportunistas ou seja, quando o hospedeiro apresenta algum tipo de debilitação, esses organismos podem multiplicar-se e causar doenças, muitas vezes com conseqüências fatais (KERN; BLEVIS, 1999). Alguns estudos têm demonstrado que os fungos patogênicos secretam várias enzimas hidrolíticas como proteinases, lipases e fosfolipases, que agem sob o substrato. Estas enzimas hidrolíticas extracelulares são importantes na virulência dos fungos, causando danos a célula do hospedeiro (TRABULSI et al., 1999).

As infecções fúngicas tem sido cada vez mais freqüentes, diante de certas condições ou oportunidades que o hospedeiro lhe oferece. Determinados

fungos podem expressar sua virulência, tornando-se patogênicos, particularmente em situações como: diabetes, leucemias, linfomas, neoplasias diversas, terapias prolongadas por antibióticos e/ou cortisonas (LACAZ, 1973).

Os reservatórios habituais dos fungos que infectam o homem e o animal podem ser o próprio homem e o animal, ou um sítio da natureza, onde o fungo se desenvolve como saprófita. As micoses são classificadas como: micoses superficiais - localizam-se nas camadas mais superficiais da pele ou dos pelos e desencadeiam uma resposta inflamatória - micoses cutâneas - localizam-se na pele, pelo ou unhas e mucosas em maior extensão - micoses subcutâneas - encontradas na pele e tecidos subcutâneos - e micoses sistêmicas - que atingem os órgãos internos e vísceras, podendo abranger muitos tecidos e órgãos diferentes (TRABULSI et al., 1999). Dentre as manifestações clínicas em animais associadas aos fungos pode-se citar as mastites micóticas.

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária que promove perdas econômicas decorrentes da redução da produção de leite (em até 70 %), gastos com medicamentos e assistência veterinária (8 %), descarte de animais (14 %) e de leite contaminado após tratamento (8 %) (PHILPOT, 1984). Dentre as causas de mastite, a de natureza infecciosa é a que apresenta maior ocorrência, e resulta principalmente da penetração de microrganismos através do canal do teto (COSTA, 1998; SCHALM et al., 1971)

Os microrganismos causadores de mastite foram convencionalmente classificados quanto à sua origem e modo de transmissão em dois grupos: **microrganismos contagiosos ou transmissíveis**, transmitidos principalmente durante a ordenha, sendo denominados “vaca-dependentes”, presentes no corpo do animal com ou sem mastite; e os chamados **microrganismos ambientais,**

ubiqüitários, presentes no ar, água, cama e fezes (CRUZ, 1985). No primeiro grupo estão incluídos: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis, Staphylococcus aureus* e outros estafilococos, dentre outros. Desta forma, a presença de microrganismos contagiosos em amostras de leite oriundas do tanque de refrigeração constitui um forte indicador de ocorrência de infecção intramamária por estes agentes em animais do rebanho (GODKIN; LESLIE, 1993). No segundo grupo encontram-se: *Streptococcus uberis* e outros estreptococos, à exceção dos anteriormente citados, bactérias da família Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., entre outros), fungos filamentosos e leveduras, algas do gênero *Prototheca*, *Arcanobacterium pyogenes,* entre outros (REBHUN, 1995). A presença destes agentes no leite do tanque de refrigeração pode estar relacionada ao nível de higiene da ordenha e do ambiente, já tendo sido comprovada que a sua presença no leite independe da ocorrência de mastite (COUSINS; BRAMLEY, 1981).

Segundo Langoni et al. (1997) a mastite bovina é considerada como a maior causa de prejuízos à criação de gado leiteiro, tendo em vista as perdas proporcionadas pela queda na produção, qualidade do leite e gastos com tratamento, e os fungos, embora menos estudados, são também agentes importantes na mastite bovina, desempenhando papel de relevância.

Os principais microrganismos envolvidos nas mastites micóticas são: *Cryptococcus* spp.*, Rhodotorula* spp.*, Aspergillus* spp.*, Pichia* spp.*, Candida krusei, Candida tropicalis, Candida albicans, Trichosporon cutaneum* entre outros. A contaminação dos equipamentos da ordenha por estes microrganismos pode levar à ocorrência de infecções em um grande número de animais, embora normalmente os casos de mastite micótica ocorram de maneira isolada. Os fungos podem estar

presentes como contaminantes de medicamentos, diluentes de antibióticos, na água de lavagem dos equipamentos de ordenha ou ainda, nas mãos do ordenhador (CRUZ, 1985).

Yeo e Choi (1982) revelaram que o gênero *Candida* foi o agente leveduriforme mais freqüente tendo sido isolado em 64 quartos mamários de 55 vacas examinadas. Outros autores também apontaram o gênero como principal agente de mastite de origem fúngica (FERREIRO et al., 1985; HOFFMAN et al., 1965; SHARMA et al., 1977). Langoni et al. (1997) analisaram 8752 amostras de leite bovino, tendo isolado *Candida albicans* em 3,6 % das mastites subclínicas e em 4,03 % das mastites clínicas.

A influência dos fatores predisponentes na taxa de infecção intramamária, não é bem esclarecida. Relatou-se que determinadas leveduras como *Candida* spp., ocorrem como agentes de mastite mais freqüentemente em animais submetidos a estresse, que apresentam imunossupressão ou tratados com antibioticoterapia prolongada (KIRK; BARTLETT, 1986).

A incidência de mastites micóticas em bovinos vem aumentando nos últimos anos, coincidindo com a maior utilização de antibióticos para o combate às mastites bacterianas. Eliminadas as bactérias, o fungo torna-se livre do competidor e invade o tecido lesado do úbere. Clinicamente estas mastites são semelhantes às mastites bacterianas, sendo a sintomatologia variável, podendo acometer um ou mais quartos mamários. O desenvolvimento do processo infeccioso, em muitos casos, é gradual, com os linfonodos supramamários e ilíacos tornando-se enfartados, ocorrendo edema no úbere e na região do períneo. Com estas intercorrências a produção de leite diminui de maneira drástica. Para exame laboratorial o leite colhido apresenta características variáveis, de acordo com o agente etiológico e com o estágio da

infecção, podendo apresentar-se de cor cinza ou amarelada, com uma consistência mucilaginosa na mastite criptocócica (CRUZ, 1985).

Robinson (1989) estudou alguns aspectos envolvidos na obtenção do leite, tais como a contaminação do mesmo e de equipamentos por microrganismos. Segundo este autor a contaminação microbiana pode tornar-se estável, caso as condições sejam convenientes, ou serem contaminações transitórias, caso as condições de estabilidade não sejam apropriadas. O ar, como uma das fontes de microrganismos, não é considerado tão importante para o leite, mas a água utilizada durante a ordenha, sim, devendo ser potável, pois torna-se a garantia de que não houve contato com roedores, pássaros e insetos. Quando as vacas são ordenhadas manualmente, a ação do ordenhador contribui para a contaminação, deslocando os agentes contaminantes do meio ambiente para o úbere e até mesmo para o leite. O armazenamento do leite pode ser feito em latões ou em tanques mantidos sob refrigeração, enquanto aguardam a coleta e a subseqüente entrega. Nos latões de entrega, quando o leite fica exposto à temperatura acima dos 25ºC por mais de 6 horas, ocorre uma rápida multiplicação de microrganismos, o que pode acarretar alterações no produto. Já nos tanques de refrigeração, o leite é normalmente mantido refrigerado logo após a ordenha. A coleta do leite pelos caminhões tanque pode ser feita diariamente ou a cada três dias. Este procedimento pode aumentar o risco de contaminação do produto devido à mistura dos leites colhidos em diferentes dias dentro dos tanques.

As medidas higiênico-sanitárias quando não são conduzidas adequadamente ou satisfatoriamente podem facilitar a contaminação do leite por microrganismos indesejáveis, podendo causar alterações físico-químicas no produto,

limitando sua durabilidade e de seus derivados, além de determinar problemas econômicos e de saúde pública (ANDRADE, 2001).

Gostovic e Prusac (1996) avaliaram a influência da higiene dos tanques de leite utilizados como transporte na qualidade do produto. Foram feitas coletas com *swabs* das paredes do tanque e, entre todos os examinados, a metade foi considerada inaceitável por conter altos níveis de microrganismos, sendo que os mais frequentemente isolados foram *Citrobacter* spp.*, Streptococcus* spp.*, Bacillus* spp.*, Lactobacillus* spp. e leveduras. Estes autores concluiram que a contaminação do leite tinha relação com a falta de higiene dos úberes e mãos dos ordenhadores.

Os microrganismos presentes em amostras de leite provenientes do tanque de refrigeração podem ter origem a partir de úberes infectados (acometidos por mastite infecciosa), da superfície dos úberes e/ou dos tetos ou do equipamento de ordenha (COUSINS; BRAMLEY, 1981; GODKIN; LESLIE, 1993).

Kim (1995) estudou a contaminação do leite cru em fazendas, onde foi avaliada a presença de leveduras e fungos filamentosos em amostras de ar, sobras de leite, pelos das vacas, úberes, ordenhadeiras, alimentos, água, mãos dos ordenhadores e no próprio leite, tanto antes como depois da lavagem e anti-sepsia dos úberes e mãos. A média da contagem de leveduras e fungos filamentosos no leite cru antes da lavagem e anti-sepsia foi maior do que após estes procedimentos.

Quando consideradas as principais fontes nutritivas para o homem, deve-se salientar a importância do leite e seus derivados. O valor nutricional do leite reside na qualidade de suas proteínas, na sua riqueza em minerais, vitaminas lipo e hidrossolúveis, na elevada digestibilidade de suas gorduras, carboidratos e proteínas, todos estes, elementos fundamentais para a saúde humana (RUSSOFF, 1955, 1970).

Por ser um alimento altamente nutritivo, também é um meio propício ao desenvolvimento de bactérias e fungos exigindo, portanto, cuidados em todas as etapas de produção, desde o tratamento do animal e os cuidados com a ordenha até o armazenamento e a produção de seus derivados. A presença de microrganismos, muitos dos quais agentes de zoonoses, e/ou presença de suas toxinas no leite, constituem fatores que comprometem a sua qualidade. Assim sendo, o leite bem como os derivados lácteos contaminados com microrganismos como *Mycobacterium* spp., *Brucella* spp., *Prototheca* spp., *Escherichia coli, Salmonella* spp., fungos filamentosos e leveduras, entre outros, podem apresentar-se como vias de transmissão destas zoonoses (BADINI, 1995; COSTA et al*.,* 1998*;* MELVILLE et al*.,* 1999).

Com o advento da pasteurização, reduziram-se os relatos de ocorrência de doenças veiculadas pelo leite e seus derivados. Entretanto, torna-se importante atentar para o risco que constitui a presença destes agentes no leite, principalmente considerando-se que, em diversas localidades do Brasil é comum o hábito do consumo de leite e produtos lácteos crus.

O leite cru pode ser consumido imediatamente após a ordenha ou proveniente de tanques de refrigeração presentes em propriedades de exploração leiteira isto é, tanques que armazenam a totalidade do leite obtido do conjunto das vacas em lactação após um ou mais períodos de ordenha. O leite cru muitas vezes é comercializado nas periferias das cidades, constituindo o chamado “leite informal ou clandestino”, não submetido a qualquer tipo de tratamento para redução de sua carga microbiana e eliminação dos principais patógenos.

Segundo Queiroz (1995), embora exista a proibição legal imposta à comercialização do leite cru no Brasil (Lei n 1.283 de 18/12/1950 e Decreto número

30.691 de 29/03/1952), a venda deste tipo de leite tem sido amplamente realizada na periferia da cidade de São Paulo, e em diversas cidades do interior, muitas das quais com elevado nível socioeconômico e cultural. Em Minas Gerais, estima-se que 47% do leite consumido pela população seja proveniente da comercialização clandestina do leite cru (BRANDÃO, 1994).

Na Comunidade Européia, as políticas que estabelecem as diretrizes para o comércio de leite “in natura” variam consideravelmente entre os países sendo que, na maioria, este comércio é oficialmente proibido. A Inglaterra é uma das exceções, não havendo normas que proíbam o comércio deste tipo de produto, sendo que a inspeção é realizada na propriedade de origem, através do controle da qualidade do leite nos tanques de refrigeração e do monitoramento periódico da sanidade do rebanho. Em 1997 foi realizada uma pesquisa neste país, onde foram analisadas 1097 amostras de leite cru comercializadas legalmente, oriundas de 242 estabelecimentos comerciais, tendo-se verificado que 41 amostras de 21 pontos de venda estavam contaminadas com microrganismos potencialmente patogênicos. Nesta mesma pesquisa observou-se também que a frequência de doença relacionados ao consumo de leite “in natura” é maior nos países onde sua comercialização é permitida, demonstrando que apenas a avaliação da qualidade higiênica do leite e o monitoramento sanitário do rebanho não constituem garantia da segurança alimentar do produto final (FONSECA; SANTOS, 2000).

O leite, quando ordenhado de vacas sadias e em boas condições de higiene, é um líquido de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado. A composição química do leite determina o seu sabor e aroma, podendo ser modificados por ação de agentes externos, como absorção de odores estranhos, decomposição química e ação de microrganismos (BEHMER, 1991).

A quantidade e as espécies de microrganismos presentes no leite cru imediatamente após a ordenha reflete diretamente a contaminação microbiana ocorrida durante a produção. Quando o leite deixa a fazenda, a sua microbiota é determinada pela relação tempo/temperatura na qual ele foi mantido e estocado. Quando o leite é mantido a ≤ 4ºC, previne-se a multiplicação bacteriana por 24h (ROBINSON, 1989).

Considerando-se o leite um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos, ele deve ser resfriado logo após a ordenha e consumido em até 24 horas. A temperatura constitui um dos principais parâmetros responsáveis pelo controle do crescimento e da velocidade de multiplicação microbiana. A temperatura exerce ação seletiva sobre os microrganismos do alimento, retardando o seu crescimento se for suficientemente baixa. Para se manter a qualidade do leite após a ordenha, deve-se tomar uma série de cuidados, como proceder a pasteurização, por exemplo (BEHMER, 1991).

