

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
MESTRADO EM NUTRIÇÃO**



ANGELA MATILDE DA SILVA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DOS CONTAMINANTES FÚNGICOS EM LEITE DE
TANQUES DE EXPANSÃO PRODUZIDOS NO ESTADO DE ALAGOAS**

**MACEIÓ - ALAGOAS
2014**

ANGELA MATILDE DA SILVA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO DOS CONTAMINANTES FÚNGICOS EM LEITE DE
TANQUES DE EXPANSÃO PRODUZIDOS NO ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Cyro Rêgo Cabral Júnior
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sampaio de Medeiros

MACEIÓ - ALAGOAS

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade

A474c Alves, Angela Matilde da Silva.
Caracterização dos contaminantes fúngicos em leite de tanques de expansão produzidos no estado de Alagoas / Angela Matilde da Silva Alves. – 2014.
42 f. : il.

Orientador: Cyro Rêgo Cabral Júnior.
Co-Orientadora: Elizabeth Sampaio de Medeiros.
Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas.
Faculdade de Nutrição, Maceió, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Fungos - Contaminação. 2. Tanques de expansão – Higiene sanitária.
3. Leite – Análise. 4. Leite – Contaminação. I. Título.

CDU: 612.39:637.133



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Campus A. C. Simões
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/fax: 81 3214-1160

PARECER DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE
DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DOS CONTAMINANTES FÚNGICOS EM LEITE DE
TANQUES DE EXPANSÃO PRODUZIDOS NO ESTADO DE ALAGOAS**

por

Angela Matilde da Silva Alves

A Banca Examinadora, reunida aos 26 dias do mês de julho do ano de 2014, considera o(a) candidato(a) **APROVADO(A)**.

Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sampaio de Medeiros
UFRPE

Prof^a. Dr^a. Karla Patrícia Chaves da Silva
UFAL

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva
UFRPE

AGRADECIMENTOS

A JEOVÁ Deus por tudo que Ele tem feito por mim e por me amparar nos momentos difíceis, me dando força interior para superar as dificuldades e me suprimindo em todas as minhas necessidades.

Aos meus orientadores Professores Cyro Rêgo e Elizabeth Sampaio, pela orientação e confiança depositada.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo. Principalmente minha Mãe que sempre foi um exemplo de força e superação para mim, bem como, meu amado esposo Alex, que em todo o momento estava do meu lado. Não esquecendo da minha pequena Maísa que desde à barriga estava comigo em todas as minhas ansiedades.

A Professora Dr^a. Ângela Froehlich por sua ajuda e amizade, e por acreditar e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo de profissional a ser seguido. Sua ajuda foi importante para a realização deste trabalho.

Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

Aos amigos Hugo, Allana Patrícia, Karla Daniele, Valéria e Genildo que sempre estiveram do meu lado dando força, apoio e ajuda prática.

Ao LACEN pela ajuda com os reagentes.

A minha colega de mestrado que se tornou minha amiga pessoal, Quitéria Gomes por compartilhar em todas as etapas desse processo me ajudando a continuar, mesmo quando o desânimo me pedia para parar.

Ao IFAL na pessoa do professor Johnnatan Freitas e Cecília Dantas pelo apoio técnico excepcional.

RESUMO GERAL

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo realizar a contagem de fungos filamentosos e leveduras e caracterizar os contaminantes fúngicos do leite proveniente de tanques de expansão produzidos no Estado de Alagoas, foi realizada sinergicamente a avaliação das condições higiênico-sanitárias desses tanques. Para coleta do leite foram utilizados recipientes de vidro previamente esterilizados. Logo após a coleta, os recipientes foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para posterior análise no laboratório de Inspeção de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas. As coletas foram realizadas em 23 municípios em 100% dos tanques comunitários de uma cooperativa do estado de Alagoas. As coletas foram realizadas nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2013. Em cada momento foram coletadas 45 amostras totalizando 135 amostras de leite. Para realização da contagem e identificação dos fungos filamentosos e leveduras utilizou-se a metodologia proposta pela APHA (American Public Health Association). As amostras foram semeadas em meio DRBC (ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol). Utilizou-se a diluição 10^{-3} . As placas foram incubadas em temperatura ambiente (25°C) durante sete dias. Das 135 amostras analisadas apenas 06 amostras (4,44%) não apresentaram contaminação por fungos filamentosos e leveduras, 26 amostras (19,26%) apresentaram alto índice de contaminação. Mais de um terço das amostras 49/135 (36,3%) tiveram uma média de $3,58 \times 10^5$ UFC/mL de leite. Entre os fungos isolados, destacam-se *Penicillium* spp. 18/135 (13,33%), *Aspergillus* spp. 85/145 (62,96%), *Absidia* sp 32/135 (23,70%), *Fonsecaea* sp 45/135 (33,33%) e *Candida* spp 19/135 (14,07%), sendo estatisticamente maiores quando comparadas com as dos demais fungos isolados. Devido à alta contagem de fungos filamentosos e leveduras, e à variedade de seus contaminantes fúngicos encontrados nesse estudo, sugere-se a adoção de meios eficientes para reduzir a multiplicação desses microrganismos, com a finalidade de evitar os problemas causados por seus metabólitos.

Palavras-chave: Leite. tanques comunitários. contagem. contaminantes fúngicos.

ABSTRACT

The objective of this study hold the count of yeasts and molds and characterize fungal contaminants of milk produced from expansion tanks in the State of Alagoas, was performed synergistically evaluating the sanitary conditions of these tanks. For collection of milk glass containers were used previously sterilized. Immediately after collection, the containers were packed in insulated boxes containing ice packs for later analysis in the laboratory of Food Inspection, Federal University of Alagoas. Sampling was performed in 23% of the 100 municipalities in community tanks of a cooperative state of Alagoas. The collections were made in the months of January, February and May 2013 In every moment 45 samples totaling 135 milk samples were collected. To perform the counting and identification of yeasts and molds used the methodology proposed by the APHA (American Public Health Association). The samples were plated on DRBC medium (agar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol). Was used in dilution 10⁻³. The plates were incubated at room temperature (25 ° C) for seven days. Of the 135 samples analyzed only 06 samples (4.44%) were not contaminated by yeasts and molds, 26 samples (19.26%) showed high contamination. More than a third of the samples 49/135 (36.3%) had an average of 3,58x10⁵ CFU / ml of milk. Among the fungi isolated, stand out *Penicillium* spp. 18/135 (13.33%), *Aspergillus* spp. 85/145 (62.96%), *Absidia* sp 32/135 (23.70%), *Fonsecaea* sp 45/135 (33.33%) and *Candida* spp 19/135 (14.07%), being significantly greater than compared with those of other fungal isolates. Due to the high count of yeasts and molds, and the variety of its fungal contaminants found in this study suggest the adoption of efficient to reduce the multiplication of microorganisms, in order to avoid the problems caused by its metabolites means.

Keywords: Milk. community tanks. counting. fungal contaminants.

