

## AVALIAÇÃO DA FERVURA NA INATIVAÇÃO DE PATÓGENOS EM LEITE INTEGRAL DE VACA, CABRA E BÚFALA EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADOS

MILK BOILING EVALUATION ON INACTIVATING PATHOGENS IN COW, GOAT AND BUFFALO WHOLE MILK EXPERIMENTALLY CONTAMINATED

L. V. FURLANETTO<sup>1</sup>, G. O. SOUZA<sup>2</sup>, E. E. S. FIGUEIREDO<sup>1</sup>, S. C. BALIAN<sup>2</sup>, S. R. PINHEIRO<sup>2</sup>, E. O. TELLES<sup>2</sup>

### RESUMO

A fervura do leite foi avaliada quanto à inativação de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Mycobacterium fortuitum* (NCTC 8573) inoculados em leite integral de vaca, cabra e búfala. As amostras de leite, previamente tratadas, foram contaminadas com os patógenos. Três repetições foram realizadas com cada tipo de leite. As amostras foram analisadas antes e depois da fervura e também após 24h sob refrigeração. As amostras foram diluídas em série e a metodologia oficial foi usada para quantificar *Staphylococcus aureus*, e adaptada para se obter o NMP de *Salmonella*. O número de UFC de *Mycobacterium* foi obtido em meio Löwenstein-Jensen, incubados a 37°C/5 dias. Antes da fervura, as amostras tinham entre 6,8 e 8,0 log UFC ou NMP/mL, de cada agente. Após a fervura, *Staphylococcus* foi recuperado em uma das 3 amostras de leite de vaca (1x10 UFC/mL), e *Salmonella* em todas as três amostras de leite de búfala (0,3 NMP/mL cada). *Mycobacterium* não foi detectado em nenhuma das análises realizadas após a fervura. As amostras fervidas e refrigeradas mostraram ausência de crescimento de todos os agentes. Nas condições estudadas, os resultados comprovam a efetividade da fervura do leite em reduzir o risco microbiológico a níveis mínimos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microbiologia. *Mycobacterium fortuitum*. *Salmonella* Typhimurium. *Staphylococcus aureus*. Tratamento térmico.

### SUMMARY

The inactivation of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) and *Mycobacterium fortuitum* (NCTC 8573) inoculated in cow, goat and buffalo whole milk submitted to the boiling was evaluated. Milk samples, previously treated, were contaminated with the pathogens and boiled. Three replicates were performed with each kind of milk. Samples were analyzed immediately before and after the boiling, and also after 24h under refrigeration. Samples were serially diluted and official method was used to quantify *Staphylococcus aureus*, and it was adapted to get the MPN of *Salmonella*. The number of CFU of *Mycobacterium* was obtained on Löwenstein-Jensen medium, incubated to 37°C/5 days. Before boiling the milk samples had from 6.8 to 8.0 log CFU or MPN/mL, of each agent. After boiling, *Staphylococcus* was recovered in one of three cow milk samples (1x10 CFU/mL), and *Salmonella* in all three buffalo milk samples (0.3 MPN/mL each). *Mycobacterium* was not detected in any of the analyses made after the boiling. Boiled and refrigerated samples showed no growth in all of them. Under the studied conditions, the results prove the effectiveness of domestic boiling to reduce biological risk to minimum levels.

**KEY-WORDS:** Heat treatment. Microbiology. *Mycobacterium fortuitum*. *Salmonella* Typhimurium. *Staphylococcus aureus*.

<sup>1</sup> Universidade de Cuiabá, Faculdade de Medicina Veterinária

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

## INTRODUÇÃO

O leite é um excelente alimento para o ser humano, mas é também um ótimo meio para o desenvolvimento de microrganismos que podem contaminá-lo se o animal estiver doente ou se houver falhas nas Boas Práticas durante a ordenha, processamento, transporte, armazenamento e manipulação. Há várias doenças de origem bacteriana que podem ser transmitidas pelo leite, dentre elas estão a tuberculose, salmonelose, listeriose e intoxicação estafilocócica (IDF, 1994, FRANCO & LANDGRAF, 2004, ABRAHÃO et al., 2005).