Segundo Alterthum e Carvalhal (1999, p.75)

> O método mais empregado para matar microrganismos é o calor, por ser eficaz, barato e prático. Do ponto de vista microbiológico, os microrganismos são considerados mortos quando perdem, de forma irreversível, a capacidade de se multiplicar.

De acordo com Behmer (1991), as fases para o tratamento do leite após a ordenha são:

· **Filtração**: tem como finalidade eliminar as impurezas grosseiras, que eventualmente possam cair no leite.

· **Resfriamento**: o leite ordenhado possui a temperatura do animal, ou seja, aproximadamente 35°C, temperatura ideal para que grande parte dos

microrganismos possa se multiplicar. A função do resfriamento até 4ºC é retardar a multiplicação microbiana, prolongando o tempo de vida do produto. O leite cru resfriado não deve ser armazenado por mais de 24 horas, pois existem microrganismos que se desenvolvem em baixas temperaturas.

· **Tratamento Térmico**: os mais utilizados são a fervura e a pasteurização

Louis Pasteur, em 1864, desenvolveu um método de prevenção da perda da qualidade dos vinhos, destruindo pelo calor bactérias capazes de deteriorar esta bebida. Tal método, posteriormente aplicado ao tratamento do leite para eliminar possíveis patógenos veiculados por este alimento recebeu o nome de pasteurização. Consiste em aquecer o produto a uma dada temperatura, num dado tempo, e em seguida resfriar bruscamente. A pasteurização que pode ser empregada a 63°C por 30 minutos ou a 72°C por 15 segundos, reduz o número de microrganismos presentes, mas não assegura a esterilização, daí a necessidade de manter o leite em baixas temperaturas (efeito microbiostático) (ALTERTHUM; CARVALHAL, 1999).

Foram desenvolvidos sistemas de tratamento térmico do leite visando a redução da carga microbiana e eliminação de agentes potencialmente nocivos ao homem. O principal processo atualmente utilizado é a pasteurização que, segundo o artigo nº 517 do Regulamento de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1980), consiste na aplicação do calor visando a total destruição da flora microbiana patogênica, sem promover alteração sensível da constituição física e química do leite.

No Brasil podem ser empregadas a pasteurização de curta duração, que consiste no aquecimento do leite a 72-75ºC por 15 a 20 segundos, e pasteurização lenta, a qual consiste no aquecimento do leite a 62-65ºC por 30 minutos. Imediatamente após o aquecimento em ambos procedimentos o leite deve

ser refrigerado entre 2 e 5 °C (BRASIL, 1980). A pasteurização destrói as bactérias patogênicas, eventualmente transmissíveis pelo leite e reduz o número de todos os microrganismos presentes (ALTERTHUM; CARVALHAL, 1999).

Pode-se empregar ainda a fervura como tratamento térmico, a qual promove redução da quantidade de microrganismos presentes no leite, embora provoque alterações em sua constituição físico-química. Este procedimento é realizado por até 15 minutos, e destrói todas as formas vegetativas de patógenos, muitos vírus, fungos, embora não seja eficaz para todos os endósporos (ALTERTHUM; CARVALHAL, 1999).

Em cidades do interior de São Paulo, e mesmo nas periferias das grandes cidades ou em locais de difícil acesso ao produto fiscalizado pela inspeção sanitária, existe um hábito comum da ingestão de produtos adquiridos diretamente do produtor, como ovos e frangos caipiras, frutas, verduras e legumes, queijo fresco, leite cru, etc., alimentos que são produzidos pelos próprios proprietários, envolvendo um número muito pequeno de funcionários, geralmente sem experiência técnica que, com o passar dos anos, não acompanharam o desenvolvimento tecnológico, como a pasteurização no caso do leite, por exemplo. Assim sendo, deve-se atentar para a presença neste alimento de microrganismos, dentre os quais os fungos filamentosos e leveduras no leite, o que pode representar potencial risco à saúde humana. Procurar-se-á, desta forma, ampliar o conhecimento em relação a estes microrganismos presentes no leite cru que consiste num produto bastante consumido pela população.

Deve-se considerar ainda a inexistência de dados referentes à susceptibilidade de fungos filamentosos e leveduras às temperaturas habitualmente empregadas nos procedimentos de tratamento térmico do leite, não se conhecendo,

portanto, se estas metodologias exercem efeito sobre a viabilidade destes microrganismos, cujo potencial patogênico, nestas condições, ainda é desconhecido.

O presente trabalho foi delineado considerando-se a importância e relevância deste grupo de microrganismos, fungos filamentosos e leveduras, tendo em vista sua participação como agentes de importantes patologias muitas das quais com caráter zoonótico. Deve-se considerar ainda que o leite e seus derivados contaminados com estes microrganismos podem constituir potenciais vias de transmissão de zoonoses a eles relacionados. Neste trabalho pretende-se analisar amostras de leite cru dos tipos A, B e C colhidas nas próprias propriedades leiteiras, bem como amostras de leite comercializado diretamente ao consumidor, visando-se a comparação da qualidade destes produtos quanto à presença de fungos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- Isolamento, contagem de unidades formadoras de colônias (U.F.C.) de fungos filamentosos e leveduras e identificação de fungos filamentosos e leveduras, a partir de amostras de leite, colhidas de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C, bem como amostras de leite oriundas de latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e amostras de leite de latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino;

- Avaliação da susceptibilidade de fungos filamentosos e leveduras, isolados das amostras de leite analisadas no ítem anterior, às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização permitidos para uso no Brasil e também avaliar a sensibilidade destes isolados à fervura do leite.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

As propriedades envolvidas nesta investigação localizam-se essencialmente nas regiões de Campinas, Itu e Pirassununga, São Paulo, Brasil. Foram avaliadas amostras de leite oriundas de 50 tanques de refrigeração que armazenam leite de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C cujo destino final é o processamento em estabelecimento industrial. Foram colhidas ainda amostras de leite de 10 propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C as quais armazenam o leite em latões (vasilhames com 50 litros de capacidade) e que participam efetivamente do mercado de leite "informal" ou "clandestino". O leite em questão, produzido em todas estas propriedades tem como destino final o consumo "in natura" e a elaboração de derivados a partir do leite cru.

Além das amostras de leite obtidas diretamente das propriedades, também foram examinadas amostras provenientes de 10 latões de transportadores e distribuidores (automóveis do tipo perua) que armazenam e comercializam direto ao consumidor o leite cru obtido das propriedades produtoras de leite tipo C.

3.1 Isolamento, contagem de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) e identificação de fungos filamentosos e leveduras a partir de amostras de leite, colhidas de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C, bem como amostras de leite oriundas de latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e amostras de leite de

latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino

No presente estudo cada amostra de leite (volume de aproximadamente 100 mL) foi colhida em frasco de vidro estéril e transportada sob refrigeração (2 a 8ºC) ao laboratório onde foram preparadas diluições seriadas da mesma em solução salina (0,85 %) estéril.

A partir de cada diluição foi colhida uma alíquota de 0,1 mL para cultivo (utilizando-se a técnica de *spread plate* ou, espalhamento em superfície) em ágar Sabouraud-dextrose[1] com cloranfenicol[2] (100 mg/L)(Fotografia 1) e ágar batata-dextrose[1] PDA, com pH=3,5 acidificado com solução estéril de com ácido tartárico a 10% (ARAÚJO et al., 2001).

Para a determinação de *Cryptococcus neoformans* o meio de cultura seletivo utilizado foi o ágar Niger (LARONE, 1995), cujos componentes estão relacionados no quadro 1. Para identificação das espécies de *Candida* o meio seletivo e diferencial utilizado foi o ágar Pagano-Levine (CRUZ, 1985) (Fotografia 2), cujos componentes estão relacionados no quadro 2. Todos estes meios foram incubados a 25°C em estufa microbiológica, por um período mínimo de sete dias, visando o isolamento, identificação e contagem de unidades formadoras de colônias de fungos filamentosos e leveduras/mL (Fluxograma 1).

---

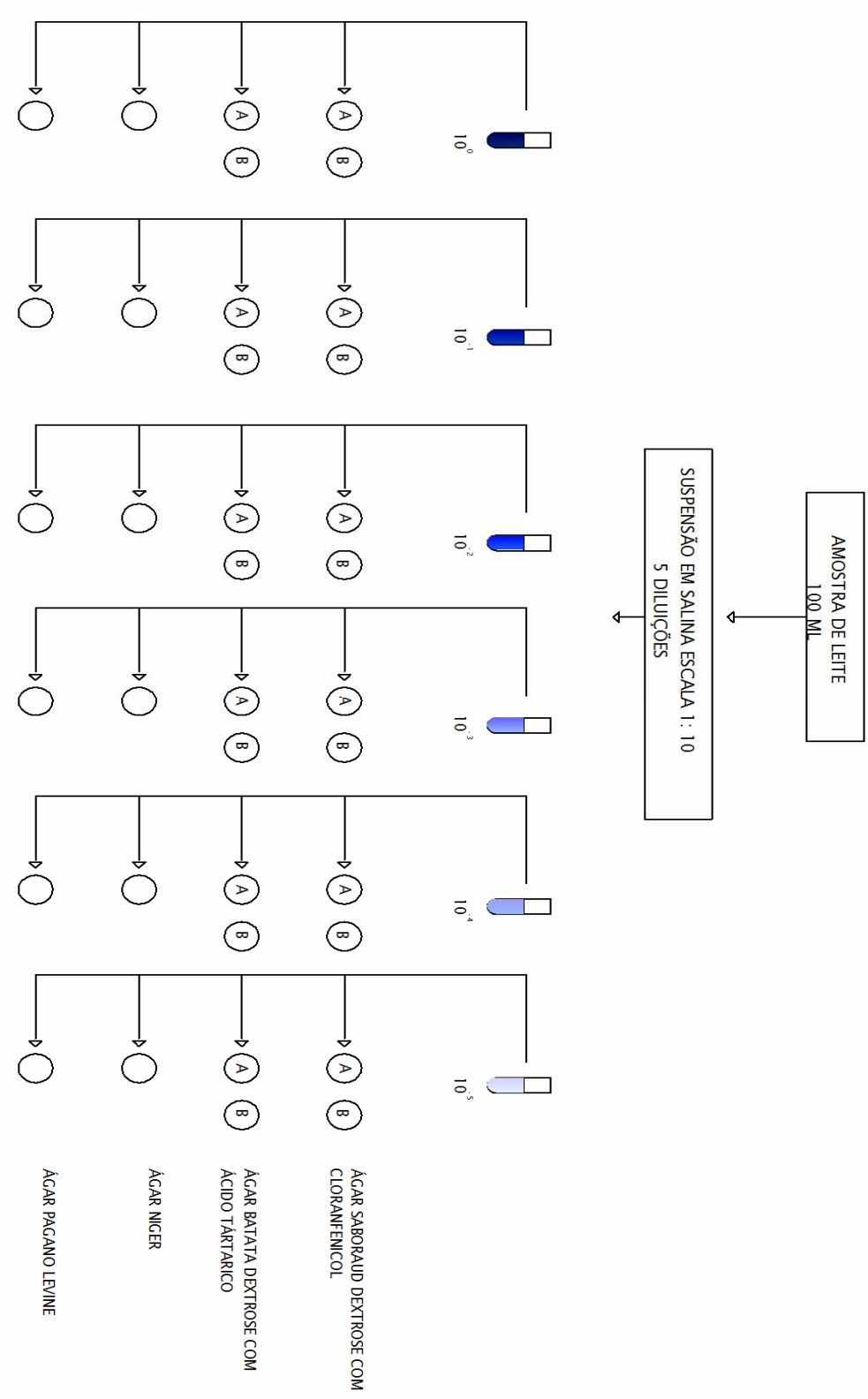
[1] Sabouraud-dextrose agar ou Potato-dextrose agar – Oxoid – Hampshire – U.K.
[2] Quemicetina – Farmitália – Carlo Erba - Brasil

Composição	Dosagem
Sementes de Niger	50 mg
Água destilada	100 mL
KH2PO4	1 g
Dextrose	1 g
Creatinina	1 g
Agar	15 g
Cloranfenicol	1 g

Fonte: LARONE (1995)

Quadro 1- Constituintes do meio de cultura ágar Niger

Fluxograma 1



Composição	Dosagem
Peptona	10 g
Extrato de levedura	1 g
Glicose	40 g
Agar	30 g
Água destilada	1000 mL
2,3,5 Trifeniltetrazólio	100 mcg
Cloranfenicol	500 mcg

Fonte: CRUZ (1985)

Quadro 2- Constituintes do meio de cultura Ágar Pagano-Levine

Fotografia 1- Placa de Petri contendo colônias de fungos crescidas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol

Fotografia 2- Placa de Petri contendo colônias de fungos crescidas em ágar Pagano-Levine, onde tem-se colônias de *C. albicans* com coloração creme à rosa claro, *C. guilliermondii* com coloração vermelho forte, *C. krusei* com coloração branca, *C. tropicalis* com coloração vermelho forte

As leveduras foram identificadas de acordo com Lodder (1970) e Kreger-van-Rij (1984) e os fungos filamentosos foram identificados de acordo com a chave de Barnet e Hunter (1972), e Von Arx (1974), utilizando-se a descrição das características macroscópicas e microscópicas.

3.2 Avaliação da susceptibilidade de fungos filamentosos e leveduras, isolados das amostras de leite analisadas no ítem 3.1, às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização permitidos para uso no Brasil e avaliação da sensibilidade dos isolados à fervura do leite

Os testes foram realizados com base na metodologia descrita por Melville et al. (1999), adaptada para fungos filamentosos e leveduras.

Foram utilizados cultivos recentes de fungos filamentosos e leveduras em ágar Sabouraud-dextrose, isolados a partir das amostras do ítem 3.1.