LISTA DE FIGURAS

Página

Artigo de resultados

Figura 1	Colônias isoladas de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de leite de tanques de expansão comunitário no Estado de Alagoas no ano de 2013.....	34
Figura 2	Microscopia das colônias isoladas de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de leite de tanques de expansão comunitário no estado de Alagoas no ano de 2013	35

LISTA DE TABELAS

1º artigo: artigo de resultados

Tabela 1	Média de Contagem de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de leite provenientes de tanques de expansão comunitários localizados em 23 municípios do Estado de Alagoas nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2013.....	31
Tabela 2	Comparação da mediana em UFC, das amostras de leite provenientes de tanques de expansão comunitários localizados entre as 3 diferentes mesorregiões do Estado de Alagoas nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2013, estratificado por mês da coleta.....	31
Tabela 3	Comparação entre as frequências de amostras de leite de tanques de expansão comunitários dos 23 município do Estado de Alagoas com incontáveis UFC entre as 3 diferentes mesorregiões, estratificado por mês da coleta (janeiro, fevereiro e maio de 2013).....	32
Tabela 4	Frequência de isolamento dos fungos em amostras de leite provenientes de tanques de expansão comunitários localizados em 23 municípios do Estado de Alagoas nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2013.....	34

Lista de abreviaturas

AFL	Aflatoxinas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
DRBC	Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IN	Instrução Normativa
RDC	Resolução Diretoria Colegiada
UFC	Unidade Formadora de Colônia
sp.	Espécie
spp.	Espécies

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução Geral	10
2. Revisão de Literatura	12
2.1 Regiões de Alagoas	12
2.2 Leite	12
2.3 Fungos	15
2.4 Fungos e a Saúde Pública	17
Referências	19
3. Artigo de resultados	25
3.1 Introdução	27
3.2 Material e Métodos	28
3.2.1 Local e coleta das amostras	28
3.2.2 Análise microbiológica	28
3.2.3 Identificação dos contaminantes fúngicos do leite	29
3.2.4 Delineamento Experimental	29
3.3 Resultados e Discussão	30
4. Conclusão	40
Referências	41

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

Por ser um alimento completo, do ponto de vista nutricional, o leite é um substrato ideal para o desenvolvimento de diversos microrganismos (CALLON et al., 2007; DELAVENNE et al., 2011). A presença e/ou quantidade desses está relacionada à qualidade de matéria prima, à tecnologia de fabricação utilizada e à distribuição do produto (SPANAMBERG et al., 2008).

Os fungos, quando presentes no leite, secretam enzimas hidrolíticas como proteinases, lipases e fosfolipases que agem sob o substrato alterando suas características físico-químicas, acarretando prejuízo para a indústria. Podendo estar correlacionados ao nível de higiene da ordenha e do ambiente, e também podem estar associados à mastite infecciosa. Entre os contaminantes fúngicos, as leveduras são mais frequentemente relacionadas às infecções da glândula mamária em bovinos de leite. Na pecuária leiteira, a mastite é um dos grandes problemas para a indústria por reduzir a qualidade e quantidade de leite, com alteração de suas características físico-químicas, trazendo perdas econômicas (SPANAMBERG et al., 2008; NÖRNBERG, TONDO, BRANDELLI, 2009; ZARAGOZA et al., 2011).

Fungos pertencentes a uma diversidade de gêneros e espécies podem causar sérios danos à saúde humana e animal, como: alergias, infecções, micoses oportunistas, sendo essas superficiais ou profundas, e cutâneas (FLORES, ONOFRE, 2010; SOUZA et al., 2010; CRIADO et al., 2011). Os fungos produtores de micotoxinas, que são metabólitos secundários, provocam grandes perdas econômicas e representam um risco potencial ao agronegócio brasileiro (QUEIROZ et al., 2009).

Objetivou-se com esse estudo, realizar a contagem de fungos filamentosos e leveduras e caracterizar os contaminantes fúngicos do leite proveniente de tanques de expansão produzidos no Estado de Alagoas, foi realizada sinergicamente a avaliação das condições higiênico-sanitárias desses tanques.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AS REGIÕES DE ALAGOAS

O estado de Alagoas divide-se em 102 municípios, inseridos, em três Mesorregiões – Sertão, Agreste e Leste Alagoano. As três Mesorregiões, dividem-se em treze Microrregiões, sendo: quatro no Sertão (Serrana do Sertão Alagoano, Santana de Ipanema, Alagoana do Sertão do São Francisco e Batalha), três no Agreste (Palmeira do Índios, Arapiraca e Traipu), e seis no Leste Alagoano (Serrana dos Quilombos, Mata Alagoana, Litoral Norte Alagoano, Maceió, São Miguel dos Campos e Penedo) (IBGE, 2014).

O estado de Alagoas é o sexto maior produtor de leite do Nordeste, produzindo só em 2010 um total de 231.367.000 litros de leite, representando 0,8% da produção nacional (BRASIL, 2011). O polo da bacia leiteira do Estado constitui-se em 17 municípios, sendo que 12 estão localizados no sertão alagoano e 5 no agreste, com aproximadamente 2.500 produtores, gerando 25.000 empregos diretos, sendo relevante para a economia do Estado (BNB, 2005).

2.2 LEITE

A Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011, define leite como o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições adequadas de higiene, de vacas sadias bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2011).

Do ponto de vista nutricional o leite é um alimento completo, sendo o seu consumo fundamental para o pleno desenvolvimento da criança e por isso deve ser preservado e promovido (WHO, 2009).

Por ser um alimento completo, o leite é facilmente susceptível à contaminação microbiana. Alguns desses agentes são os fungos, e visto que

leites contaminados por fungos têm suas características físico-químicas e organolépticas alteradas, as indústrias produtoras de derivados lácteos buscam matérias-primas de boa qualidade (SPANAMBERG et al., 2008; NÖRNBERG, TONDO, BRANDELLI, 2009).

A qualidade do leite cru produzido está intimamente relacionada à taxa de multiplicação dos microrganismos contaminantes. Diversos fatores extrínsecos podem influenciar na qualidade do leite, como: clima quente, estação chuvosa, alimentação animal, ambiente de ordenha, a qualidade bacteriológica da água utilizada, utensílios e equipamentos mal higienizados, sanidade dos ordenhadores e dos animais. Esses contribuem, de modo decisivo, para a qualidade microbiológica e composição química do leite. Sinergicamente, fatores importantes como boas práticas, alimentação animal, a higienização prévia dos tetos e do local de ordenha, que inclui teteiras, latões, ordenhadeira, piso e instalações adequadas são determinantes para a produção leiteira e redução da contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos no leite. Cabe ressaltar que tanques de resfriamento ou expansão mal higienizados ou não higienizados contribuem para o crescimento da população microbiana (YAMAZI et al., 2010; ROMA JÚNIOR et al., 2009; HECK et al., 2009; KORB et al., 2011).

No Brasil, somente a partir da década de 90, com a implementação da Instrução Normativa n. 51 de 2002, mais tarde substituída pela Instrução Normativa n. 62 de 2011, é que foi regulamentada a estocagem de leite cru refrigerado. Além da redução com os custos operacionais de produção, houve também redução na deterioração do leite devido aos microrganismos presentes. No entanto, com o passar dos dias sob refrigeração, o leite trazia problemas tecnológicos, isso porque os microrganismos continuavam suas atividades mesmo sob refrigeração. Isso acontecia, sobretudo, por fatores como deficiência na higienização do equipamento utilizado para manutenção do leite refrigerado (tanques de expansão) e animais com mastite. Portanto, procedimentos de higienização empregados na cadeia produtiva do leite constituem pontos críticos

para a obtenção de uma matéria-prima de alta qualidade (SANTOS et al., 2009; YAMAZI et al., 2010).

Com o aumento do acesso à informação, os consumidores preocupados com a segurança dos alimentos, têm exigido das indústrias, produtos de melhor qualidade, sendo também cobrado isso do produtor. Com o intuito de alcançar melhores resultados na qualidade microbiológica do leite, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), implementou normas nacionais de padrão de qualidade do leite, com a publicação da Instrução Normativa n. 62 de 2011, onde executa melhorias no sistema de coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel (YAMAZI et al., 2010). Porém, a contagem de microrganismos, só será baixa no leite cru refrigerado se este for produzido sob condições higiênicas adequadas (SANTOS et al., 2009).

A contaminação do leite por fungos, pode causar diversos problemas, entre eles estão as micotoxinas, que são metabolitos secundários dos fungos. Além das micotoxinas, também destacam-se outros problemas acarretados por leites contaminados por algumas espécies de fungos, esses podem ser de natureza alergênica ou até mesmo de natureza deteriorante, sendo prejudicial para as indústrias produtoras de laticínios que têm perda na qualidade de seus produtos, bem como, para os consumidores, que ingerem alimentos contaminados (FLORES, ONOFRE, 2010; SOUZA et al., 2010; CRIADO et al., 2011; SIGNORINI et al., 2012; KABAK et al., 2012).