Para salvaguardar a saúde da população, é obrigatório o tratamento prévio do leite destinado ao consumo direto ou à industrialização, sendo proibida a venda do leite cru diretamente para o consumidor, exceto em circunstâncias especiais e sob condições pré-estabelecidas (BRASIL, 1952). No entanto, estima-se que cerca de metade da produção nacional de leite é comercializada informalmente, trata-se de leite cru, obtido, transportado e comercializado sem controle higiênico-sanitário, e sujeito a fraudes (NERO et al., 2003).

O consumidor reconhece o leite cru como um produto “mais barato”, “mais forte”, “mais puro” e “mais saudável” que o beneficiado, além disso, a maioria da população desconhece os riscos envolvidos (NERO et al., 2003, SOUSA, 2005).

A fervura do leite é um dos tratamentos mais antigos para aumentar sua vida útil e evitar as doenças que ele pode transmitir (PRATA, 1998). Embora seja de conhecimento geral que esse método é eficiente em eliminar microrganismos patogênicos, há poucos dados disponíveis sobre o quão eficiente ele é.

Por isso, o presente estudo avaliou a eficiência da fervura doméstica sobre a inativação de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium e do *Mycobacterium fortuitum* experimentalmente inoculados em leite integral de vaca, de cabra e de búfala. Decidiu-se trabalhar com *M. fortuitum*, ao invés do *M. bovis*, que é a micobactéria de maior interesse no leite, porque a cinética de inativação térmica delas é semelhante (GRANT et al., 1996), somado ao fato do *M. fortuitum* ser menos patogênico para o manipulador e apresentar rápido crescimento nos meios de cultura (WHO, 1984).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Caracterização e preparo das amostras

Foram utilizados leite cru integral de búfala, proveniente de uma fazenda situada na cidade de Sorocaba/SP, e leite UHT integral de vaca e de cabra, obtidos em um supermercado na cidade de São Paulo/SP. Anteriormente à abertura das caixas de leite UHT, foi feita a agitação do produto por 30 segundos e a desinfecção com álcool 70% na área de abertura. Todos os leites foram transferidos assepticamente (250 mL de cada) para frascos Schott (500 mL) estéreis contendo pérolas de vidros e levados ao fogo até levantar fervura, seguido da vedação do frasco e resfriamento em gelo. Esse procedimento visou à destruição da carga microbiana presente no leite cru de

búfala, assim como nos leites UHT, caso alguma falha durante o processamento tenha ocorrido.

O teor de gordura dos leites foi determinado utilizando o método de Gerber (BRASIL, 2006).

### Preparo do inóculo

As cepas utilizadas para o preparo do inóculo foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Mycobacterium fortuitum* (NCTC 8573). Uma alçada de *Staphylococcus aureus*, armazenado em ágar estoque, foi semeada em caldo cérebro-coração/BHI (3,0 mL), que foi incubado a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após, foi feita a semeadura por esgotamento (alça) em ágar Baird Parker (BP), incubado a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e, por fim, semearam-se duas colônias isoladas em 3,0 mL de caldo BHI, que foi incubado a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Esse inóculo foi empregado para a contaminação do leite. O mesmo foi feito com a *Salmonella* Typhimurium, porém utilizando o ágar bile verde brilhante (BVB).

Cerca de 0,6 g de cultura de *Mycobacterium fortuitum* em Löwenstein-Jensen, foi homogeneizada com 1mL de solução salina 0,85% com 0,05% de Tween 80. Em seguida, adicionou-se 24 mL de solução salina 0,85%, completando 25 mL de volume do inóculo (STARIKOFF, 2001).