Inicialmente, foi obtida uma suspensão celular de cada um dos isolados de fungos filamentosos e leveduras em 5 mL de solução salina (0,85%) estéril, ajustada a uma turbidez equivalente ao tubo número 3 da escala de McFarland. A seguir, uma alíquota de 2 mL da suspensão do microrganismo foi transferida para um tubo de vidro estéril (18 x 180 mm) contendo 18 mL de leite integral esterilizado obtendo-se assim uma diluição da ordem de 10^{-1} (correspondente à solução mãe/controle). O conteúdo desta foi homogeneizado e então distribuído em volumes de 1 mL em 15 tubos de vidro estéreis (13 x 90 mm). Cinco tubos foram utilizados para o teste de pasteurização rápida, cinco tubos para o teste de pasteurização lenta e cinco tubos para o teste de fervura. O restante da solução mãe/controle, foi mantido no tubo original da diluição sob refrigeração, enquanto não estava sendo utilizado.

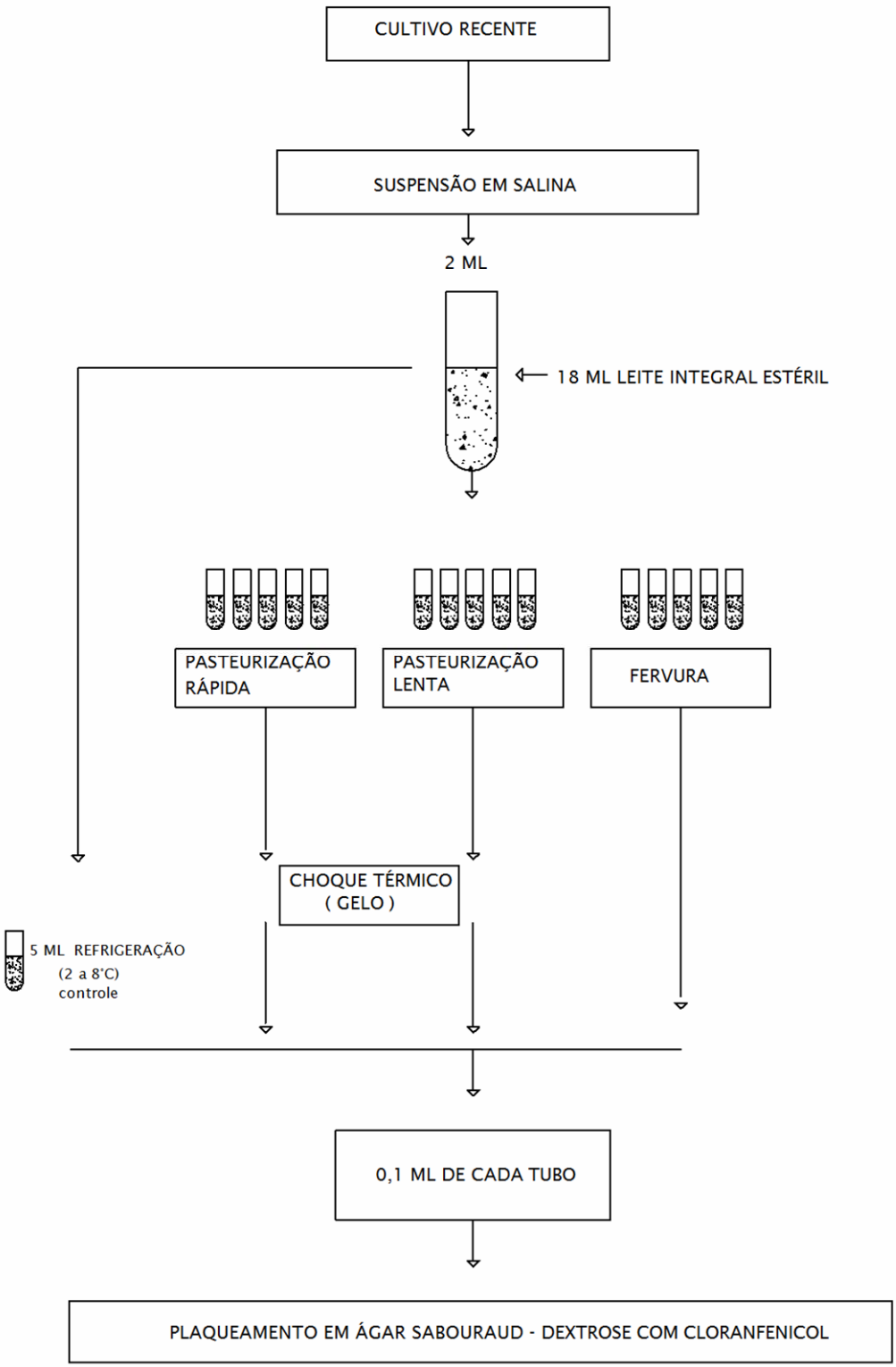
Foram testados os seguintes parâmetros: 62-65°C/30 minutos (pasteurização lenta) e 72-75°C/20 segundos (pasteurização rápida). Para estes testes utilizou-se um equipamento de banho-maria, adequando-se e aferindo-se as temperaturas/tempo em cada experimento. As temperaturas e tempos escolhidos para os testes correspondem àqueles utilizados nos principais processos de pasteurização atualmente empregados no Brasil. Uma vez concluído o tempo de contato com a temperatura testada, os tubos com as amostras de leite foram imediatamente submetidos a um choque térmico em um recipiente contendo gelo por 30 minutos.

Foi também realizada a avaliação da susceptibilidade dos isolados à temperatura empregada no processo de fervura do leite. Para tanto, os cinco tubos destinados aos testes de fervura, foram submetidos ao calor e, ao atingir a temperatura de fervura (aproximadamente 98°C), foi colhida uma alíquota de 0,1 mL de cada tubo para plaqueamento.

Alíquotas de 0,1 mL de cada tubo que passou pelo processo de pasteurização rápida, pasteurização lenta e fervura e da solução mãe restante (controle), foram plaqueadas utilizando-se a técnica de *spread plate* (técnica de espalhamento em superfície) em ágar Sabouraud-dextrose com cloranfenicol 100 mg/L, e incubadas a 25°C em estufa microbiológica por um período mínimo de 7 dias, para a contagem de unidades formadoras de colônias dos microrganismos/mL.

Todos os testes que visaram a avaliação da susceptibilidade dos isolados aos parâmetros temperatura/tempo (72-75°C/20 segundos e 62-65°C/30 minutos e 98°C) foram realizados em número de cinco repetições para cada isolado (Fluxograma 2).

Fluxograma 2



3.3 Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o “software” Graphpad Instat 1992-98 para realização da mesma. Foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Fischer , Dunn e Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento, contagem de unidades formadoras de colônias e identificação de fungos filamentosos e leveduras a partir de amostras de leite, colhidas de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C, bem como amostras de leite oriundas de latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e amostras de leite de latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino.

De um total de 50 amostras de leite cru classificados de acordo com as categorias pertencentes aos tipos A, B e C, provenientes de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira, foram isolados os seguintes fungos filamentosos e leveduras: *Aureobasidium* sp. *Candida* spp. (*C. krusei, C. parapsilosis, C. kefyr, C. albicans, C. guilliermondii, C. lusitaniae, C. tropicalis), Rhodotorula* spp., *Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp., *Mucor* spp., *Aspergillus* spp., *Chrysosporium* sp., *Acremonium* spp., *Penicillium* spp. (Quadro 3 e Tabela 1). As freqüências de isolamentos de *C. krusei* (70 %)*, C. tropicalis* (54%)*, C. guilliermondii* (52 %)*, C. kefyr* (34 %), *Geotrichum* spp. (52 %) e *Rhodotorula* spp. (40 %), em amostras colhidas de tanques de refrigeração, foram estatisticamente significantes ($p<0,05$) quando comparadas com as dos demais fungos isolados (Tabela 1). Observou-se a presença de fungos em todas as amostras de leite analisadas oriundas de tanques de refrigeração.

Das 10 amostras de leite provenientes de latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C foram isolados os seguintes fungos: *Candida* spp. (*C. krusei, C. parapsilosis, C. kefyr, C. guilliermondii, C. lusitaniae, C. tropicalis), Rhodotorula* spp., *Geotrichum* spp., *Mucor* spp., *Chrysosporium* sp., *Trichosporon* spp., *Penicillium* spp. (Quadro 4 e Tabela 1). Observou-se a presença de fungos em todas as amostras de leite oriundas de latões de propriedades de exploração leiteira.

Das 10 amostras de leite oriundas de latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino, foram isolados os seguintes fungos filamentosos e leveduras: *Aureobasidium* sp., *Candida* spp. (*C. krusei, C. parapsilosis, C. albicans, C. guilliermondii, C. tropicalis C. kefyr, C. lusitaniae*), *Rhodotorula* spp., *Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp., *Mucor* spp., *Aspergillus* spp., *Chrysosporium* sp., *Penicillium* spp. (Quadro 5 e Tabela 1). Observou-se a presença de fungos em todas as amostras de leite oriundas de latões dos transportadores e distribuidores de leite clandestino.

Considerando-se as 50 amostras de leite oriundas de tanques de refrigeração, a mediana das contagens de U.F.C. de fungos/mL foi de 28,5 X 10^2/mL (0,16 a 332,50 X 10^2/mL) de leite (Gráfico1). Em relação às 10 amostras de leite oriundas de latões de propriedades de exploração dos leites tipos B e C, a mediana das contagens de U.F.C. de fungos/mL foi de 12,91 X 10^2/mL (0,22-138,66 X 10^2/mL) de leite (Gráfico 2). Com relação as 10 amostras de leite oriundas de latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino, a mediana das contagens de U.F.C. de fungos/mL foi de 14,07 X 10^2/mL (2,2 - 78 X 10^2/mL) de leite (Gráfico 3).

Quando comparadas as medianas entre as quantidades de unidades formadoras de colônias de fungos/mL de leite entre as amostras colhidas de tanques

de refrigeração (28,5 X 10^2 U.F.C./mL), latões de propriedades de exploração leiteira (12,91 X 10^2 U.F.C./mL), e latões de distribuidores (14,07 X 10^2 U.F.C./mL), não houve diferença estatisticamente significante (Gráfico 4).

(Continua)

Número da amostra	**U.F.C. (X 10^2)**	**Leveduras e fungos filamentosos isolados**
01	2,6	*C.kefyr, C. parapsilosis, Mucor* spp., *Aspergillus* spp.
02	3,4	*Rhodotorula* spp, *C.kefyr, C. krusei, Mucor* spp.
03	58,75	*C.kefyr, C. krusei, C.guilliermondii, C. tropicalis*
04	119,25	*Rhodotorula* spp, *C. krusei, C. guilliermondii, C. tropicalis, C. lusitaniae, Geotrichum* spp.
05	44,3	*C. albicans, C. krusei, C. guilliermondii, Chrysosporium* sp.
06	106,5	*C. kefyr, C. guilliermondii, C. tropicalis, Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp.
07	159	*C. albicans, C. krusei, C. tropicalis, Mucor* spp.
08	77,5	*Rhodotorula* sp, *C. krusei, C. tropicalis, Geotrichum* spp., *Penicillium* spp.
09	3,75	*C. krusei, C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. tropicalis, Penicillium* spp.
10	67,75	*Geotrichum* spp, *C. krusei, C. kefyr, C. guilliermondii*
11	169	*Geotrichum* spp, *C. tropicalis, C. krusei, C. kefyr*
12	2,7	*C. kefyr, C. tropicalis*
13	33,5	*C. kefyr, Rhodotorula* spp., *C. parapsilosis, C. tropicalis, C. krusei*
14	52,6	*Rhodotorula* spp., *C. krusei, Aureobasidium* sp., *C. guilliermondii*
15	55,25	*Rhodotorula* spp., *C. krusei, C. guilliermondii, C. tropicalis, Aurebasidium* sp., *Geotrichum* spp.
16	3,93	*Geotrichum* spp., *C. gulliermondii, C. parapsilosis*
17	4,4	*C. guilliermondii, C. kefyr, C. lusitaniae, Rhodotorula* spp.
18	7,15	*C. lusitaniae, C. guilliermondii*
19	2,6	*Rhodotorula* spp., *C. krusei*
20	4,4	*Geotrichum* spp., *C. krusei, C. parapsilosis, C. tropicalis*
21	48,66	*C. krusei, Geotrichum* spp., *C. tropicalis, Acremonium* spp.
22	9,46	*Geotrichum* spp., *C. guilliermondii, C. krusei*
23	0,16	*Rhodotorula* spp.
24	0,5	*Acremonium* spp., *C. krusei, Rhodotorula* spp.
25	0,92	*Penicillium* spp, *Rodothorula* spp, *C. guilliermondii, C. parapsilosis.*

Quadro 3- Contagens de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) e identificação de fungos (fungos filamentosos e leveduras) em leite colhido de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C - Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004

conclusão

Número da amostra	U.F.C. (X 10^2)	Leveduras e fungos filamentosos isolados
26	59	*Rhodotorula* spp., *C. krusei, C. parapsilosis, Geotrichum* spp.
27	3,3	*C. tropicalis, Geotrichum* spp., *C. guilliermondii, C. kefyr, C. parapsilosis.*
28	84,5	*Geotrichum* spp, *C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. tropicalis, C. lusitaniae.*
29	123	*Rhodotorula* spp., *Geotrichum* spp., *Aureobasidium* sp., *C. krusei, C. guilliermondii, C. lusitaniae*
30	2,66	*Rhodotorula* spp., *C. tropicalis, C. krusei, C. kefyr, C. parapsilosis*
31	7,9	*Geotrichum* spp., *Acremonium* spp., *C. tropicalis*
32	3,1	*Rhodotorula* spp., *C. krusei, C. tropicalis, C. guilliermondii*
33	332,5	*Geotrichum* spp., *C. krusei, C. tropicalis, C. guilliermondii, C. parapsilosis.*
34	2,5	*C. tropicalis, C. kefyr*
35	62,5	*C. krusei, Rhodotorula* spp., *Crysosporium* spp.
36	267	*C. tropicalis, C. krusei, C. guilliermondii*
37	114,5	*C. krusei, C. guilliermondii*
38	59	*C. kefyr, Rhodotorula* spp., *C. tropicalis, Geotrichum* spp., *C. krusei, C. guilliermondii*
39	22,5	*Geotrichum* spp., *C. parapsilosis, Rhodotorula* spp., *C. tropicalis, C. lusitaniae*
40	5,2	*Penicillium* spp., *C. tropicalis, C. lusitaniae, Geotrichum* spp., *Acremonium* spp., *C. guilliermondii, Trichosporon* spp., *C. parapsilosis*
41	1,85	*C. kefyr, C. guilliermondii, Rodothorula* spp, *C. tropicalis, Geotrichum* spp.
42	2,65	*Acremonium* spp., *Geotrichum* spp., *Rhodotorula* spp., *C. krusei*
43	67,5	*C. tropicalis, C. parapsilosis, Geotrichum* spp., *C. krusei, C. guilliermondii*
44	8,5	*C. kefyr, C. krusei, Geotrichum* spp.
45	36	*C. guilliermondii, C. krusei, Trichosporon* spp., *C. kefyr, Geotrichum* spp.
46	18	*C. tropicalis, C. krusei, C. lusitaniae, Geotrichum* spp.
47	23,5	*C. tropicalis, C. guilliermondii, C. krusei, Aureobasidium* sp., *Trichosporon* spp., *Geotrichum* spp.
48	132,5	*C. krusei, C. lusitaniae*
49	180	*C. krusei, C. kefyr*
50	37	*C. krusei, C. parapsilosis*