O Brasil foi considerado o sexto maior produtor de leite do mundo (USDA, 2011). Segundo a EMBRAPA (2012), só em 2011 o aumento na produção foi de 4,5%. Os órgãos regulamentadores preocupados com a qualidade e segurança desse alimento, vêm intensificando a fiscalização nas indústrias de laticínios (PEREIRA et al., 2013). Embora haja aumento na produção, a instabilidade do mercado de leite leva pequenos produtores à venda de leite informal como alternativa de sobrevivência no mercado. Essa prática

representa um risco à saúde pública em virtude das doenças veiculadas por leite cru (PEREIRA et al., 2013).

2.3 FUNGOS

Os fungos são microrganismos amplamente presentes na natureza, estando em praticamente todos os ambientes. São classificados como fungos filamentosos e leveduras. Embora estejam classificados como fungos, os fungos filamentosos e leveduras são morfologicamente diferentes, e sua identificação é baseada quase que exclusivamente em sua morfologia tanto macro como microscopicamente. Macroscopicamente os fungos podem apresentar vários tipos morfológicos com colônias filamentosas, cotonosas ou algodoadas, pulverulentas e outras (fungos filamentosos) e as leveduras com colônias cremosas e com os mais diversos tipos de pigmentos (TANIWAK; SILVA, 2001).

As leveduras são unicelulares, ovais e geralmente maiores que as bactérias. No entanto, algumas são alongadas ou esféricas. Os fungos filamentosos são organismos multinucleados que aparecem como filamento. O corpo de um fungo filamentoso constitui-se em um micélio e esporos. O micélio é uma massa de filamentos rígidas das hifas essas são formadas de quitina, celulose e glicose. A reprodução das leveduras é assexuada, comumente por brotamento ou gemulação. Os fungos filamentosos se reproduzem por disseminação dos esporos (TANIWAK; SILVA, 2001).

A nutrição dos fungos ocorre por absorção, através do auxílio de enzimas, onde as moléculas orgânicas são quebradas em porções menores podendo ser

transportadas mais facilmente para dentro da célula. Dentre os bolores ou fungos filamentosos, de grande importância para a segurança de alimentos, destacam-se o *Penicillium* spp. e o *Aspergillus* spp. e dentre as leveduras a *Candida albicans*. (TANIWAK; SILVA, 2001).

Aspergillus sp. está amplamente distribuído no meio ambiente, onde cerca de 185 espécies de *Aspergillus* spp. foram identificadas e dessas, 20 são documentados por causar doença humana. A exposição a estes agentes pode levar à colonização, acarretando manifestações alérgicas ou a infecção invasiva dependendo de fatores adversos do hospedeiro. *A. fumigatus* é a espécie mais frequentemente associada a infecções cutâneas e sistêmicas. É manifestada por sintomas respiratórios, dores no tórax, respiração ofegante (KRISHNAN et al., 2008; ALANGADEN, 2011; MARTINO et al., 2009). A espécie mais ligada à produção de micotoxina é o *Aspergillus flavus*.

Muitas espécies pertencentes ao gênero *Penicillium* já foram utilizadas em pesquisas para aplicação na biotecnologia, na indústria farmacêutica e na fabricação de produtos derivados de leite. No entanto, algumas espécies são produtoras de compostos tóxicos como as micotoxinas. Também é de responsabilidade de algumas espécies de *Penicillium* perdas em diversos produtos agrícolas, dentre as quais destacam-se as frutas cítricas (YAHYAZADEH et al., 2008; LEE et al., 2011; GÓMEZ-SANCHIS et al., 2012).

Quando um fungo tem capacidade de formar micotoxina, são necessários alguns fatores favoráveis ao seu desenvolvimento, como: umidade, temperatura, presença de oxigênio, tempo para o crescimento fúngico, constituição do substrato, características genéticas e competição entre linhagens fúngicas (QUEIROZ et al., 2009). As espécies *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são provavelmente os mais significativos fungos de campo, produtores de micotoxinas (FAO, 2008).

Países desenvolvidos já perceberam que a redução dos níveis de micotoxinas em alimentos não só reduz os encargos financeiros sobre os

cuidados de saúde, como traz vantagens no comércio internacional como as exportações para outros mercados internacionais (SCHWARZER, 2009).

Candida é uma levedura que faz parte da microbiota do corpo humano e de animais, colonizando a pele e mucosa do trato digestivo e urinário, bucal e vaginal. Desta forma, candidíase é na maioria das vezes de origem endógena, ocorrendo como consequência de um distúrbio imunológico do hospedeiro e dos fatores de virulência destas leveduras, que possuem habilidade de colonizar, penetrar e invadir o tecido (BROWN, 2007; HOLLENBACH, 2008). Atualmente existem cerca de 200 espécies de leveduras incluídas no gênero *Candida*, dentre as responsáveis por infecções no homem, destaca-se a *Candida albicans*. Esta tem sido relatada como a mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PFALLER, DIEKEMA, 2007; PANIZO et al., 2009). Estas leveduras são consideradas o principal grupo de fungos patógenos oportunistas, causando infecções sanguíneas nosocomiais em UTIs (KUMAR et al., 2008; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009; NEGRI et al., 2010; COLOMBO et al., 2013).

Candidíase pode ocorrer como consequência do rompimento do equilíbrio parasita-hospedeiro, desencadeado pelo comprometimento das defesas naturais como a imunológica (PLAYFORD et al., 2008). No animal, a presença de fungos pode estar associada à mastite infecciosa e identificadas através do leite. As leveduras são os agentes fúngicos mais frequentemente relacionados às infecções da glândula mamária em bovinos de leite (COSTA, SILVA, ROSA, 2008; SPANAMBERG et al., 2008). Os principais gêneros envolvidos são *Candida* e *Cryptococcus*, além de outros como *Geotrichum*, *Pichia* e *Trichosporon* (SPANAMBERG et al., 2008).

2.4 FUNGOS E A SAÚDE PÚBLICA

No Brasil, há uma escassez quanto ao relato sobre ocorrências de microrganismos patogênicos, isso inclui fungos, e seu envolvimento em surtos de doenças relacionadas ao consumo de produtos lácteos. Desde a década de 90,

há um crescimento da comercialização do “leite informal”, que é um produto sem qualquer tipo de inspeção oficial, não garantindo a sua qualidade microbiológica. A presença destes fungos no leite pode representar potencial risco à saúde humana principalmente quando se leva em conta que é um hábito o consumo de leite cru e seus derivados em alguns países, mesmo que a legislação vigente proíba a comercialização de leite e derivados lácteos sem um tratamento térmico antes. (RUZ-PERES et al., 2010).

Embora os fungos possam promover aspectos desejáveis do ponto de vista tecnológico em produtos lácteos; a presença desses microrganismos, quando não desejável, pode trazer prejuízo do ponto de vista econômico e de saúde pública, podendo estar associada a doenças infecciosas em homem e animal. Esses microrganismos podem estar ligados a quadros de micoses oportunistas (infecções causadas por fungos de baixa virulência) que podem conviver de forma pacífica com o hospedeiro. No entanto, quando há condições que favorecem seu desenvolvimento, estes podem ser patógenos ao homem (RUZ-PERES, et al., 2010).

A contaminação de alimentos por micotoxina acarreta sérios problemas no que se refere à saúde pública. Isso porque os efeitos tóxicos causados pelas micotoxinas no organismo humano acometem desde problemas agudos até doenças crônicas (WILD; GONG, 2010). Quando se fala em Micotoxinas existe um agravante porque é muito difícil sua remoção dos alimentos. Sendo a maneira mais eficaz de prevenção, através do controle do crescimento de fungos nos alimentos (ERKEKOĞLU et al., 2008). Por isso, na elaboração de fórmulas infantis é necessário controle rigoroso utilizando matérias-primas de qualidade (MAHDAVI et al., 2010).

REFERÊNCIAS

ALANGADEN, G.J. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.25, p. 201–225, 2011.