### Contaminação do leite

A contaminação do leite deu-se pela inoculação de 0,5 mL de cada um dos inóculos de *Staphylococcus* e *Salmonella*, e 15,0 mL do inóculo de *Mycobacterium* em 250 mL de leite de vaca, de cabra e de búfala, previamente fervidos para evitar a presença de outros contaminantes no meio de cultura. Cada leite contaminado foi homogeneizado por 1 minuto e fracionado em três porções de 80 mL, dispensados em frascos Schott (500 mL) estéreis para serem submetidos à fervura, ou seja, foram realizadas 3 repetições de fervura para o leite contaminado de vaca, de cabra e de búfala. Os 10 mL restantes de cada leite contaminado foram utilizados como controle para a quantificação da carga microbiana inicial.

### Fervura doméstica e coleta das amostras

Cada frasco Schott contendo 80 mL do leite contaminado, foi submetido ao processo de fervura doméstica, que consiste na ebulição com “subida” do leite, utilizando a chama do bico de bunsen, seguido do resfriamento imediato em banho de gelo por 7 minutos e coleta da primeira amostra. Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente por 1h30 hora e refrigerados por mais 22h30 horas, quando novamente foram coletadas amostras para as análises microbiológicas.

### Análises microbiológicas

As amostras foram submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1% (BRASIL, 2003), até obter-se a diluição  $10^{-7}$  do leite controle (contaminado não tratado) de vaca, de cabra e de búfala e até a diluição  $10^{-2}$  dos respectivos leites fervidos logo após o tratamento e após 24 horas de armazenamento em

refrigeração.

Para a análise de *Staphylococcus aureus*, adotou-se a metodologia oficial (BRASIL, 2003). Considerou-se positivo as placas em que cresceram colônias características, sem nenhum teste de confirmação.

A análise de *Salmonella Typhimurium* seguiu a metodologia adaptada de BRASIL (2003), para a quantificação do agente pela técnica do número mais provável (NMP). Foi inoculado 1,0 mL de cada diluição em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 1%, incubados a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após, foi transferido 1,0 mL para tubos contendo 10 mL de caldo selenito cistina (SC) e incubados em banho-maria a  $41^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, e por fim, uma alçada foi repicada por esgotamento, em placas de ágar BVB, incubadas a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram pelo menos 1 colônia característica no ágar.

Para a análise do *Mycobacterium fortuitum* utilizou-se placas com Löwenstein-Jensen, em duplicata, onde 0,1 mL de cada diluição foi semeada na superfície do meio. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 dias (WHO, 1984). Para contagem utilizou-se preferencialmente a diluição que apresentava entre 1 a 10 colônias.

Como se trabalhou com leites previamente tratados, seguidos da inoculação de cepas puras, não foram realizadas provas complementares para confirmação dos agentes pesquisados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de leite controle apresentaram contaminação entre 6,8 e 8,0 log de UFC ou NMP/mL, para os três agentes adicionados. A fervura foi capaz de reduzir no mínimo 6,0 log de cada agente. Os dados encontram-se sumarizados na Tabela 1.

Observa-se nessa tabela que, logo após a fervura, detectou-se a presença de *Staphylococcus* em uma das amostras de leite de vaca ( $1,0 \times 10^1$  UFC/mL ou 1,0 log UFC/mL) e de *Salmonella* nas 3 amostras de leite de búfala (0,3 NMP/mL em cada, ou  $< 0,5$  log NMP/mL), mas nenhuma colônia de *Mycobacterium* foi detectada. Não se pode interpretar, no entanto, devido à metodologia empregada, que o *Mycobacterium* tenha sido mais sensível ao calor que o *Staphylococcus* ou a *Salmonella*.

A detecção do *Staphylococcus* pode ter sido ao acaso; 10 UFC/mL é o resultado da detecção de uma única colônia no meio de cultura.

Quanto à *Salmonella*, há que se considerar dois fatos: a) o limite de quantificação da técnica é mais baixo que dos outros microrganismos e b) a contaminação no leite controle, das amostras que

apresentaram o agente após a fervura, era superior à das outras amostras pois os 3 tubos de todas as diluições foram positivos, cuja forma de expressão do resultado é  $\geq 2,4 \times 10^7$  NMP/mL ( $\geq 7,4$  log NMP/mL).