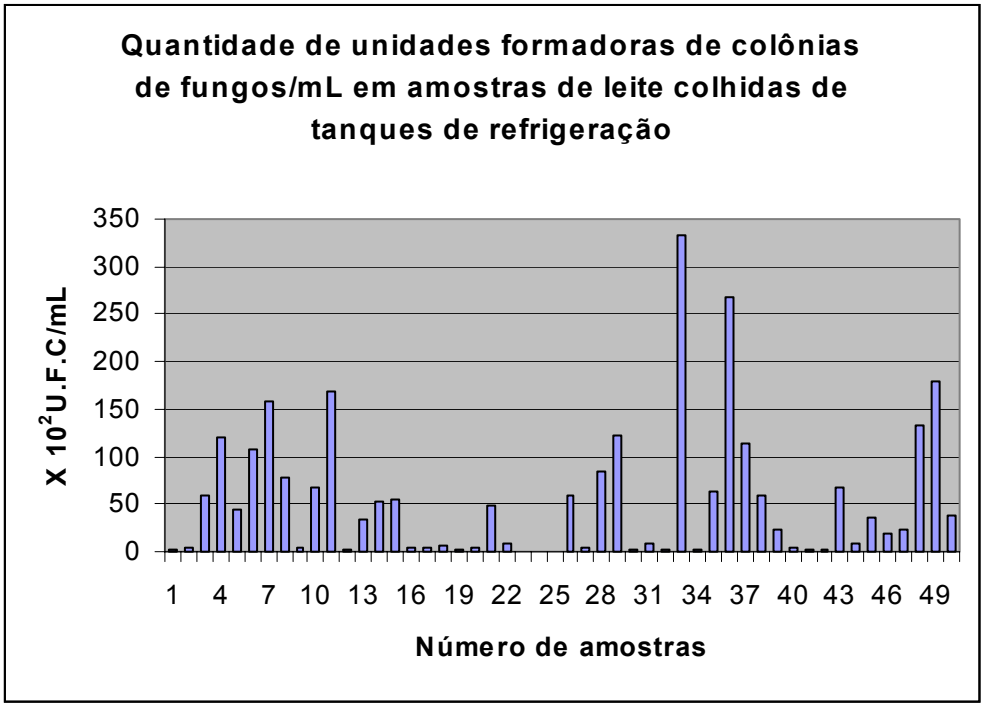


Gráfico 1- Distribuição das quantidades de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) de fungos em amostras de leite obtidas de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C – Pirassununga, Campinas e Itu, 2003/2004

Número da amostra	U.F.C. (X 10^2)	Leveduras e fungos filamentosos isolados
01	2,5	*Rhodotorula* spp., *C. kefyr, C. krusei, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. lusitaniae, Mucor* spp., *Chrysosporium* sp.
02	11,12	*Rhodotorula* spp., *Geotrichum* spp., *Penicillium* spp., *C. tropicalis, Trichosporon* spp., *C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. guilliermondii*
03	0,22	*Rhodotorula* spp., *Penicillium* spp., *C. parapsilosis*
04	138,66	*Trichosporon* spp., *C. guilliermondii*
05	14,7	*Geotrichum* spp., *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *Trichosporon* spp., *C. guilliermondii*
06	15,9	*C. guilliermondii*, *C. krusei*, *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp.
07	8,5	*Geotrichum* spp., *C. tropicalis*, *C. krusei*, *Rhodotorula* spp.
08	3,5	*C. krusei*, *C. guilliermondii*, *Rhodotorula* spp., *C. tropicalis*
09	44,5	*C. krusei, Geotrichum* spp., *C. guilliermondii*
10	25	*Geotrichum* spp., *C. guilliermondii, C. krusei*

Quadro 4- Contagens de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) e identificação de fungos (fungos filamentosos e leveduras) em leite colhido de latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C – Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004

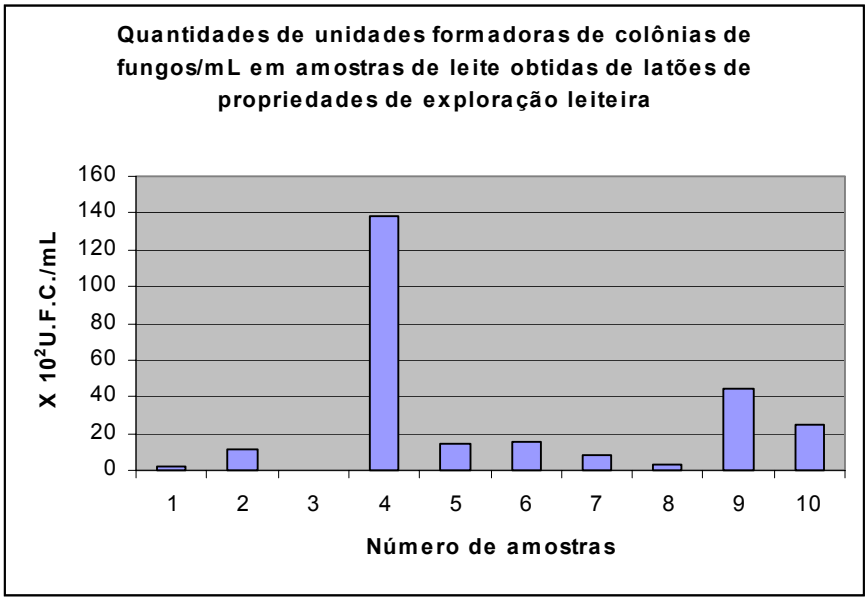


Gráfico 2- Distribuição das quantidades de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) de fungos nas amostras de leite obtidas em latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C - Pirassununga, Campinas e Itu, 2003/2004

Número da amostra	**U.F.C. (X 10^2)**	**Leveduras e fungos filamentosos isolados**
01	5,65	*Aureobasidium* sp., *Rhodotorula* spp., *C. albicans, C.kefyr, C. krusei, C.guilliermondii, Aspergillus* spp.
02	16,4	*Rhodotorula* spp., *C. kefyr, Geotrichum* spp.
03	11,75	*Rhodotorula* spp., *C. kefyr, C. krusei, C.guillermondii, Geotrichum* spp., *Chrysosporium* sp.
04	3,93	*C. kefyr, C. krusei, C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. tropicalis, Mucor* spp., *Chrysosporium* sp.
05	10,07	*Rhodotorula* spp., *Penicillium* spp., *Trichosporon* spp., *C. tropicalis, C. parapsilosis*
06	2,2	*Trichosporon* spp., *Geotrichum* spp., *C. guilliermondii, C. tropicalis*
07	78	*C. lusitaniae, Chrysosporium* sp., *Trichosporon* spp., *C. guilliermondii*
08	71	*C. krusei, Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *C. guilliermondii, C. lusitaniae, C. kefyr*
09	26,5	*C. krusei, Chrysosporium* sp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp., *C. tropicalis*
10	40,5	*Trichosporon* spp., *C. guilliermondii, Rhodotorula* spp., *C. krusei, C. parapsilosis*

Quadro 5- Contagens de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) e identificação de fungos (fungos filamentosos e leveduras) em leite colhido de latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino – Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004

.

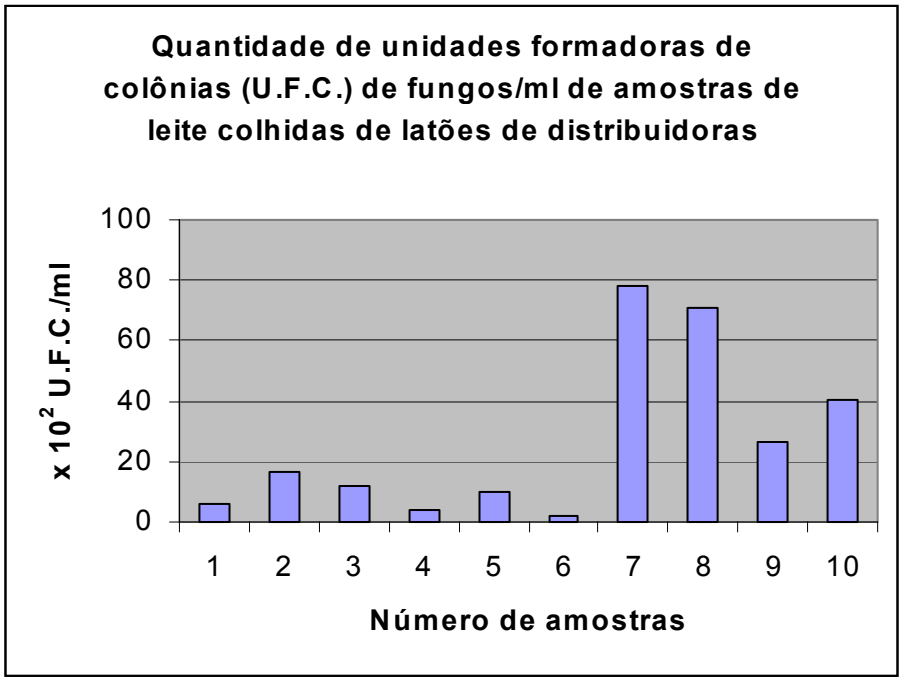


Gráfico 3- Distribuição das quantidades de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) em amostras de leite obtidas de latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino - Pirassununga, Campinas e Itu, 2003/2004

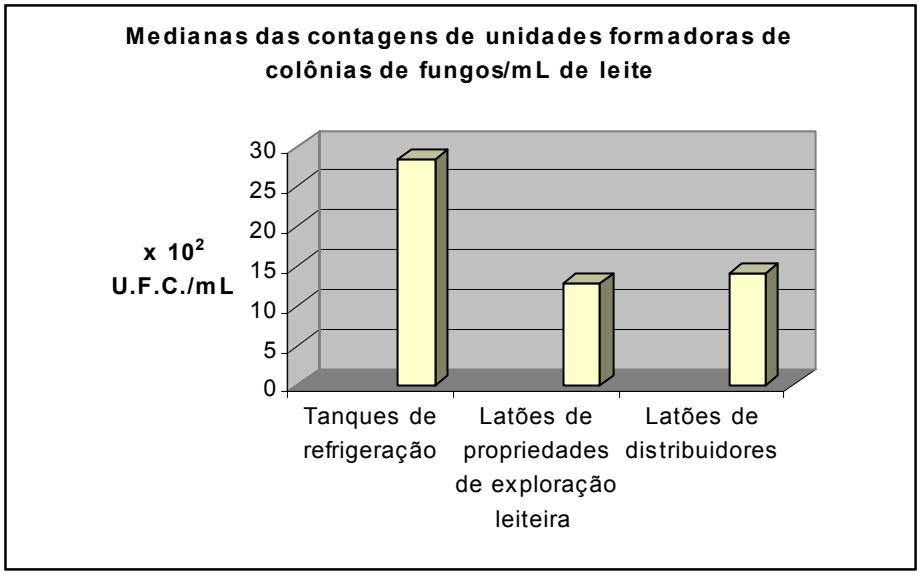


Gráfico 4- Medianas das quantidades de unidades formadoras de colônias (U.F.C./mL) de fungos em amostras de leite obtidas de tanques de refrigeração, latões de propriedades produtoras de leite e latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino - Pirassununga, Campinas e Itu, 2003/2004

Tabela 01- Freqüências de isolamentos de leveduras e fungos filamentosos em amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10 latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino – Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004

Origem da amostra	**Tanque de refrigeração (N=50)**		**Latão de distribuidor (N=10)**		**Latão de propriedade de exploração leiteira (N=10)**	
Fungos isolados	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Aureobasidium sp.	4	8	1	10	0	0
C. albicans	2	4	1	10	0	0
C. krusei	35	70*	6	60	7	70
C. parapsilosis	15	30	3	30	3	30
C. guilliermondii	26	52*	7	70	7	70
C. tropicalis	27	54*	4	40	5	50
C. kefyr	17	34*	5	50	2	20
C. lusitaniae	9	18	2	20	2	20
Geotrichum spp.	26	52*	4	40	5	50
Trichosporon spp.	4	8	6	60	4	40
Rhodotorula spp.	20	40*	7	70	6	60
Presença de Leveduras nas origens	**50**	**100****	**10**	**100**	**10**	**100****
Penicillium spp.	4	8	1	10	2	20
Acremonium spp.	5	10	0	0	0	0
Chrysosporium sp.	2	4	4	40	1	10
Mucor spp.	3	6	1	10	1	10
Aspergillus spp.	1	2	1	10	0	0
Presença de Fungos filamentosos nas origens	**13**	**26**	**6**	**60**	**3**	**30**

*As frequências de isolamentos de *C. krusei, C. guilliermondii, C. tropicalis, C. kefyr, Rhodotorula* spp. e *Geotrichum* spp., em amostras colhidas de tanques de refrigeração, foram estatisticamente maiores ($p<0,05$) quando comparadas com aos demais fungos isolados.
**A freqüência de isolamentos de leveduras a partir de tanques de refrigeração e latões de propriedades de exploração leiteira foi maior ($p<0,05$) do que a ocorrência de fungos filamentosos.