BANCO DO NORDESTE DO BRASIL (BNB). **Perfil dos Estados** – Alagoas: Polo de Desenvolvimento Integrado – Bacia Leiteira de Alagoas. 2005. Disponível em: <http://www.bnb.gov.br/content/aplicacao/Investir_no_Nordeste/Perfil_dos_Estados/gerados/al_apresentacao.asp>. Acesso em: 29/08/2014.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Estatística da produção pecuária**. Rio de Janeiro, Março de 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201104_publ_completa.pdf>. Acesso em: 29/08/2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). instrução normativa Nº 62, Brasília, 29 de dezembro de 2011.

BROWN, J.M.Y. Fungal infections after hematopoietic cell transplantation. Thomas' Hematopoietic cell transplantation, Third Edition Ed. Blackwell Publishing Ltda, p.683, 2007.

CALLON, C. et al. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. **Systematic and Applied Microbiology**. v.30, p. 547–560, 2007.

COLOMBO, A. L . et al. Recommendations for the diagnosis of candidemia in Latin America. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 30. nº. 3, 2013.

COSTA, G.M.; SILVA, N.; ROSA, C. A. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, p.1938-1942, 2008.

CRIADO, P.R. et al. Micoses superficiais e os elementos da resposta imune. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v.86, n°.4, p.726-731, 2011.

DELAVENNE E. et al. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology*. v.151, p.247–251, 2011.

EMPRAPA. **Conjuntura do mercado lácteo**. Juiz de Fora, v.5, n.41, p.1-41, 2012. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/948946>>. Acesso em: abril/2014.

ERKEKOGLU, P.; SAHIN, G.; BAYDAR, T. . Aspecial focus on mycotoxin contamination in baby food: Their presence and regulation. **Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.33, p. 51-66, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES. MICOTOXINS. 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs/X50120/X50120o01.htm>>. Acesso em: abril/2014.

FLORES, L.H.; ONOFRE, S.B. Determinação da presença de Fungos anemófilos e leveduras em Unidade de Saúde da cidade de Francisco Beltrão - PR. **Revista Saúde e Biologia**, v.5, p. 22-26, 2010.

GÓMEZ-SANCHIS, J. et al. Detecting rottenness caused by *Penicillium* genus fungi in citrus fruits using machine learning techniques. **Expert Systems with Applications**, New York, v. 39, p. 780-785, 2012.

HECK , J. M. L. et al. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 4745-4755, 2009. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/>>. Acesso em: abril/2014.

HOLLENBACH, E. Invasive candidiasis in the ICU: evidence based and on the edge of evidence. **Mycoses**. v. 51, p. 25-45, 2008.

IBGE. **Pesquisa Agropecuária Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: março/2014.

KABAK, B. Aflatoxin M1 and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: occurrence and safety evaluation. **Food Control**, v. 26, n. 1, p.182-187, 2012.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v.56, p.211-224, 2009.

KORB, A. et al. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Revista de Saúde Pública Santa Catarina**, Florianópolis, v. 4, n. 1, p. 21-36, 2011. Disponível em: <<http://www.esp.saude.sc.gov.br/sistemas/>>. Acesso em: abril/2014.

KRISHNAN, S.; ELIAS, K.M., PRANATHARTHI, H.C. *Aspergillus flavus*: an emerging nonfumigatus *Aspergillus* species of significance. **Mycoses**. v.52, p. 206–222, 2008.

KUMAR, C.P.G. et al. Carriage of *Candida* species in oral cavities of HIV infected patients in South India. **Mycoses**. v.52, p. 44-54, 2008.

LEE, M. H. et al. Mutations of β -tubulin condon 198 or 200 indicate thiabendazole resistance among isolates of *Penicillium digitatum* collected from citrus in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 150, p. 157-163, 2011.

MAHDAVI, R. et al. Determination of Aflatoxin M1 in Breast Milk Samples in Tabriz–Iran. **Matern Child Health Journal**, v. 14, p. 141–145, 2010.

MARTINO, R. et al. Lower respiratory tract respiratory virus infections increase the risk of invasive aspergillosis after a reduced-intensity allogeneic hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplant**. v.44, p.749–756, 2009.

NEGRI, M. et al. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**. v.169, p.175-182, 2010.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. **Bactérias psicrotóxicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado**. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/37-2/art825.pdf>>. Acesso em: abril/2014.

PANIZO, M.M. et al. *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. **Medical mycology**. v.47, p.137–143, 2009.

PEREIRA, et. al. Microbiota mesophilic aerobic contaminant UHT milk. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, nº. 394, p. 25-31, set/out., 2013.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Revista Microbiologia clinica**. v.20, p.133-163, 2007.

PLAYFORD, E.G.; MARRIOTT, D.; NGUYEN, Q. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-albicans *Candida* spp. **Critical Care Medicine**. v.36, p. 2034-2039, 2008.

QUEIROZ, V. A. V. et al. **Boas práticas e sistema APPCC na fase de pós-colheita de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, nº.122, p. 28, 2009.

ROMA JÚNIOR, L. C. et al. Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n.6, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=sci_arttext>. Acesso em: abril/2014.

RUZ-PERES M. et al. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino à pasteurização e fervura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.17, nº.1, p.62-70, mar.; 2010.

SANTOS, P. A. dos et al. **Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos psicotróficos em leite cru refrigerado coletado na macrorregião de Goiânia, GO**. Goiânia, 2009. Disponível em: <<http://revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/3522/6037>>. Acesso em: abril/2014.

SCHWARZER, K. Harmful effects of mycotoxins on animal, physiology. In: **17 th Annual ASAIM SEA Feed Technology and Nutrition Workshop**, Hue, Vietnam. 2009.

SIGNORINI, M. L. et al. Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 2, p. 250–7, 2012.

SOUZA, A.E.F. et al. Microbiota fúngica de hospitais da rede pública da cidade de Campina Grande - PB. **BIOFAR**, v.4, p.102-116, 2010.

SPANAMBERG A. et. al. **Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras**. Ciência Rural. v.39, no.1, p. 20, 2008.

TANIWAKI, M.; SILVA, N. **Microbiologia**: fungos deteriorantes em alimentos. Campinas: EDITORA, 2001.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **World agricultural supply and demand estimatives. 2011**. Disponível em: <<http://www.usda.gov/commodity/latest.pdf>. Acesso em: abril/2014.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Oxford Journals Life Sciences & Medicine**, Carcinogenesis, v. 31, p. 71-82, 2010. ISSN 0143-3334

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dampness and mould: WHO guidelines for indoor air quality*. Denmark: Copenhagen; 2009.

YAHYAZADEH, M. et al. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.24, p. 1445-1450, 2008.

YAMAZI, A. K. et al. **Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru**. Viçosa, 2010. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7210/5136>>. Acesso em: abril/2014.

ZARAGOZA C. S. al. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. **Revista Ibero americana de Micología**. México . v.28, nº.2, p.79–82, 2011.

3 ARTIGO DE RESULTADOS

Caracterização dos contaminantes fúngicos em leite de tanques de expansão produzidos no estado de alagoas

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo realizar a contagem de fungos filamentosos e leveduras e caracterizar os contaminantes fúngicos do leite proveniente de tanques de expansão produzidos no Estado de Alagoas, foi realizada sinergicamente a avaliação das condições higiênico-sanitárias desses tanques. Para coleta do leite foram utilizados recipientes de vidro previamente esterilizados. Logo após a coleta, os recipientes foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para posterior análise no laboratório de Inspeção de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas. As coletas foram realizadas em 23 municípios em 100% dos tanques comunitários de uma cooperativa do estado de Alagoas. As coletas foram realizadas nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2013. Em cada momento foram coletadas 45 amostras totalizando 135 amostras de leite. Para realização da contagem e identificação dos fungos filamentosos e leveduras utilizou-se a metodologia proposta pela APHA (American Public Health Association). As amostras foram semeadas em meio DRBC (ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol). Utilizou-se a diluição 10^{-3} . As placas foram incubadas em temperatura ambiente (25°C) durante sete dias. Das 135 amostras analisadas apenas 06 amostras (4,44%) não apresentaram contaminação por fungos filamentosos e leveduras, 26 amostras (19,26%) apresentaram alto índice de contaminação. Mais de um terço das amostras 49/135 (36,3%) tiveram uma média de $3,58 \times 10^5$ UFC/mL de leite. Entre os fungos isolados, destacam-se *Penicillium* spp. 18/135 (13,33%), *Aspergillus* spp. 85/145 (62,96%), *Absidia* sp 32/135 (23,70%), *Fonsecaea* sp 45/135 (33,33%) e *Candida* spp 19/135 (14,07%), sendo estatisticamente maiores quando comparadas com as dos demais fungos isolados. Devido à alta contagem de fungos filamentosos e leveduras, e à variedade de seus contaminantes fúngicos encontradas nesse estudo, sugere-se a adoção de meios eficientes para reduzir a multiplicação desses microrganismos, com a finalidade de evitar os problemas causados por seus metabólitos.