No entanto, após 24 horas de refrigeração, todas as amostras apresentaram ausência de crescimento. O desaparecimento do *Staphylococcus* e da *Salmonella* pode ser atribuído ao acaso, já que a contaminação detectada após a fervura foi no limite de quantificação da técnica, ou pode ser que a injúria causada pela refrigeração tenha se somado à provocada pelo calor, reduzindo o número dos sobreviventes.

Não foi detectado *Mycobacterium fortuitum*, em nenhum dos leites tratados, o que está em acordo com os resultados obtidos por Araújo et al. (2008).

A fervura determinou uma redução mínima de 7,30, 7,98 e 7,85 ciclos logarítmicos do *Mycobacterium* sp no leite de vaca, de cabra e de búfala, respectivamente. Ainda mais interessantes se tornam esses resultados, do ponto de vista de Saúde Pública, quando avaliados sob a perspectiva de que a máxima contaminação natural por *M. bovis* no leite é de 3 a 5 log UFC/mL (IDF, 1994, ZANINI et al., 1998).

A eficiência da fervura obtida por Moraes & Sigulem (2000) foi inferior a da presente pesquisa. Os autores ferveram trinta amostras (1.000 mL cada) de leite pasteurizado tipo 'C' em leiteiras e, de acordo com a mediana dos resultados das bactérias mesófilas aeróbias facultativas, houve redução de  $1,4 \times 10^4$  para  $8,0 \times 10^1$  UFC/mL, com aumento após 24 horas de refrigeração ( $4,6 \times 10^2$  UFC/mL).

A diferença entre os resultados obtidos pode estar relacionada com o volume do leite tratado nos dois trabalhos e/ou, mais possivelmente, a presença de microrganismos termodúricos nas amostras daqueles autores. Novos estudos, para a avaliação da sobrevivência de patógenos quando maior volume de leite é submetido à fervura, podem auxiliar nessa questão.

A fervura mostrou-se ser um método seguro para tratamento doméstico do leite cru. Entretanto, há necessidade do rápido resfriamento do leite após a fervura e manutenção do mesmo a temperatura de refrigeração, visando inibir e/ou retardar a multiplicação da microbiota sobrevivente ao tratamento térmico (NERO et al., 2005, WATANUKI & GALLO, 2008).

Ressalta-se que a comercialização do leite cru diretamente para o consumidor é proibida, assim, o leite cru para consumo deve ficar restrito ao ambiente de produção, mas deve ser submetido à fervura e adequado resfriamento antes de ser efetivamente consumido.

**Tabela 1-** Verificação da eficácia da fervura em amostras de leite integral de vaca, cabra e búfala experimentalmente contaminadas com *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium* e *Mycobacterium fortuitum*; São Paulo, ago-set 2008

| Tipo de leite (% de gordura) e repetições | <i>Staphylococcus aureus</i> (log UFC/mL) |                |                   | <i>Salmonella Typhimurium</i> (log NMP/mL) |                    |                   | <i>Mycobacterium fortuitum</i> (log UFC/mL) |                |                   |
|---|---|----------------|-------------------|--|--------------------|-------------------|---|----------------|-------------------|
|   | controle                                  | Após a fervura | 24 h refrigeração | controle                                   | Após a fervura     | 24 h refrigeração | controle                                    | Após a fervura | 24 h refrigeração |
| Leite de vaca (2,8%)                      | 1   | 1,0            | -                 | -  | -                  | -                 | -   | -              | -                 |
|   | 2   | 7,1            | - <sup>a</sup>    | -  | 7,0                | -                 | -   | 7,3            | -                 |
|   | 3   | -              | -                 | -  | -                  | -                 | -   | -              | -                 |
| Leite de cabra (3,6%)                     | 1   | -              | -                 | -  | -                  | -                 | -   | -              | -                 |
|   | 2   | 6,8            | -                 | -  | 7,0                | -                 | -   | 8,0            | -                 |
|   | 3   | -              | -                 | -  | -                  | -                 | -   | -              | -                 |
| Leite de búfala (5,4%)                    | 1   | -              | -                 | -  | < 0,5 <sup>b</sup> | -                 | -   | -              | -                 |
|   | 2   | 6,8            | -                 | -  | ≥ 7,4              | < 0,5             | -   | 7,8            | -                 |
|   | 3   | -              | -                 | -  | < 0,5              | -                 | -   | -              | -                 |