4.2 Avaliação da susceptibilidade de fungos filamentosos e leveduras, isolados das amostras de leite analisadas no ítem 4.1, às relações temperatura/tempo empregadas nos processos de pasteurização permitidos para uso no Brasil e avaliação da sensibilidade destes isolados à fervura do leite

As leveduras e fungos filamentosos isolados na etapa 4.1, foram submetidos às provas de pasteurização rápida e lenta, e à fervura.

As medianas das contagens de U.F.C./ mL de fungos antes da realização dos testes de pasteurização e fervura, que corresponderam à turbidez do tubo 3 da escala de McFarland foram, 127,8 X 10^4 U.F.C./mL e 92,5 X 10^4 U.F.C./mL, para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente.

Na tabela 2 estão apresentadas as freqüências de resistência térmica apresentadas pelos isolados de leveduras e fungos filamentosos isolados de amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru e 10 latões de transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino.

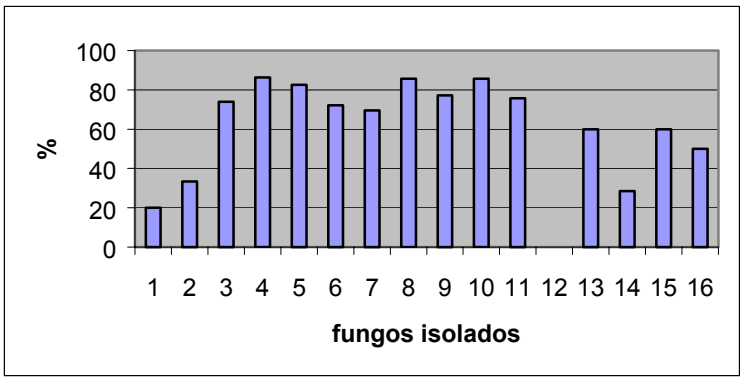
Tabela 2- Freqüências de resistência (em número absoluto e porcentagem) aos processos de pasteurização rápida, lenta e fervura, apresentadas pelos isolados de leveduras (N=275) e fungos filamentosos (N=27) isolados de amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10 latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino - Pirassununga, Campinas e Itu. 2003-2004

Fungos isolados		**Pasteurização Rápida**		**Pasteurização Lenta**		**Fervura**	
	N	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Aureobasidium sp.	5	1	20	0	0	0	0
C. albicans	3	1	33,3	0	0	0	0
C. krusei	50	37	74	1	2	8	16
C. parapsilosis	22	19	86,36	0	0	3	13,63
C. guilliermondii	40	33	82,5	0	0	9	22,5
C. tropicalis	36	26	72,22	0	0	3	8,3
C. kefyr	23	16	69,56	0	0	8	34,78
C. lusitaniae	14	12	85,71	0	0	5	35,7
Geotrichum spp.	35	27	77,14	0	0	4	11,42
Trichosporon spp.	14	12	85,71	0	0	3	21,42
Rhodotorula spp.	33	25	75,75	2	6,06	5	15,15
Total de leveduras	**275**	**209**	**76**	**3**	**1,09**	**48**	**17,45**
Penicillium spp.	8	0	0	0	0	0	0
Acremonium spp.	5	3	60	0	0	0	0
Chrysosporium sp.	7	2	28,57	0	0	0	0
Mucor spp.	5	3	60	0	0	0	0
Aspergillus spp.	2	1	50	0	0	0	0
Total de fungos filamentosos	**27**	**9**	**33,33**	**0**	**0**	**0**	**0**
Total	**302**	**218**	**72,18***	**3**	**0,99**	**48**	**15,89**

* O processo de pasteurização rápida foi o procedimento no qual houve maior ($p<0,001$) resistência (72,18 %) por parte dos isolados de leveduras e fungos filamentosos testados, seguido pelo processo de fervura (15,89 %) e o de pasteurização lenta (0,99 %).

Em relação à pasteurização rápida, 72,18 % dos isolados resistiram à temperatura de 75°C/20 segundos, tendo-se observado uma mediana de 12,6 (0-281,7) X 10 U.F.C./mL/isolado. Os fungos avaliados apresentaram diferentes

percentagens de resistência frente a este procedimento conforme pode ser obsevado na tabela 2 e gráfico 5.

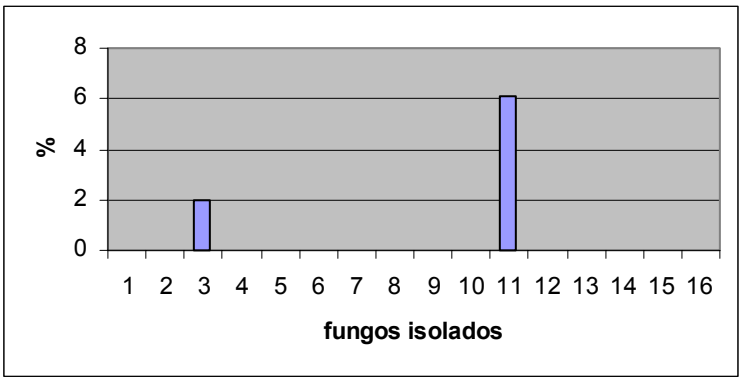


(1) *Aureobasidium* sp., (2) *C. albicans*, (3) *C. krusei*, (4) *C. parapsilosis*, (5) *C. guilliermondii*, (6) *C. tropicalis*, (7) *C. kefyr*, (8) *C. lusitaniae*, (9) *Geotrichum* spp., (10) *Trichosporon* spp., (11) *Rhodotorula* spp., (12) *Penicillium* spp., (13) *Acremonium* spp., (14) *Chrysosporium* sp., (15) *Mucor* spp. (16) *Aspergillus* spp.

Gráfico 5- Percentagens de resistência ao processo de pasteurização rápida apresentadas pelos fungos isolados de amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10 latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino

Em relação à pasteurização lenta, menos de 1% dos isolados resistiram à temperatura de 63°C por 30 minutos (tabela 2 gráfico 6) , tendo-se observado uma mediana de 0 (0-2,6) X 10 U.F.C./mL /isolado.

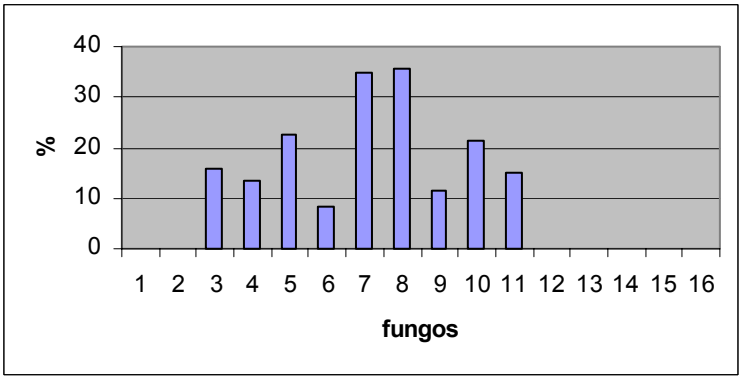
.



(1) *Aureobasidium* sp., (2) *C. albicans*, (3) *C. krusei*, (4) *C. parapsilosis*, (5) *C. guilliermondii*, (6) *C. tropicalis*, (7) *C. kefyr*, (8) *C. lusitaniae*, (9) *Geotrichum* spp., (10) *Trichosporon* spp., (11) *Rhodotorula* spp., (12) *Penicillium* spp., (13) *Acremonium* spp., (14) *Chrysosporium* sp., (15) *Mucor* spp. (16) *Aspergillus* spp.

Gráfico 6- Percentagens de resistência ao processo de pasteurização lenta apresentadas pelos fungos isolados de amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10 latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino

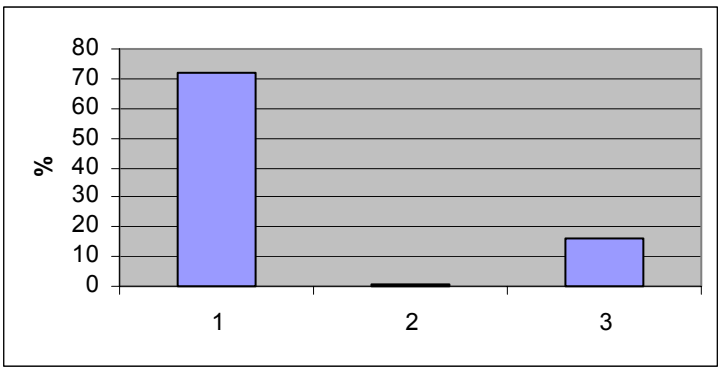
Em relação à fervura, 15,89 % dos isolados resistiram a este procedimento (Tabela 2 e gráfico 7), tendo-se observado uma mediana de 0 (0-116,30) X 10 U.F.C./mL /isolado.



(1) *Aureobasidium* sp., (2) *C. albicans*, (3) *C. krusei*, (4) *C. parapsilosis*, (5) *C. guilliermondii*, (6) *C. tropicalis*, (7) *C. kefyr*, (8) *C. lusitaniae*, (9) *Geotrichum* spp., (10) *Trichosporon* spp., (11) *Rhodotorula* spp., (12) *Penicillium* spp., (13) *Acremonium* spp., (14) *Chrysosporium* sp., (15) *Mucor* spp. (16) *Aspergillus* spp.

Gráfico 7- Percentagens de resistência ao processo de fervura apresentadas pelos fungos isolados de amostras de leite colhidas de 50 tanques de refrigeração de propriedades produtoras de leite cru dos tipos A, B e C, 10 latões de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e 10 latões dos transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino

Quando comparadas as percentagens de resitência dos isolados frentes aos três procedimentos avaliados (pasteurização rápida - 72,18%, pasteurização lenta - 0,99%, fervura - 15,89%), verificou-se diferença estatisticamente significante (P<0,01) (Gráfico 8).



(1) Pasteurização rápida, (2) Pasteurização lenta, (3) Fervura

Gráfico 8- Comparação entre as percentagens de fungos resistentes aos processos de pasteurização rápida, lenta e fervura.

Em todos os procedimentos testados verificou-se que as medianas das contagens de U.F.C./mL foram estatisticamente menores ($P<0,01$) quando comparadas com as medianas das contagens de U.F.C./ mL de fungos antes da realização dos testes ($127,8 \times 10^4$ U.F.C./mL e $92,5 \times 10^4$ U.F.C./mL, para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram isolados fungos filamentosos e leveduras a partir de todas amostras de leite colhidas de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira de leite cru dos tipos A, B e C, bem como de leite de propriedades produtoras de leite cru dos tipos B e C e amostras de leite de latões presentes em transportadores e distribuidores que armazenam e comercializam leite clandestino.

Os microrganismos isolados neste estudo, tais como *Aureobasidium* sp., *C. albicans, C. krusei, C. parapsilosis, C. guilliermondii, C. tropicalis, C. kefyr, C. lusitaniae, Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp., *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Chrysosporium* sp., *Mucor* spp., *Aspergillus* spp., podem estar associados a quadros de micoses oportunísticas que, de acordo com Trabulsi et al. (1999), são infecções cosmopolitas causadas por fungos de baixa virulência, que convivem pacificamente com o hospedeiro mas que, ao encontrarem condições favoráveis, como distúrbios do sistema imuno-defensivo, desenvolvem seu poder patogênico, invadindo os tecidos.

Os fatores que predispõem às micoses oportunísticas podem ser classificados em fatores intrínsecos ou próprios do hospedeiro (neoplasias, diabetes, dentre outras, bem como todas as doenças que alteram a imunidade celular) e fatores extrínsecos (antibioticoterapia, corticoidoterapia, etc.) (TRABULSI et al., 1999).

A candidíase é uma infecção causada por fungos do gênero *Candida*, sendo que o agente mais comum é a *C. albicans,* a qual pode ser isolada, em

condições normais, a partir de pele, orofaringe, mucosa vaginal e fezes. Várias espécies de *Candida*, incluindo *C. tropicalis, C. krusei*, *C. parapsilosis, C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* podem ser isoladas a partir de diferentes fontes, podendo não ser patogênicas ou podendo causar infecções, particularmente em pacientes imuno-comprometidos, ou submetidos a tratamentos prolongados com antibióticos, corticosteróides ou drogas citotóxicas, dentre outras condições onde o organismo encontre-se debilitado (LACAZ et al., 1998; LARONE, 1995; TRABULSI et al., 1999; VARTIVARIAN et al., 1993).

O gênero *Aureobasidium* sp. já foi isolado a partir de quadros de ceratomicoses, pneumonias, dermatites, e outras. As leveduras do gênero *Geotrichum* spp. podem ser encontradas como parte da microbiota normal do trato intestinal e podem causar infecções oportunísticas particularmente em pacientes imuno-comprometidos, infecções estas denominadas geotricoses, que estão associadas a lesões na boca, intestinos e pulmões. Estas infecções geralmente são adquiridas via ingestão ou inalação. *Rhodotorula* spp. também podem ser isoladas como agentes causais de micoses oportunísticas em pacientes vulneráveis, como aqueles acometidos por AIDS ou leucemia (ANAISSIE et al., 1989; COLLIER et al., 1998; GROLL et al., 2001; LARONE, 1995; LACAZ et al., 1998; SUTTON et al., 1998; TRABULSI et al., 1999).