Palavras-chave: Leite. tanques comunitários. contagem. contaminantes fúngicos.

Caracterização dos contaminantes fúngicos em leite provenientes de tanques de expansão produzidos no Estado de Alagoas

ABSTRACT

The objective of this study hold the count of yeasts and molds and characterize fungal contaminants of milk produced from expansion tanks in the State of Alagoas, was performed synergistically evaluating the sanitary conditions of these tanks. For collection of milk glass containers were used previously sterilized. Immediately after collection, the containers were packed in insulated boxes containing ice packs for later analysis in the laboratory of Food Inspection, Federal University of Alagoas. Sampling was performed in 23% of the 100 municipalities in community tanks of a cooperative state of Alagoas. The collections were made in the months of January, February and May 2013 In every moment 45 samples totaling 135 milk samples were collected. To perform the counting and identification of yeasts and molds used the methodology proposed by the APHA (American Public Health Association). The samples were plated on DRBC medium (agar Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol). Was used in dilution 10⁻³. The plates were incubated at room temperature (25 ° C) for seven days. Of the 135 samples analyzed only 06 samples (4.44%) were not contaminated by yeasts and molds, 26 samples (19.26%) showed high contamination. More than a third of the samples 49/135 (36.3%) had an average of 3,58x10⁵ CFU / ml of milk. Among the fungi isolated, stand out *Penicillium* spp. 18/135 (13.33%), *Aspergillus* spp. 85/145 (62.96%), *Absidia* sp 32/135 (23.70%), *Fonsecaea* sp 45/135 (33.33%) and *Candida* spp 19/135 (14.07%), being significantly greater than compared with those of other fungal isolates. Due to the high count of yeasts and molds, and the variety of its fungal contaminants found in this study suggest the adoption of efficient to reduce the multiplication of microorganisms, in order to avoid the problems caused by its metabolites means.

Keywords: Milk. community tanks. counting. fungal contaminants.

3.1 INTRODUÇÃO

O leite é um produto de origem animal, de elevado valor nutricional, sendo considerado um produto nobre e recomendado para a dieta de crianças e adultos. Tendo igual valor nutricional, seus derivados, que são fontes de renda para os diferentes segmentos da cadeia produtiva do leite (RIBEIRO, 2008). Por ser um produto tão nobre do ponto de vista nutricional, é comum o desenvolvimento de uma diversidade de microrganismos. Dentre esses, se destacam os fungos, que são agentes capazes de produzir um amplo conjunto de substâncias biologicamente ativas (RUZ-PERES et al., 2010).

Embora os fungos possam promover aspectos desejáveis do ponto de vista tecnológico em produtos lácteos; a presença desses microrganismos, quando não desejável, contribui para a perda de qualidade dos produtos trazendo prejuízo do ponto de vista econômico e da saúde pública (RUZ-PERES et al., 2010).

Um dos problemas ligado à presença de fungos é a mastite infecciosa. As leveduras são os agentes fúngicos mais frequentemente relacionados às infecções da glândula mamária em bovinos de leite (COSTA, SILVA, ROSA, 2008; SPANAMBERG et al., 2008).

No Estado de Alagoas, na mesorregião do sertão alagoano está localizada a bacia leiteira. Nessa, é comum o hábito do consumo de leite cru; bem como a fabricação de seus derivados, sem que antes haja um tratamento térmico para destruição dos microrganismos patogênicos. Sendo esse hábito também comum em outras localidades do Estado. Assim, deve-se atentar para a presença de microrganismos, dentre os quais os fungos filamentosos e leveduras no leite, que podem representar potencial risco à saúde humana. Objetivou-se com esse estudo, realizar a contagem de fungos filamentosos e leveduras e caracterizar os contaminantes fúngicos do leite proveniente de tanques de expansão produzidos no Estado de Alagoas, foi realizada sinergicamente a avaliação das condições higiênico-sanitárias desses tanques.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local e Coleta das amostras

Foram realizadas três coletas em 45 tanques de expansão comunitários em três momentos diferentes nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2013, totalizando 135 amostras de leite em 23 municípios do Estado de Alagoas: Batalha (6), Belo Monte (2), Cacimbinhas (2), Craíbas (2), Girau do Ponciano (2), Ibateguara (1), Igreja Nova (6), Jacaré dos Homens (1), Jaramataia (1), Junqueiro (1), Mar Vermelho (2), Paulo Jacinto (1), Penedo (4), Piaçabuçu (1), Porto Real (2), Quebrangulo (1), São Braz (1), São Sebastião (1), Senador Rui Palmeira (3), Tanque D'arca (1), Teotônio Vilela (1), Traipú (2), Viçosa (1). Foram coletadas 500 mL de leite de cada amostra, em recipientes de vidro previamente esterilizados e transportados em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável, para o Laboratório Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Alagoas. As amostras foram mantidas em temperatura de refrigeração ($4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) até a realização das análises, no máximo 24 horas após as coletas.

3.2.2 Análise Microbiológica

Foram transferidos 25 mL da amostra para 225 mL de solução salina estéril 0,85%. Amostra e diluente foram homogeneizados para se obter a diluição inicial 10^{-1} . Após a homogeneização, foi transferido 1 mL dessa diluição para um tubo contendo 9 mL de solução salina a 0,85% (diluição a 10^{-2}) até a próxima diluição de 10^{-3} , para o plaqueamento e posterior contagem de fungos filamentosos e leveduras (em duplicata), segundo a metodologia do American Public Health Association (APHA, 2001).

Para realizar o plaqueamento foi inoculado 0,1 mL de cada diluição em placas contendo Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) previamente preparadas, espalhando o inóculo com auxílio da alça de Drigalski e incubando a $22-25^{\circ}\text{C}/7$ dias.

A contagem de fungos filamentosos e leveduras foi realizada de acordo com o método descrito no *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (APHA, 2001).

3.2.3 Identificação dos Contaminantes Fúngicos do leite

Após crescimento e contagem, as colônias foram selecionadas para preparo de lâminas para visualização em microscopia direta. Para os fungos filamentosos, utilizou-se a técnica da fita adesiva, onde a parte adesiva da fita era pressionada sobre a colônia e colocada em contato com a lâmina de microscópio contendo uma gota de azul de metileno a 1%. Para visualização do fungo filamentoso no microscópio, utilizou-se lentes de aumento objetivas de 40x. Para a identificação das leveduras, foi realizada a técnica de coloração de Gram. Para as leveduras, a visualização das estruturas foi realizada em microscópio óptico, com lentes de aumento objetivas de 100x, conforme LACAZ, et al. (2002). As estruturas observadas, foram comparadas com as contidas em atlas de micologia tanto macro como microscopicamente e identificadas a nível de gênero.

3.2.4 Delineamento experimental

As varias categorias estão representadas como frequências e proporções. As variáveis contínuas discretas aparecem como medianas.

A comparação entre proporções foi feita por meio do teste “Z” para duas proporções ou por meio do teste do qui-quadrado com procedimento de Marascuilo para 3 proporções. De maneira similar, a comparação entre o número de UFC foi feita pelo teste de Mann-Whitney quando apenas dois grupos foram comparados e pelo teste de Kruskal-Wallis com 3 grupos comparados.