<sup>a</sup> ausência de crescimento, ou seja, a contaminação, se presente, está abaixo do limite de quantificação da técnica, que é 1,0 log UFC/mL (10 UFC/mL) ou < 0,5 log NMP/mL (0,3 NMP/mL).

<sup>b</sup> log negativo indica contaminação inferior a 1 NMP/mL (0,3 NMP/mL).

## CONCLUSÕES

Sob as condições do estudo, a fervura mostrou-se um tratamento doméstico eficaz em reduzir o risco que o consumo do leite de vaca, de cabra e de búfala possa representar para a saúde pública.

## AGRADECIMENTO

Ao Orlando Bispo de Souza do Laboratório de Higiene Alimentar da FMVZ/USP, ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas da FMVZ/USP, e à Juliana Rezende, Adriana Aparecida Pereira e Mauricio Tadeu Sprocati, estagiários, na época do trabalho, do Laboratório de Higiene Alimentar, pelo auxílio laboratorial e apoio na realização deste.

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R. M. C. M., NOGUEIRA, P. A., MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. *Archives of Veterinary Science*, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ARAÚJO, D. A. F. V., RAIMUNDO, D. C., PEDROSA, F. R. V., SOUZA, G. O., PINHEIRO, S. R., BALIAN, S. C., TELLES, E. O. **Eficiência da fervura doméstica sobre a inativação do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573) inoculado em leite integral de Búfala.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008. Trabalho de Iniciação Científica - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos

de Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. Decreto Nº 30691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 jul. 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N.º 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N.º 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. 2006.

FRANCO, B. D. G., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** Rio de Janeiro: Atheneu, 196p., 2004.

GRANT, I. R., BALL, H. J., ROWE, M. T. Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. In: milk by pasteurization. **Letters in applied Microbiology**, n. 22, p. 253-256, 1996.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. **The significance of pathogenic microorganisms in raw milk.** Bélgica, 215p.,1994.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos.** 6 ed. Artmed: Porto Alegre, 711p., 2005.

MORAIS, T. B., SIGULEM, M. D. Efeito da fervura doméstica e da refrigeração na carga bacteriana do leite pasteurizado tipo C. **Jornal de pediatria**, v. 76, n. 5, p. 357-360, 2000.

NERO, L. A., MATTOS, M. R., BELOTI, V., BARROS, M. A. F., PINTO, J. P. A. N., ANDRADE, N. J., SILVA, W. P., FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

NERO, L. A., MAZIERO, D., BEZERRA, M. M. S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão – PR. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 21-26, 2003.

PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. UNESP: São Paulo, 128p., 1998.

STARIKOFF, K. R. **Efeito da gordura de leite de cabra sobre o valor  $D_{65^{\circ}C}$  do *Mycobacterium fortuitum* (NTCN 8573)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006. 83p. Dissertação (Mestrado em

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006.

SOUSA, D. D. P. **Consumo de produtos lácteos informais, um perigo para a saúde pública. Estudo dos fatores relacionados a esse consumo no Município de Jacareí-SP**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005. 114p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2005.

WATANUKI, M. M., GALLO, C. R. Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação dos esporos após tratamento térmico. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n. 3, p. 202-207, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases**. Geneva: WHO, 1984

ZANINI, M. S., MOREIRA, E. C., LOPES, M. T., MOTA, P., SALAS, C. E. Detection of *Mycobacterium bovis* in Milk by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 45, p. 473-479, 1998.