Trichosporon spp. podem causar a piedra branca (infecção superficial que acomete pelos, principalmente de bigode e barba, caracterizada pela formação de nódulos brancos localizados ao longo dos pelos), infecções superficiais bem como tricosporonose invasiva (pacientes imuno-comprometidos são particularmente susceptíveis à infecção que progride rapidamente envolvendo vários órgãos incluindo pulmões, rins e baço). González et al. (1986) verificaram que *Trichosporon*

beigelii pode causar infecções intramamárias em vacas, quadros estes que podem até ser fatais, a prevalência pode ser alta, e os sintomas são hipertermia, inflamação do úbere e diminuição substancial na produção de leite.

Por sua vez, fungos filamentosos como *Penicillium* spp. podem causar em humanos, uma doença do tipo ocasional que é denominada peniciliose. Foram isolados de pacientes com ceratites, endoftalmite, otomicoses, pneumonias, peritonites, infecções do trato urinário, dentre outros. A maior parte destes pacientes encontrava-se imunossuprimido. Alguns isolados produzem a ocratoxina A, a qual é nefrotóxica e carcinogênica (COLLIER et al., 1998; LACAZ et al., 1998).

Acremonium spp. pode causar micetomas, infecções em córnea e unhas, bem como já foram relatados casos de meningites, peritonites e osteomielites associados a este agente. *Chrysosporium* sp. pode causar infecções na pele e unhas, também já tendo sido isolados de pacientes com infecções sistêmicas. *Mucor* spp. encontra-se entre os agentes causais da zigomicose, doença geralmente sistêmica com acometimento do sistema nervoso central, vasos sanguíneos, pulmões, trato gastro-intestinal e outras partes do organismo (ANAISSIE et al., 1989; COLLIER et al., 1998; GROLL et al., 2001; LACAZ et al., 1998; LARONE, 1995; TRABULSI et al., 1999).

Aspergillus spp. podem causar doenças denominadas aspergiloses, as quais podem se manifestar sob diferentes formas clínicas, como infecções oportunísticas, alergias ou toxicoses. Determinados antígenos de *Aspergillus* spp. são alérgenos fúngicos e podem desencadear aspergilose bronco-pulmonar alérgica. Determinadas espécies de *Aspergillus* produzem micotoxinas as quais, através de ingestão crônica, possuem potencial carcinogênico. Dentre estas toxinas, a aflatoxina pode induzir carcinoma hepato-celular. Em aves, *Aspergillus* spp. podem causar

infecções respiratórias; em bovinos e ovinos, podem estar associados a abortamento micótico. A ingestão de aflatoxinas pode induzir efeitos letais em aves alimentadas com ração contaminada com a toxina (COLLIER et al., 1998; SUTTON et al., 1998; TRABULSI et al., 1999).

De forma geral estes microrganismos estão associados a quadros patológicos como alergias, otomicoses, ceratomicoses, lesões do palato duro, meningites, endocardites, doenças sistêmicas, gastro-intestinas, pulmonares, geniturinárias, cutâneas, subcutâneas e ósseas (KERN; BLEVINS, 1999).

Assim sendo, pode-se observar que todos os fungos filamentosos e leveduras isolados das amostras de leite das diversas origens no presente estudo, apresentam potencial patogênico, principalmente se o hospedeiro encontrar-se debilitado pelos fatores mencionados anteriomente. Desta forma, o consumo de leite contaminado por algum destes agentes, ou mesmo de toxinas por eles produzidas, poderia acarretar danos à saúde do consumidor.

Os dados obtidos no presente estudo permitem observar a grande variedade de gêneros e espécies de fungos isolados das amostras analisadas, que totalizaram 16 espécies, entre leveduras e fungos filamentosos.

Neste estudo, todas as espécies de leveduras encontradas, foram isoladas a partir de amostras de tanques de refrigeração, latões de distribuidores de leite clandestino e latões de propriedades leiteras, à exceção de *C. albicans*, *Aureobasidium* sp., *Acremonium* spp. e *Aspergillus* spp., os quais não foram isolados de amostras oriundas de latões de propriedades de exploração leiteira, e *Acremonium* sp. que não foi isolado de amostras oriundas de latões de distribuidores clandestinos. A freqüência de isolamentos de leveduras a partir de tanques de

refrigeração e latões de propriedades leiteiras foi maior ($p<0,05$) do que a ocorrência de fungos filamentosos.

Das 70 amostras de leite de diferentes procedências analisadas, as leveduras estiveram presentes em 100 % delas. Por sua vez, os fungos filamentosos foram isolados de 26 % das amostras de tanque, 60 % das amostras de latões de distribuidores e 30 % de latões de propriedades leiteiras.

Klossowska e Malinowsi (2001) realizaram exames microbiológicos em 66 amostras de leite oriundas de tanques de refrigeração de diferentes propriedades de exploração leiteira, tendo isolado, dentre outros agentes, *C. albicans, C. krusei, C. tropicalis, C. kefyr, Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp. e *Aspergillus* spp, todos estes agentes também isolados no presente estudo.

Swinne et al. (1997) desenvolveram uma pesquisa onde identificaram leveduras em 70 tanques de armazenamento de leite de fazendas na Bélgica, dentre as quais *Candida kefyr, C. rugosa* e *Pichia kluyueri.* No presente estudo não foram isoladas *C. rugosa* e *Pichia kluyueri.*

Segundo Haridy (1992) foram isoladas 126 leveduras de amostras de leite cru colhidas em fazendas de exploração leiteira na cidade de El Minia, norte do Egito. Dos 13 gêneros identificados, os mais freqüentes foram *Trichosporon beigelii* e *Rhodotorula* spp., também observados no presente estudo.

Jodral et al. (1993) isolaram e quantificaram fungos em 64 amostras de leite cru e 33 amostras de leite pasteurizado, sendo que os gêneros de fungos mais freqüentemente isolados foram *Geotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp no leite cru e os mesmos gêneros de microrganismos, à exceção de *Geotrichum* spp., em leite pasteurizado. A média das contagens de U.F.C./mL no leite cru foi de 230 U.F.C./mL e no leite pasteurizado foi de 25 U.F.C./mL. No

presente estudo, também foram isolados estes mesmos microrganismos à exceção de *Fusarium* spp., e as medianas das quantidades de U.F.C.s de fungos/ml foram 28,5 (0,16 a 332,50) X 10^2/mL, 12,91 (0,22-138,66) X 10^2/mL e 14,07 (2,2 - 78) X 10^2/mL, respectivamente, nos tanques de refrigeração, latões de propriedades de exploração leiteira e latões de distribuidores, podendo-se observar que os valores obtidos foram superiores aos verificados por Jodral et al. (1993).

Mutukumira et al. (1996) analisaram microbiologicamente 10 amostras de leite cru de tanques de 34 produtores. A contagem de leveduras e fungos filamentosos foi de <100 U.F.C./mL em 7 das 10 amostras analisadas. Por sua vez, Desmasures et al. (1997) estudaram 39 amostras de leite cru refrigeradas de 20 fazendas leiteiras, observando que a média de contagem de leveduras foi de 6,9X10 U.F.C./mL de leite. As contagens de fungos no presente estudo mostraram-se mais elevadas que as verificadas pelos autores citados.

Sabois et al. (1991) colheram amostras de leite de tanque de 17 fazendas. A contagem de leveduras e fungos filamentosos foi > 1000/mL de leite em todas as amostras. Segundo estes autores os altos níveis de fungos nos tanques indicaram uma higiene insatisfatória durante o processo de ordenha e deficiências do equipamento de ordenha. No presente estudo, por sua vez, observou-se uma mediana de 28,5 X 10^2 U.F.C. de fungos/mL nas amostras de tanque.

Neste trabalho, quando comparadas as medianas entre as quantidades de unidades formadoras de colônias de fungos/mL de leite entre as amostras colhidas de tanques de refrigeração (28,5 x 10^2), latões de propriedades de exploração leiteira (12,91 x 10^2), e latões de distribuidores (14,07 x 10^2), não houve diferença estatisticamente significante, o que permite concluir que, o nível de contaminação por fungos nas amostras destas três origens foi similar.

De acordo com a Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), que dispõe sobre os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, não é referida a contagem de unidades formadoras de colônias de fungos/mL de leite, havendo somente a contagem padrão em placas (CPP) de unidades formadoras de colônias da totalidade dos microrganismos isolados (bactérias e fungos). Com relação a esta última (CPP), a metodologia utilizada para sua realização emprega a temperatura de 32°C, bem como tempo máximo de incubação de 48 horas, fatores estes que poderiam impedir o isolamento de alguns fungos, particularmente os filamentosos que requerem maior tempo para crescimento, bem como necessitam temperaturas mais baixas (em torno de 25°C) para desenvolvimento. No presente estudo, embora as contagens de unidades formadoras de colônias de fungos/mL verificadas tenham sido baixas quando comparadas com aquelas referidas nas determinações da Instrução Normativa nº 51 para contagem padrão em placas (BRASIL, 2002), deve-se atentar para o risco que constitui a presença destes microrganismos no leite, tendo em vista que muitos dos mesmos são agentes de micoses oportunísticas e/ou produtores de toxinas, fatores que podem comprometer a qualidade do leite.

Em relação aos transportadores/distribuidores de leite clandestino, que recolhem o leite ordenhado na fazenda e o armazenam em tambores dentro de freezers domésticos, deve-se ressaltar que durante a distribuição deste leite, que pode levar até 5 horas, o mesmo é mantido em temperatura ambiente e entregue acondicionado em garrafas de plástico. No decorrer desta pesquisa, foram encontrados produtores leiteiros preocupados com o futuro impedimento de se

comecializar o leite cru em peruas, de forma clandestina, tendo em vista que o valor pago pelo leite é superior ao oferecido pelas grandes usinas leiteiras, apesar de que os órgãos competentes (Prefeitura Municipal) prometeram ceder um espaço para a construção de cooperativas, onde o leite chegaria ao consumidor dentro das normas de segurança exigidas.

Alguns países estão alertando as populações sobre os riscos relacionados ao consumo de leite cru, como nos Estados Unidos, no Estado da Califórnia, onde 34% da população é de origem hispânica e possui o hábito de consumir leite cru e fabricar queijos frescos como uma prática tradicional e cultural (HEADRICK et al., 1997). Em 1996, o Califórnia Department of Food and Agriculture (CDFA) divulgou a informação de que 4 % do total da produção do queijo fresco, naquele Estado, era considerado ilegal (produzido com leite cru), o que representava a produção leiteira anual de 20.000 vacas, sendo esse número bastante elevado, causando uma preocupação, principalmente em relação à possível ocorrência de uma epidemia de origem alimentar. Foi então instalado um programa de biossegurança nas propriedades leiteiras da Califórnia, cuja finalidade era a de implantar exames médico-veterinários e controle da entrada de novas doenças nas fazendas, através de monitoramento dos animais e das pessoas que moram e trabalham nas mesmas ou vendem o leite cru (REED; GRIVETTI, 2000).

Na Espanha não é permitida a presença de fungos filamentosos em leite pasteurizado, porque isto prejudica o processo de manufatura de queijos e outros derivados, pois exerce influência sobre as características organolépticas, bem como pode haver a possibilidade de produção de micotoxinas por estes agentes (JODRAL et al., 1993).

Foram analisadas amostras de leite provenientes de propriedades leiteiras com grandes diferenças com relação às estruturas físicas, higiene de ordenha e de ambiente, manejo e sanidade dos animais. Algumas delas apresentavam sala de ordenha ou estábulo com acúmulo de sujidades e animais aparentemente debilitados, e outras eram altamente tecnificadas, apresentavam boa higiene de ordenha e de ambiente e tinham animais de exposição. Embora tenham apresentado grandes diferenças com relação aos aspectos mencionados, de todas elas foram isolados fungos leveduriformes das amostras de leite analisadas.

Segundo Cousins e Bramley (1981), os microrganismos presentes em amostras de leite provenientes do tanque de refrigeração podem ter origem a partir de úberes infectados (acometidos por mastite infecciosa), da superfície dos úberes e/ou dos tetos ou do equipamento de ordenha (água de lavagem contaminada, manejo inadequado, etc.) temperatura de armazenamento do leite acima do estabelecido como padrão de refrigeração. Tendo em vista que os fungos pertencem ao grupo dos microrganismos ambientais (segundo a classificação dos agentes etiológicos de mastite), a presença destes agentes em amostras de tanques de refrigeração, latões de fazendas e latões de distribuidores de leite, poderia estar associada a deficiências quanto às condições higiênicas de obtenção e acondicionamento do produto.

A mastite micótica geralmente está associada a indivíduos imunossuprimidos, também podendo ocorrer devido a traumatismos decorrentes do equipamento de ordenha, irritação das tetas ou tratamento com antibióticos os quais podem predispor as glândulas às infecções (LOFTSGARD; LINDQUIST, 1960). Diversos autores já relataram a ocorrência de mastite micótica, sendo que os agentes mais frequentemente isolados foram: *Candida* spp., *Cryptococcus* spp.,

Aspergillus spp*., Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Trichosporon* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. (ANDERSON et al., 1982; BANSAL et al., 1990; BENESI et al., 1983; BLOOD; RADOSTITIS, 1989; CHABRA et al., 1999; CORBO et al., 2001; COSTA et al., 1993; COSTA et al., 1995; FARNSWORTH, 1977; GIESECKE et al., 1968; GILLESPIE; TIMONEY, 1981; HIBBS, 1980; HOFFAMAN et al., 1965; JAND; DHILLON, 1975; KADIC et al., 1983; KELLER et al., 2000; KIRK; BARLETT, 1986; LAGNEU et al., 1996; LANGONI et al., 1985; LOKEN, 1959; MARDAMOOTOO, 1983; MEHNERT et al., 1964; MORCOS et al., 1990; MORETTI et al., 1998; MÓS et al., 1978; PIANTA, 1994; RICHARD et al., 1980; SCHALLIBAUM et al., 1980; SHARMA et al., 1977; SIMON et al., 1953; STUART, 1951; TUCKER, 1954; VAN DAMME, 1983; WYLLIE; MOREHOUSE, 1977a 1977b).

De acordo com Desmasures et al. (1997) o equipamento de ordenha contaminado bem como úberes infectados, se constituem em potenciais fontes de contaminação de leveduras no leite. Assim sendo, medidas de manejo adequado frente a mastites causadas por fungos, bem como a realização apropriada de manejo e higiene de ordenha e de ambiente, poderiam se constituir em fatores capazes de minimizar a ocorrência de mastites por fungos bem como reduzir a contaminação durante o processo de ordenha.