Para todas as análises adotou-se um valor de alfa igual a 5%. As análises foram conduzidas com auxílio do pacote estatístico Epi info v.7 (Epi info Inc, Atlanta, IL).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando em conta as instalações onde os tanques se encontravam, pôde-se observar que 34/45 tanques estavam em condições adequadas de higiene. Desses, 11 encontravam-se na mesorregião do Agreste alagoano, 15 no Leste alagoano e 8 no Sertão de Alagoas. Observou-se que 08/45 tanques encontravam-se sem forro, e que no entorno de duas das 45 localidades onde os tanques estavam instalados, estava totalmente desorganizado podendo até mesmo atrair pragas. 02/45 tanques estavam em local totalmente aberto. Observou-se também que 04/45 tanques que se encontravam no Sertão de Alagoas estavam com temperatura inadequada de armazenamento do leite, propiciando condições satisfatórias para o desenvolvimento de fungos. Dos 45 tanques onde foram coletados os leites, 05 encontravam-se extremamente sujos. A condição ambiental é um fator determinante para as condições higiênico sanitárias dos alimentos, isso explica as contagens elevadas de fungos no leite provenientes dos tanques de expansão comunitários.

Outro fator que se deve levar em consideração é a heterogeneidade das amostras. Tanques de expansão comunitários podem ter uma quantidade grande de produtores depositando seus leites, tendo estes produtores conhecimento ou não em manipulação de alimentos. A falta de conhecimento na manipulação de alimentos amplia a possibilidade de contaminação, acarretando em altas contagens devido à falta de controle higiênico-sanitário.

De um total de 135 amostras de leite cru provenientes de 45 tanques de expansão comunitários localizados em 23 municípios que compõe a cooperativa de leite do estado, observou-se a presença de fungos em 129/135 (95,56%) das amostras analisadas, sendo que os fungos filamentosos estiveram presentes em 125/135 (92,59%) das amostras, já as leveduras representaram 19/135 (14,07%).

Com exceção das 06/135 (4,44%) das amostras que não houve crescimento de colônias, as colônias isoladas do restante das amostras apresentaram-se acima de 5000 UFC de fungos por mL de leite.

Quando se fez uma comparação das contagens em UFC entre a mediana dos meses ensolarados e mês chuvoso, observou-se que não houve diferença significativa no número de UFC entre os períodos ensolarado e chuvoso.

Considerando-se as 135 amostras de leite oriundas de tanques de expansão comunitários, a média das contagens em UFC de fungos/mL em mais de um terço das amostras 49/135 (36,3%) foi de $3,58 \times 10^5$ UFC/mL de leite. Observou-se também que 26/135 amostras (19,26%) apresentaram alto índice de contaminação, com incontáveis colônias ($>250 \times 10^3$ UFC/mL de leite), (Tabela 1).

Tabela 1. Média de Contagem de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de leite provenientes de tanques de expansão comunitários localizados em 23 municípios do Estado de Alagoas nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2013.

	Número de Amostras	% amostras	Contagem de fungos filamentosos e leveduras (Média em UFC/g)
	06	4,44	0
	07	5,18	5×10^3
	37	27,41	$3,64 \times 10^4$
	49	36,30	$3,58 \times 10^5$
	10	7,41	2×10^6
	26	19,26	Incontável
TOTAL	135	100,00	

Fonte: Autora, 2014.

Quando comparadas as medianas entre as quantidades de unidades formadoras de colônias de fungos/mL de leite cru colhidas de tanques de expansão das mesorregiões de Alagoas; observa-se que não houve diferença significativa entre a mesorregião sertão e as mesorregiões leste e agreste, nem mesmo quando a amostra foi analisada em mês chuvoso (maio), (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação da mediana em UFC, das amostras de leite provenientes de tanques de expansão comunitários localizados entre as 3 diferentes mesorregiões do Estado de Alagoas nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2013, estratificado por mês da coleta.

Mês	Mesorregião	"n"	Mediana	P-valor ¹	Dunn ²
-----	-------------	-----	---------	----------------------	-------------------

Janeiro	Agreste	12	32500	0,562	Não houve diferenças
	Leste	17	10000		
	Sertão	8	112500		
Fevereiro	Agreste	13	20000	0,596	Não houve diferenças
	Leste	17	70000		
	Sertão	8	385000		
Maio	Agreste	13	155000	0,393	Não houve diferenças
	Leste	10	135000		
	Sertão	10	302500		

¹ P-valor referente ao teste de Kruskal-Wallis.

²Teste post-hoc de Dunn indica entre quais grupos está a diferença significativa (se houver).

Fonte: Autora, 2014.

Em relação ao número de Unidades Formadoras de Colônias de fungos, onde o crescimento foi em grande escala, sendo impossível sua contagem mesmo a coleta sendo feita em momentos diferentes e estação diferente (mês ensolarado - janeiro e fevereiro; e chuvoso - maio); não houve diferença significativa da frequência das amostras com o período da coleta. Embora que, na mesorregião do Sertão, a contagem de fungos nos dois primeiros momentos tenha sido significativamente maior que nas outras mesorregiões. Já no mês de maio, a mesorregião Leste onde estava sendo impossível a contagem, o número de amostras apresentou-se maior que as outras mesorregiões em relação a quantidade de amostras (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação entre as frequências de amostras de leite de tanques de expansão comunitários dos 23 município do Estado de Alagoas com incontáveis UFC entre as 3 diferentes mesorregiões, estratificado por mês da coleta (janeiro, fevereiro e maio de 2013).

Mês	Mesorregião	Frequência (%)	P-valor¹	Marascuilo²
Janeiro	Agreste	3/15 (20%)	0,023	Entre Leste e Sertão
	Leste	0/17 (0%)		
	Sertão	5/13 (38,4%)		
Fevereiro	Agreste	2/15 (13,3%)	0,015	Entre Leste e Sertão
	Leste	0/17 (0%)		
	Sertão	5/13 (38,4%)		

Maio	Agreste	2/15 (13,3%)	0,194	Não houve diferenças
	Leste	7/17 (41,1%)		
	Sertão	3/13 (23,07%)		

¹ P-valor referente ao teste do qui-quadrado para as 3 proporções de cada mês.

²Procedimento de Marascuilo indica entre quais proporções está a diferença significativa (se houver).

Fonte: Autora, 2014.

Os dados obtidos no estudo permitiram observar a grande variedade de gêneros de fungos isolados das amostras de leite analisadas, que totalizaram 18 gêneros, dentre leveduras e fungos filamentosos (Tabela 4).

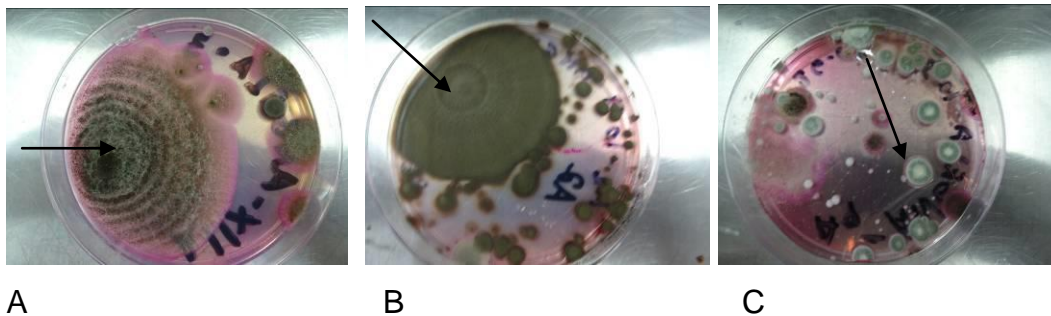
As frequências de isolamentos de 18/135 (13,33%) *Penicillium* spp. (Figura 1 e 2), 32/135 (23,70%) *Absidia* sp., 85/135 (62,96%) *Aspergillus* spp. (Figura 1 e 2), 45/135 (33,33%) *Fonsecaea* sp. (Figura 1 e 2) e 19/135 (14,07%) *Candida* sp. (Figura 2), foram estatisticamente maiores quando comparadas com as dos demais fungos isolados (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de isolamento dos fungos em amostras de leite provenientes de tanques de expansão comunitários localizados em 23 municípios do Estado de Alagoas nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2013.

Microrganismo identificado	Número de amostras	%
Absidia sp.	32	23,70
Aspergillus spp.	85	62,96
<i>Actinomadura</i> sp.	02	1,48
<i>Alternaria</i> sp.	09	6,67
<i>Blastomyces</i> sp.	12	8,89
Candida spp.	19	14,07
<i>Coccidioidis</i> sp.	16	11,85
Contaminação por bactérias	71	52,59
<i>Epidermophyton</i> sp.	01	0,74
<i>Exserohilum</i> sp.	02	1,48
Fonsecaea sp.	45	33,33
<i>Geotrichum</i> sp.	02	1,48
<i>Microsporium</i> sp.	04	2,96
Penicillium spp.	18	13,33
<i>Pseudallescheria</i> sp.	01	0,74
<i>Scedosporium</i> sp.	01	0,74
<i>Sporothrix</i> sp.	01	0,74
<i>Stacylidium</i> sp.	01	0,74
<i>Trichophyton</i> spp.	12	8,89

Fonte: Autora, 2014.

FIGURA 1 – Colônias isoladas de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de leite provenientes de tanques de expansão comunitário no Estado de Alagoas no ano de 2013.



A

B

C

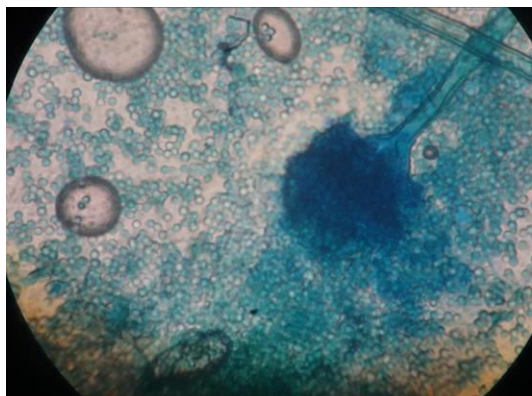
Fonte: Autora, 2014.

A - *Aspergillus* sp.

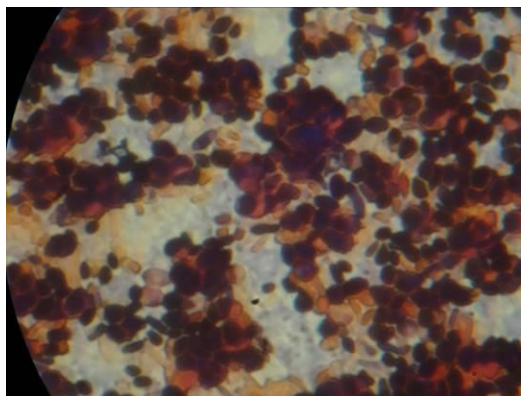
B - *Fonsecaea* sp.

C - *Penicillium* sp.

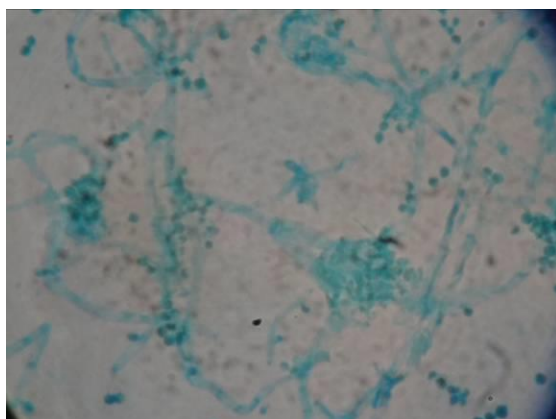
Figura2 Microscopia das colônias isoladas de fungos filamentosos e Leveduras das amostras de leite provenientes de tanques de expansão comunitário no Estado de Alagoas no ano de 2013.



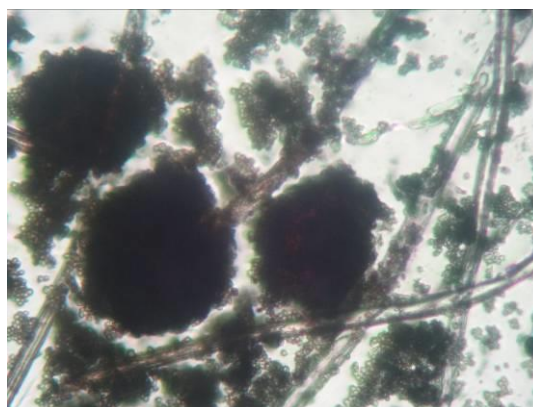
A



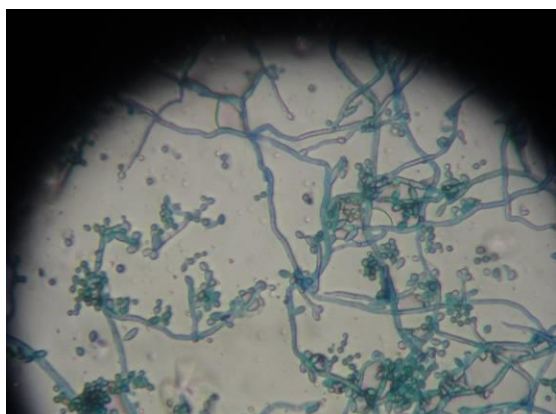
B



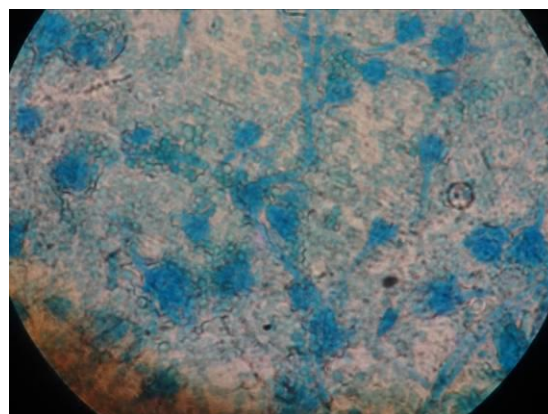
C



D



E



F

Fonte: Autora, 2014.

A - *Aspergillus* sp

B - *Candida* sp

C - *Penicillium* sp

D - *Aspergillus* sp

E - *Fonsecaea* sp

F - *Penicillium* sp

Nesse estudo, foi isolado uma variedade de fungos filamentosos e leveduras a partir de todas amostras de leite colhidas de tanques de expansão comunitários. E esses microrganismos podem estar associados a quadros de micoses oportunistas, que são infecções causadas por fungos de baixa virulência, que podem conviver de forma pacífica com o hospedeiro. No entanto, quando há condições que favorecem seu desenvolvimento, esses podem ser patógenos ao homem (RUZ-PERES et al., 2010).

VACHEYROU (2011) analisou amostras de leite cru em 16 fazendas na França e encontrou fungos de diversos gêneros como: *Alternaria* spp., outros fungos, *Cladosporium* spp., *Eurotium* spp., Leveduras brancas, Leveduras vermelhas, *Mucorales* spp., *Penicillium* spp. e *Wallemia sebi*.

PEREIRA et al. (2013) ao observar os aeróbios mesófilos em leites UHT encontrou 26,2% de fungos filamentosos e leveduras no total das amostras. Dentre os 26,2% fungos, houve predomínio de fungos filamentosos com 67,8% e leveduras corresponderam a 32,2%. Segundo a literatura, o gênero *Candida* sp. é o mais comum presente em leite e não provoca alterações significativas no produto (TRONCO, 2008). A presença de fungos filamentosos e leveduras é um indicativo de práticas sanitárias insatisfatórias e também para os produtos beneficiados pode estar relacionada a falhas no tratamento térmico, contaminação pós-processamento ou problemas na contaminação da embalagem (PEREIRA et al., 2013).