De acordo com Texdof (1972) e Nakae et al. (1976), o gênero *Geotrichum* constitui o mais frequentemente isolado de leite cru. Segundo estes autores, a presença de fungos filamentosos no leite cru indica uma contaminação ambiental, além de falta de higiene na ordenha.

Esta pesquisa teve a preocupação de além de isolar, quantificar e identificar os fungos, testá-los em 3 diferentes processos térmicos (pasteurização rápida, pasteurização lenta e fervura), com o objetivo de avaliar o comportamento desses

microrganismos em um alimento altamente consumido pela população mundial, o leite. Verificou-se que o processo de pasteurização rápida foi o procedimento no qual houve maior ($p<0,001$) resistência (72,18 %) por parte dos isolados submetidos ao teste, seguido pelo processo de fervura (15,89%) e pasteurização lenta (0,99%).

Cabe salientar que as medianas de U.F.C. de fungos/mL após a realização dos testes foram de 12,6 para o processo de pasteurização rápida e 0, tanto para processo de fervura como para pasteurização lenta. Os resultados obtidos permitiram concluir que o processo de pasteurização lenta foi o mais eficiente dentre os procedimentos que visaram avaliar a susceptibilidade térmica dos fungos estudados, em termos de capacidade de promover a redução da população de fungos presentes nas amostras, considerando-se ainda a comparação entre os valores das medianas de U.F.C. de fungos/mL após realização dos testes com as medianas obtidas pela avaliação das soluções mães/controles.

Os fungos que foram resistentes em todos os processos térmicos, independentes do seu valor percentual foram: *C. krusei* e *Rhodotorula* spp., sendo que o único sensível em todos os processos térmicos foi *Penicillium* spp.

Craven e Macauley (1992) avaliaram a presença de leveduras em leite pasteurizado, encontrando nas amostras armazenadas a 4°C, 4,3 % das mesmas e, nas amostras armazenadas a 7°C, 0,7 %.

Deve-se ressaltar ainda que, nos três procedimentos utilizados no presente estudo, não houve 100 % de sensibilidade por parte da totalidade dos isolados testados isto é, em todos os procedimentos realizados, sempre foi observada ocorrência de crescimento de colônias de fungos por parte de alguns ou muitos isolados. Todos os testes foram repetidos por cinco vezes para assegurar maior confiabilidade dos resultados obtidos. Entretanto, 269 (89%) isolados apresentaram

resistência em pelo menos um dos processos testados. Melville et al. (1999) estudaram a susceptibilidade de *Prototheca zopfii* (algas aclorofiladas) às pasteurizações lenta e rápida do leite e observaram que 85 % dos isolados testados apresentaram resistência em pelo menos um dos testes realizados, tendo concluído que, as variações de tempo e temperatura utilizados nos procedimentos de tratamento térmico, poderiam determinar variações na eficiência do método de pasteurização relativos a estes microrganismos.

Quase todos os fatores que envolvam a presença de fungos em leite estão relacionados de alguma forma com os aspectos de higiene, em diferentes estágios na produção leiteira. No caso da presença de fungos em leite já pasteurizado, principalmente quando considerado o procedimento de pasteurização rápida e tendo em vista que os resultados apresentados neste estudo mostraram resistência de 72,18 % dos fungos testados nesta metodologia, dever-se-ia proceder a avaliações mais cuidadosas, com intuito de minimizar a possibilidade de persistência destes microrganismos após realização de tal procedimento.

Os cuidados em relação à qualidade do leite pasteurizado dependem de muitos fatores, desde a coleta até o consumo, isto inclui qualidade microbiológica do leite cru, condições de pasteurização, condições higiênicas deficientes de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem e matéria prima com a contaminação excessiva (DEETH, 1986; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1981; SIQUEIRA, 1985).

A resistência de leveduras e fungos filamentosos após tratamento térmico representa um problema para o leite bem como para seus derivados. A presença destes microrganismos no leite é indesejável, pois podem influenciar as características organolépticas de derivados lácteos como os queijos, por exemplo

(JODRAL et al., 1993). Além disso, a contaminação destes produtos com estes microrganismos pode representar uma potencial via de transmissão dos mesmos, bem como de suas toxinas para o homem.

Arizcun (1996) analisou 6 amostras de queijo, e demonstrou que os níveis de fungos foram acima de 100 U.F.C./g (nível recomendado pelo Centro Nacional de Alimentação de Madrid para estes tipos de queijo). Vasquéz-Belda (1995) relatou a presença de fungos toxigênicos em queijos com alta umidade e consistência mole.

Além dos queijos, outro derivado lácteo bastante consumido e que pode sofrer influência da presença de fungos é o iogurte. Mateos-Garcia et al. (1983) isolaram fungos filamentos em iogurtes, assim como Jordano et al. (1989) isolaram algumas espécies de *Aspergillus* nestes mesmos produtos. Li e Li (1998) ao analisar amostras de iogurte verificaram um total de 67,33 % das mesmas contaminadas por fungos filamentos e leveduras, apresentando uma média de 39,5 10^2 U.F.C./mL para os fungos filamentosos e incontáveis para as leveduras.

Por sua vez Suzzi et al. (2003) isolaram um total de 179 leveduras em amostras de manteigas, as mais freqüentes, foram identificadas como *Trichosporon asahii* (45), *Candida parapsilosis* (33), *Rhodotorula mucilaginosa* (32), *Candida iconspicua* (29).

Segundo Jodral et al., (1993), uma cepa de *Aspergillus* isolada a partir de leite pasteurizado, produziu aflatoxina “in vitro”, o que reforça a importância da presença destes agentes e/ou produtos oriundos de seu metabolismo no leite, particularmente do produto consumido “in natura”, obtido diretamente dos latões nas propriedades de exploração leiteira ou a partir de distribuidores de leite clandestino, sem ser submetido a qualquer tipo de tratamento. Uma grande preocupação neste estudo é além de comprovar a presença dos fungos em leite e seus derivados, é

alertar sobre os riscos que a população pode sofrer, consumindo estes produtos com micotoxinas. Apesar de não haver a comprovação da presença de toxinas no leite, não significa que esta seja ausente, pois os estudos relacionados são poucos.

Skrinjar et al. (1990) estudaram a presença de aflatoxina B1 e M1 em amostras de leite, embora as mesmas não tenham sido detectadas. Por sua vez, Corrêa et al. (1997), realizaram análises micotoxicológicas em 144 amostras de leite cru, em 4 regiões leiteiras do Estado de São Paulo, sendo que não foi verificada a presença de aflatoxinas M1 e M2, mas acredita-se que as condições favoráveis ou desfavoráveis à produção da mesma se alterem de um período para outro.

Os fungos também podem estar presentes em leite de humanos, como observaram Nova et al. (2002), que estudaram 821 amostras de leite humano. Dos 48 isolados, 43 tiveram valores acima de 10^3 UFC/mL. Os fungos filamentosos mais isolados foram *Aspergillus niger* (6,3 %), *Aspergillus* spp. (4,2 %) e *Penicillium* spp (60,4 %). Suspeita-se que a presença dos fungos filamentosos no leite humano esteja relacionada com as más condições de higiene durante o processo de armazenamento nos “bancos de leites”. Por sua vez, Serafini et al. (2003) coletaram 338 amostras de leite humano em um banco de leite em uma maternidade de Goiânia, Estado de Goiás, Brasil, sendo que em 22,2 % das amostras houve o crescimento de leveduras e fungos filamentosos.

O presente estudo permitiu verificar que os fungos estão presentes no leite cru. A resistência de leveduras e fungos filamentosos após tratamento térmico representa um problema para o leite bem como para seus derivados, pois estes agentes podem causar doenças bem como podem interferir com os procedimentos de elaboração de produtos lácteos.

Particularmente no que tange o leite cru comercializado clandestinamente, considerando-se a inexistência de qualquer tipo de fiscalização e/ou controle higiênico-sanitário dos animais que estão envolvidos com a produção deste tipo de leite, assim como do processo de obtenção, transporte e comercialização, os achados deste estudo constituem-se em motivo de preocupação, principalmente em função do risco representado pelo consumo deste produto sem que tenha sido previamente submetido à fervura, particularmente quando considerados indivíduos debilitados ou imunossuprimidos que são os mais susceptíveis às micoses oportunísticas.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos do projeto e os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- ✓ Foi isolada uma grande variedade de gêneros e espécies de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de leite de leite cru analisadas.
- ✓ Os fungos isolados neste estudo estão associados a micoses oportunísticas.
- ✓ Não houve diferença estatisticamente significante entre as medianas das quantidades de unidades formadoras de colônias de fungos/mL de leite das diferentes procedências (tanque de refrigeração, latão de fazenda, e latão de distribuidor) indicando que o nível de contaminação por fungos nas amostras destas três origens foi similar.
- ✓ O processo de pasteurização rápida foi o procedimento no qual houve maior resistência por parte dos isolados de leveduras e fungos filamentosos submetidos ao teste na metodologia aplicada, seguido pelo processo de fervura e o de pasteurização lenta.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALTERTHUM, F.; CARVALHAL, L. **Controle dos microrganismos.** [S.l.: s.n.], 1999. cap. 7, p. 75 – 86.

ANAISSIE, E. J.; BODEY, G. P.; RINALDI, M. G. Emerging fungal pathogens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 8, p. 323-330,1989.

ANDERSON, K. L.; SMITH A. R.; GUSTAFSSON B. K.; SPAHR, S. L.; WHITMORE, H. L. Diagnosis and treatment of acute mastitis in a large dairy herd**. Journal of the American Veterinary Medical Association,** v. 1, n. 187, p. 690-693, 1982.

ANDRADE, M. A. Mastite bovina sub-clínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. **Revista Vet News**, n. 49, p.10-16, 2001.

ARAÚJO, W. N.; SILVA, M. H.; MARTINEZ, T. C. N; BANAS, S. L. B.; SILVEIRA, V. F.; Determinação do número de fungos filamentosos e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador – Bahia; **Revista Brasileira Saúde Produção Animal,** v. 2, n. 1, p. 10-14, 2001**.**

ARIZCUN, C. Estudio de los quesos com denominacion de origen rocal e idiazabal elaborados em Navarra. **Alimentaria,** p. 69-71, 1996.

BADINI, K. B. **Estudo das características físico-químicas, microbiológicas e dos hábitos de consumo do leite cru comercializado clandestinamente nos municípios de Botucatu/SP e São Manuel/SP, 1993.** 124 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

BANSAL, B. K.; SINGH, K. B.; JAND, S. K. Incidence of clinical mastitis in dairy animals. **Indian Journal of Dairy Science,** New Delhi, v. 43, p. 355-358, 1990.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi,** 3. ed., Minneapolis: Burgess Publishing Co, 1972.

BEHMER, M. L. A. A. **Tecnologia do leite,** 15. ed., São Paulo: Ed. Nobel, 1991**.**

BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; GANDRA, C. R. P. Mamite bovina causada por levedura-*Candida albicans*. In: SEMANA DE VETERINÁRIA, 2; 1983. São Paulo. **Resumos.** São Paulo: USP, 1983. p. 67.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Veterinary medicine**. 7. ed., Londres: Ed. Baillière Tindall, 1989, p.501-559.

BRANDÃO, S. C. C. Leite: legislação, reponsabilidade e saúde pública. **Revista Balde Branco**, v. 360, p. 68-71, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal:** aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29-3-52, alterado pelo Decreto nº1255, de 25-6-62. Brasília, D.F. Ministério da Agricultura. 1980. p. 89. (Inspeção Industrial e Sanitária do Leite e Derivados).

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. Publicado no **Diário Oficial da União** de 20/09/2002. Disponível em: http://200.252.165.21/das/dipoa/in_51b_2002.htm. Acesso em: 20 out. 2004.

CALIFORNIA DEPARTMENT of FOOD and AGRICULTURE, **Dairy industry statistcs**: manufacture of dairy products, milk production, utilization and prices. California Department Food and Agriculture: Sacramento. 25 f., 1996.

CHHABRA, D.; MOGHE, M. N.; TANWANI, S. K.; SHARDA, R. Studies on mycotic mastitis in cattle, **Indian Veterinary Journal,** v. 76, p. 1043-1045, 1999.

COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections**, 9. ed. London: [s.n.], v.4, 1998.

CORBO, M. R.; LANCIOTTI, R.; ALBENZIO, M. Singaglia M occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region, **Intitute Journal Food Microbiology**, v. 69, n.19, p. 147-52. 2001.

CORRÊA, B.; GALHARDO, M.; COSTA, E. O.; SABINO, M. Distribution of moulds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. **Revista de Microbiologia,** v. 28, p. 279-283, 1997.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 1, p. 3-9, 1998.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. Estudo etiológico da mastite bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária,** Rio de Janeiro, v.17, p. 156-158, 1995.

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

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Relato de caso de consumo de queijo fresco contaminado com *Prototheca* spp. **Núcleo de Apoio à Glândula Mamária**, São Paulo, v. 1, p. 9-10, São Paulo, 1998.

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

CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microrganismos in pasteurised milk after refrigerated storage 1. Identification of types. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, p. 38-45, 1992.

CRUZ, L. C. H. **Micologia veterinária**. Itaguaí: Imprensa Universitária, 1985, p.191-192.

DEETH, H. C. The appearance, texture, flavour and defects of pasteurised milk. **In International Dairy Federation Document** 200. Monograph on Pasteurised Milk. Brussels: [S.l.:s.n.] 1986, p. 22-6.

DESMASURES, N.; OPPORTUNE, W.; GUEGUEN, M. *Lactococcus* spp., Yeasts and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 643-646, 1997.

FARNSWORTH, R. J. Significance of fungal mastitis. **Journal of the american veterinary medical association** v. 170, p. 1173-1174, 1977.

FERREIRO, L.; FERREIRO, C. L. R.; BANGEL J. R.; SOARES, H. C.; MOOJEN, V.; FERNANDES, J. C. T. Mastite bovina na grande Porto Alegre, RS-Brasil: Agentes etiológicos isolados durante o período 1982-1985. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS,** Porto Alegre, n. 13, p. 81, 1985.

FONSECA, L. F. L. F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite,** São Paulo, Ed. Lemos, 2000. 13 f.

GIESECKE, W. H.; NEL, E. E.; VAN DEN HEEVER , J. W. Blastomycotic mastitis in south in South África. **Journal of the South African Veterinay Medical Association** v. 39, p. 69-85, 1968.

GILLESPIE, J. H.; TIMONEY, J. F.; **Hagan and Bruner´s Infectious Diseases of Domestic Animals,** 7. ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1981, p. 394-395.

GODKIN, M. A; LESLIE, K. E. Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: a brief review. **Canadian Veterinary Journal,** v. 34, p. 601-605, 1993.

GONZALES, R. N.; WILSON, D. J.; SICKLES, S. A.; ZURAKOWSKI, M. J.; WEYBRECHT, P. M.; NALSH, A. K. Outbreaks of clinical mastitis caused by *Trichosporon beigelii* in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Assocciation** v. 218, n. 2, p. 238-242, 1986.

GOSTOVIC, G.; PRUSAC, L. Aspects of hygiene of bulk milk related to the hygiene of milk tankers, mastitis and milk quality, **Vrnjacka Banja**, Yugoslavia, v. 50, n. 6, p. 409-412, 1996.

GRAPHPAD INSTAT (1992-1998). “Software”empregado para análise estatística.

GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Uncommon opportunistic fungi: New nosocomial threats. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 7, p. 8-24, 2001.

HARIDY, M. S. A. Yeast flora of raw milk in El Minia City-Egypt, **Cryptogamie-Mycologie,** Egypt, v. 13, n. 4, p. 321-326, 1992.

HEADRICK, M. L.; TIMBO, B.; KLONTZ, K. C.; WERNER, S. B. Profile of raw milk consumers in California. **Public Health Reports,** v. 112, n. 5, p. 418-422, 1997.

HIBBS, C. M. Nocardia mastitis in a large dairy herd. **American Association of Veterinary Laboratory Diagnosis**. v. 23, p. 73-77, 1980.

HOFFAMAN, W.; IMMER, J.; LANZ, F. Die pilz mastitis beim rind. **Wiener Tieraerztlicher Wochenschrift,** Vienna, v. 52, p. 385-391, 1965.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, Document 130. Factors affecting the keeping quality of heat treated milk. Brussels, 1981.

JAND, S. K.; DHILON, S. S. Mastitis caused by Fungi. **The Indian Veterinary Journal**. v. 52, p. 126-128, 1975.

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

JORDANO, R.; JODRAL, M.; MARTINEZ, P.; SALMERON, J.; POZO, R. Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in yogurt. **Journal of Food Protection** v. 52, p. 823-824, 1989.

KADIC, S.; HAJSIG, M.; RIZ NAR S. Kvasci in vimeku krava u razlicitim fazama laktacije. **Veterinarski Archiv**, v. 53, p. 225-231, 1983.

KELLER, B.; SCHEIBL, P.; BLECKMANN, E.; HOEDEMAKER, M. Differentiation of yeasts in mastitis milk, **Mycoses**, v. 1, p. 47-49, 2000, supplement. 43.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica.** 2. ed. São Paulo: Premier, 1999, 46 f.

KIM, J. W.; Studies on the bacteriological condition in the milking environment. **Korean Journal of Dairy Science**, Korea, v. 17, n. 2, p. 113-122, 1995.

KIRK, J. H; BARTLETT, P. C. Bovine mycotic mastitis**. Compendium of Food Animal,** v.8, n.11, p. 106-110, 1986.

KIRK, J. H.; BARTLETT, P. C.; NEWMAN, J. P. *Candida* mastitis in dairy herd. **The Compendium on Continuing Education in Practices Veterinary,** v. 8, p. 150-152, 1986.

KLOSSOWSKA, A.; MALINOWSI, E. Pathogens in raw milk which affect humans. **Medycyna Weterynaryjna**, Polond, v. 57, n.1, p. 28-31, 2001.

KREEGER-VAN-RIG, N. J. W. **The Yeasts: a taxonomic study**. 3. ed. Amsterdan: Elsevier Science Publisher, 1984, 41 p.

LACAZ, C. S., **Micologia Médica:** prefácio do prof. Pablo Negroni, 5. ed. Brasília: Sarvier, 1973, p. 387.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Fungos actinomicetos, algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998, 87 p.

LAGNEU, P. E.; LEBTAHI, C.; SWINNE, D. Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium, **Mycopathologia,** v. 135, n. 2, p. 99-102, 1996.

LANGONI, H.; CABRAL, K. G.; TONIN, F. B.; GIMENES, S. M. Importância das leveduras na mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha,** v. 3, n. 2, p. 207-209, 1997.

LANGONI, H.; CORRÊA, C. N. M.; CORRÊA, W. M. Mastites bovinas por *Candida* e *Klebsiella.* **Revista Brasileira de Medicina Veterinária,** Rio de janeiro, v.7, p. 203-204, 1985.

LARONE, D. H. **Medically important fungi. A guide to identification.** 3. ed. Washington: ASM Press, 1995, 10 p.

LI, F.; LI, Y. - Study on the contamination level and the tolerable limit of mould and yeast in yoghurt**.** **Wei Sheng Yan Jiu.** v. 27, n. 4, p. 257-258, 1998.

LODDER. L. **The Yeasts:** Taxonomic Study**,** 2. ed. Amsterdam: North Holland Publishing Co, 1970, 48 p.

LOFTSGARD, G.; LINDQVIST, K. Bovine mycotic mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica,** v. 1, p. 201-220, 1960.

LOKEN, K. I., Infection of the bovine udder with *Candida Tropicalis* . **Journal of the American Veterinary Medical Association** v. 134, p. 401-403, 1959.

MARDAMOOTOO, P. Isolation, characterization and aetiology of yeast (*C. tropicalis*) From three quarters of a lactating cow. **Tropical Veterinary Journal,** Ibadan, v. 1, p. 58-62, 1983.

MATEOS-GARCIA, A.; SUAREZ-FERNANDEZ, G. Micoflora contaminante del yogurt: aislamiento, comprobación de toxicidad e inoculación de espécies aflatoxigenicas. **Alimentaria**. v.48, p. 39-40, 1983.

MEHNERT, B.; ERNST, K.; GEDEK, W. Hefen als mastitiserryer bein rind. **Zentralblatt Veterinarmed**, v. 11, p. 97-121, 1964.

MELVILLE P. A.; WATANABE E. T.; BENITES N. R.; RIBEIRO A. R.; BUENO J. A.; GARINO F.; COSTA E. O. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to pasteurization of milk. **Mycopathologia,** v. 146, p. 83-89, 1999.

MORCOS, M. B.; SOLIMAN, S. S. E.; ELYAS, H.; ALI, S. M.; AMER, A. A. Studies on mastitis in cows and buffalos with reference to mycotic infections of udder, **Assiut Veterinary Medical Journal,** v. 22, n. 44, p. 51-62, 1990.

MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENCARONI, G.; BONCIO, L.; PIERGILI FIORETTI, D. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacterias). **Zentralbl Veterinarmed** (B), Italy. v. 3, p. 129-132, 1998.

MÓS, E. N.; BIRGEL E. H.; ARAUJO, W. P.; MENDES, M. J. S. Mamite bovina devido à levedura do gênero *Candida*. **Revista de Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo,** São Paulo, v. 15, p. 161-164, 1978.

MUTUKUMIRA, A. N.; FERESU, S. B.; NARVHUSJA, ABRAHANSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by smallholder farmers in Zimbabwe, **Journal of Food Protection**, Zimbabwe. v. 59, n. 9, p. 984-987, 1996.

NAKAE, T.; KATAOKA, K. YONEYA, K. Fungal distribution in milk and milking environment. **Japanese Journal of Zootechny Science**, v. 47, n. 7, p. 402-410, 1976.

NOVA, K. F. R.; ALMEIDA, J. A.; SANTOS, M. J. Contamination of expressed human milk by mycelia fungi. **Wankeb Journal Pediatric**, v. 78, n. 3, p. 183-184, 2002.

PHILPOT, W. N. Economics of mastitis control. In: JARRETT, J. H. (Ed.). **Veterinary Clinics From North America**, v. 6, p. 233-245, 1984.

PIANTA, C. Mastite bovina causada por *Candida albicans*. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 14., 1994, Acapulco. **Proceedings.** Acapulco, 1994, p. 41.

QUEIROZ, J. C. **Avaliação sanitária do leite cru distribuído nos Municípios de Juquitiba e Itapecerica da Serra, São Paulo, 1990-1992**: estudo experimental. 1995. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

REBHUN, W. C. Diseases of teats and udder. In: **Diseases of Dairy Cattle**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995, p. 253-308

REED, B. A.; GRIVETTI, L. E. Controlling on-farm inventories of bulk-tank raw milk-an opportunity to protect public health , **Journal of Dairy Science,** v. 83, n. 12, p. 2988-2991, 2000.

RICHARD, J. L; MCDONALD, J. S.; FICHTNER, R. E.; ANDERSON, A. J. Identification of yeasts from yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. **American Journal of Veterinary Research,** Schaumburg, v. 41, p. 1991-1994, 1980.

ROBINSON, R. K. (Ed.). **Dairy microbiology.** Departamento of food science, university of Reading, UK. London; New York: Elsevier Applied Science Publishers, v. 1, 1989, 38 p.

RUSSOFF, L. L. Milk: it's nutritional value at a low cost for people of all ages. **Journal of Dairy Science**, v. 53, 1970, 25 p.

RUSSOFF, L. L. The miracle of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 38, p. 1057-1068, 1955.

SABOIS, A.; BASILICO, J. C.; SIMONETTA, A. Microbiological qualits of raw milk, III incidence of aerobic and anaerobic spore-forming bactéria, yeasts and fungi, **Revista Argentina de Lactologia**, Spanish. v. 3, n. 5, p. 79-90, 1991.

SCHALLIBAUM, M.; NICOLET, J.; KONIG, H. *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* as causal agents of bovine mastitis. **Sabouraudia**. v. 18, p. 33-38, 1980.

SCHALM, O. W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine Mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971, 31 p.

SERAFINI, A. B.; ANDRE, M. C.; RODRIGUES, M. A.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C. O.; CAMPOS, M. R.; MONTEIRO, E. C.; MARNTINS, F.; JUBE, T. F. Microbiological quality of human lik from Brazilian milk bank. **Revista Saúde Publica,** v. 37, n. 6, p. 775-779, 2003.

SHARMA, S. D.; RAI, P.; SAXENA, S. C. A survey of mycotic infections of udder in clinical and subclinical cases of mastitis in cows and buffaloes. **Indian Veterinary Journal,** v. 54, p. 284-287, 1977.

SIMON J.; NICHOLS, R. E.; MORSE, E. V. An outbreack of bovine cryptococcosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association** v. 122, p. 31-35, 1953.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos,** Brasília: EMBRAPA, SPJ, Rio de Janeiro: Embrapa, CTAA, 1995, 159 p.

SKRINJAR, M.; STUBBLEFIELD, R. D.; VUJICID, I. F.; JURIC, V.; STOJANOVIC, E. Contamination of cattle feeds by aflatoxin B1, ochratoxin A e zearalenone, **Acta Veterinária Beograd,** Yugoslavia**,** v. 40, n. 2, p. 105-111, 1990.

STUART, P. An outbreack of bovine mastitis from which yeast were isolated, and attempts to reproduce the condition experimentally. **The Veterinary Record**, v. 17, n. 63, p. 314, 1951.

SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G. (Eds.). **Guide to Clinically Significant Fungi.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1998, 12 p.

SUZZI, G.; SABIRONE, M.; MARTUSCELLI, M.; GATTI, M.; FORNASARI, M. E.; NEVIANI, E. F. Yeasts associated with manteca, **Journal ems Yeast**, v. 3, n. 2, p. 159-166, 2003.

SWINNE, D.; DEKA, K. E; ASSOGBA, A.; DESMET, P. Identification of yeasts from individual farm tank milk samples in Belgium, **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift,** Belgium. v. 66, n. 3, p. 129-130, 1997.

TEXDOF, I. Untersuchungen uber das vorkommen von schimmelpilzen in anlieferungsmilch. **Archiv. Lebensmittelhyg**. v. 5, p. 99-100, 1972.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia.** 3. ed., São Paulo: Atheneu, 1999, p.239-285.

TUCKER, E. W. Case report on yeast infections of the bovine udder. **The Cornell Veterinarian**, v. 44, p. 79-85, 1954.

VAN DAMME, D. M. Use of miconazole in treatment for bovine mastitis. **V.M. SAC**. v. 78, n. 9, p. 1425-1427, 1983.

VARTIVARIAN, S. E.; ANAISSIE, E. J.; BODEY, G. P. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 487-491, 1993.

VASQUEZ-BELDA, B. Incidência de hongos toxigenicos em queserias de la zona de Arzua (La Coruña España). **Food Science and Technology International,** v. 1; p. 91-95, 1995.

VON ARX, J. A. The genera of fungi sporulating in pure culture. **Journal Cramer**,. Germany, 1974, 11 p.

WYLLIE, T. D.; MOREHOUSE, L. G.; Micotoxic fungi and chemistry of mycotoxins. **Marcel Dekker**, New York , v. 105, n. 6, p. 459-463, 1977a.

WYLLIE, T. D.; MOREHOUSE, L. G.; Micotoxicosis of domestic and laboratory animals: poultry and aquatic invertebrates and vertebrates. New York: **Marcel Dekker**, v. 105, n. 6, p. 45-60, 1977b.

YEO, S. C.; CHOI, W. P. Studies on yeast-like fungi associated with bovine mastitis. **Korean Journal of Veterinary Research,** Seoul, v. 22, p. 121, 1982.