RUZ-PERES et al. (2010), avaliando a resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino à pasteurização e fervura, observou em seu estudo que 27 estirpes de fungos filamentosos; 33,33%, 0% e 0%, respectivamente, foram resistentes à pasteurização rápida, à pasteurização lenta e à fervura. Em relação às estirpes de leveduras, de um total de 275 estirpes; 76%, 1,09% e 17,45% foram resistentes à pasteurização rápida, à

pasteurização lenta e à fervura, respectivamente. Em virtude de que a maioria dos produtores de derivados lácteos utilizam em sua tecnologia de fabricação a pasteurização rápida como ferramenta para redução da carga microbiana do leite; a resistência de leveduras e fungos filamentosos, após a realização de tratamento térmico, representa um risco para o consumo de leite e seus derivados.

Ao analisar o nível de contaminação por fungos em 60 amostras de leite cru e 40 amostras de produtos lácteos provenientes de pequenas indústrias; TORRAR e VENGUS (2008) observaram a presença de fungos em 95% do leite cru e 63,3% dos produtos lácteos, onde 51,5% das amostras estavam contaminadas com o fungo do gênero *Geotrichum*.

DELAVERNE et al. (2011) caracterizando os contaminantes fúngicos dos leites de vaca, cabra e ovelha de nove amostras de leites provenientes de tanques localizados em três diferentes áreas na França, encontrou valores médios de contagem de fungos filamentosos e leveduras que variaram de 3.0×10^3 a 4.7×10^4 UFC/mL, independentemente da sua origem.

MELVILLE (2006) colheu amostras de leite de 50 tanques de refrigeração provenientes de propriedades de exploração leiteira em 3 regiões do interior do estado de São Paulo, considerando as 50 amostras de leite oriundas de tanques de refrigeração, a mediana das contagens de U.F.C. de fungos/mL foi de $28,5 \times 10^2$ /mL ($0,16$ a $332,50 \times 10^2$ /mL) de leite. Observou a presença de fungos em todas as amostras de leite oriundas de tanques de refrigeração e foram isolados os seguintes fungos filamentosos e leveduras: *Aureobasidium* spp., *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* spp., *Acremonium* spp., *Penicillium* spp. As frequências de isolamentos de *C. krusei* (70%), *C. tropicalis* (54%), *C. guilliermondii* (52%), *C. kefyr* (34%), *Geotrichum* spp. (52%) e *Rhodotorula* spp. (40%), foram estatisticamente maiores ($p < 0,05$) quando comparadas com as dos demais fungos isolados. Segundo o autor a contagem elevada e a variedade na contaminação fúngica dos leites provenientes dos tanques de expansão poderia estar associada a deficiências quanto às

condições higiênicas de obtenção e acondicionamento do produto. No presente estudo, por sua vez, observou-se que com exceção dos 4,44% das amostras que não houveram crescimento de colônias, as colônias crescidas do restante das amostras apresentaram-se acima de 5000 UFC de fungos por mL de leite. Entre os estudos de contagens de bolores e leveduras com leite discutidos neste trabalho, observa-se que neste, apresentou contaminação maior que os estudos dos autores citados.

A legislação brasileira não regulamenta limites aceitáveis de fungos filamentosos e leveduras em leite. No entanto, observa-se que a contagem elevada desses microrganismos indica condições inadequadas de obtenção, bem como higiene insatisfatória dos tanques de expansão onde são acondicionados os leites até seu processamento. Deve-se observar atentamente que a presença em alta contagem desses fungos acarreta em problemas, como: infecções, micoses oportunistas e até mesmo a formação de seus metabólitos, como as micotoxinas.

As boas práticas agropecuárias de transporte e de armazenagem continuam sendo a melhor forma de prevenir a contaminação de alimentos por altas contagens de fungos filamentosos e leveduras. Assim, estratégias e procedimentos legais são necessários na agropecuária e na indústria de alimentos para assegurar a qualidade de produtos de origem animal (QUEIROZ et al., 2009).

O Gênero *Candida* tendo como principal espécie a *C. albicans* pode ser isolado a partir de mucosa vaginal, pele, orofaringe e fezes, podendo causar infecções. Ao caracterizar os fungos nesse estudo, observou-se que 14,07% das amostras apresentaram leveduras do gênero *Candida*. ZARAGOZA et al. (2011), em sua pesquisa de identificação de leveduras das glândulas mamárias de animais com mastite, analisou o leite de animais sadios e em diferentes estágios da mastite. Em sua pesquisa, dos leites dos animais analisados, 44.32% apresentavam um quadro de mastite clínica. Também observou que 25.75% do total de leites analisados apresentava presença de leveduras do gênero *Candida* de diferentes espécies.

A fim de se obter um leite de boa qualidade, os cuidados devem ser dirigidos primariamente ao campo, onde o leite está mais sujeito à contaminação. Para isso, são necessárias adoção de boas práticas agropecuárias, com obtenção higiênica do leite. Dessa forma, os ordenhadores deverão receber treinamento periódico, a fim de minimizar todas as formas de contaminação no leite. É de fundamental importância o resfriamento do leite através de tanques de expansão, no entanto, esse resfriamento deverá ser o mais rápido possível, sendo necessário logo após a ordenha, em tanques previamente limpos e higienizados (TEIXEIRA, 2014). Nesse estudo, pôde-se observar um número considerável de gênero de fungos nas amostras de leite dos tanques de expansão comunitários, somente fazendo uso de medidas higiênicas adequadas é que será possível a redução da carga microbiana e conseqüentemente, evitar os problemas causados por esses microrganismos.

4. CONCLUSÃO

A contaminação por fungos no leite armazenado em tanques de expansão, acontece devido aos seguintes condicionantes: manejo da ordenha com higiene insuficiente, temperatura inadequada de armazenamento, heterogeneidade das amostras provenientes de várias propriedades, instalações inadequadas dos tanques de expansão; esses fatores contribuem para o aumento da carga microbiana no leite, tornando-se um risco para a saúde pública.

Os microrganismos fúngicos de maior contaminação no leite proveniente de tanques de expansão comunitário no Estado de Alagoas são filamentosos, e as altas contagens e grande variedade desses contaminantes derivam provavelmente das práticas agropecuárias inadequadas e higiene insuficiente nos tanques de expansão.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed. Washington: American Public Health Association. p. 663-667, 2001.

COSTA, G.M., SILVA, N.; ROSA, C. A. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, p.1938-1942, 2008.

DELAVENNE E. et al. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. **International Journal of Food Microbiology**. v.151, p. 247–251, 2011.

LACAZ, C.S. et al. Tratado de micologia médica. 9.ed. São Paulo: Sarvier, p. 15-829, 2002.

MELVILLE, P.A. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. *Arquivo Instituto Biológico*, São Paulo, v.73, n.3, p.295-301, jul./set., 2006.

PEREIRA, et. al. Microbiota mesophilic aerobic contaminant UHT milk. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, nº. 394, p. 25-31, 2013.

QUEIROZ, V. A. V. et al. **Boas práticas e sistema APPCC na fase de pós-colheita de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, nº.122. p.28, 2009.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE S.F. (Ed.). **Manual de terapêutica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, p. 759-771, 2008.

RUZ-PERES M. et al. Resistência de fungos filamentosos e leveduras isolados de leite cru bovino à pasteurização e fervura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.17, nº.1, p.62-70, 2010.

SILVA, N. et. al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. contagem de fungos filamentosos e leveduras. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. Cap. 2. p. 99-108.

SPANAMBERG A. et. al. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência. Rural**. v. 39 nº.1, p. 20, 2008.

TEIXEIRA, S. Tanques de resfriamento de leite: uma solução para os produtores leiteiros. Disponível em: <http://www.cpt.com.br/cursos-bovinos-gadodeleite/artigos/tanques-de-resfriamento-de-leite-uma-solucao-para-os-produtores-leiteiros>. acessado em: junho de 2014.

TORKAR, K.G & VENGUS, T. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw Milk and cheese in Slovenia. **Food Control**, v.19, p.570-577, 2008.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3ed. Santa Maria: UFSM, 2008. 206p.

VACHEYROU M. et al. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. **International Journal of Food Microbiology**. 146, p. 253–262, 2011.

ZARAGOZA C. S. al. Yeasts isolation from bovine mammary glands under different mastitis status in the Mexican High Plateau. **Revista Ibero americana de Micología**. México . v.28, nº2, p.79–82, 2011.