

ÉRICA JUNKO NISHIMOTO

**Efeito da gordura do leite de vaca
sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum*
(NCTN 8573)**

São Paulo
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ÉRICA JUNKO NISHIMOTO

**Efeito da gordura do leite de vaca
sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum*
(NCTN 8573)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada 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 Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

São Paulo
2006

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NISHIMOTO, Érica Junko

Título: Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada 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: _____

Aos meus amados pais **Toshie Nishimoto e Tadashi Nishimoto** (*in memoriam*), por toda a vida de trabalho, dedicação, paciência, incentivo, apoio, amor e por acreditarem sempre nos seus filhos.

Ao meu querido marido **Pablo**, por seu amor, apoio, compreensão, carinho e por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me alegrando e fazendo com que os momentos difíceis da vida se tornem extremamente fáceis.

Aos meus irmãos **Luciana, Eliane e Guilherme** por estarem sempre me incentivando e proporcionando bons momentos de descontração.

À minha amiga e companheira de mestrado **Karina Ramirez Starikoff** pela ajuda, companheirismo, amizade, carinho e por compartilhar comigo as alegrias e dificuldades da pós-graduação.

À **Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles**, por quem eu tenho profunda admiração e respeito, por todo o incentivo, paciência, acolhimento, sabedoria, amizade e por ter confiado e acreditado em mim.

AGRADECIMENTOS

A **Profa. Dra. Sonia Regina Pinheiro**, pela co-orientação e colaboração no desenvolvimento deste trabalho, cedendo a cepa do *Mycobacterium*.

A **Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian**, pela amizade e incentivo no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Ao **Prof. Dr. Fernando Ferreira**, pela grande ajuda com a parte estatística do projeto.

As funcionárias do Laboratórios de Zoonoses Bacterianas, **Zenaide e Gisele** por toda paciência e dedicação com este projeto.

Aos funcionários e amigos do laboratório de Higiene Alimentar, **Sandra e Bispo**, pela ajuda com os materiais utilizados no trabalho e por todo apoio.

Aos amigos **Ana Paula M. Prina, Flávio B. Brandespim** e todos do HOVET pela ajuda na coleta das amostras.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro.

RESUMO

NISHIMOTO, E. J. **Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573)**. [Effect of fat ratio of whole and skim cow milk on thermal resistance of *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573)]. 2006. 81 f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da gordura do leite bovino na resistência térmica do *Mycobacterium fortuitum*. Amostras de leite bovino integral e desnatado foram contaminadas com inóculo padronizado de *M. fortuitum*, atingindo a concentração de aproximadamente 10^7 UFC/mL de leite, e submetidas à pasteurização lenta ($65^{\circ}\text{C}/30\text{min.}$). Foi realizada a contagem do agente nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de pasteurização (em meio Lowenstein-Jensen, incubação a $37^{\circ}\text{C}/5$ dias), e os resultados, em logaritmo, foram plotados em diagrama de dispersão com posterior regressão linear para construção da curva de sobreviventes (ou curva de morte térmica). Foram obtidas 3 curvas para o leite integral e 3 para o leite desnatado, porém, para o cálculo do valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$, utilizou-se a melhor reta obtida para cada tipo de leite. Encontraram-se valores $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* iguais a 18,02 minutos para o leite integral e 7,82 minutos para o desnatado; a gordura do leite influenciou no padrão da curva de morte térmica e teve efeito protetor sobre o *M. fortuitum*. Conclui-se que a pasteurização lenta é capaz de reduzir 3,85 log de *M. fortuitum* em leite desnatado e 1,67 log em leite integral, resultando em diferentes níveis de segurança ao consumidor.

Palavras chave: Leite. Gordura. Morte térmica. Pasteurização lenta. *Mycobacterium fortuitum*.

ABSTRACT

NISHIMOTO, E. J. **Effect of fat ratio of whole and skim cow milk on thermal resistance of *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573)**. [Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573)]. 2006. 81 f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

This study aimed to evaluate the effect of cow milk fat on the thermal resistance of *Mycobacterium fortuitum*. Samples of whole and skim cow milk were contaminated with a standardized inoculum of *M. fortuitum*, until 10^7 cfu/mL, and heated at $65^{\circ}\text{C}/30$ minutes (Holder Pasteurization). It was repeated three times, with milk (whole and skim) from the same animal. Survivors were enumerated by plate count method, after heating for 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 minutes (in Lowenstein-Jensen medium, incubation at $37^{\circ}\text{C}/5$ days) and the logarithmic results were plotted on dispersion diagram with posterior linear regression for the construction of the survivors' curve (or thermal death curve). Those data resulted on 3 curves for the whole milk and 3 for the skim milk, although, for the $D_{65^{\circ}\text{C}}$ value calculation, it was selected the best-fit line for each kind of milk. The $D_{65^{\circ}\text{C}}$ value for *Mycobacterium fortuitum* achieved was 18,02 minutes for the whole milk and 7,82 minutes for the skim milk; the milk fat influenced the pattern of thermal death curve and had a protective effect on the *M. fortuitum*. It was inferred that the holder pasteurization ($65^{\circ}\text{C}/30$ min) is capable to reduce 3,85 log of the *M. fortuitum* at skim milk and 1,67 log at whole milk, resulting in different security levels for the customers.

Key words: Milk fat. Thermal death. Holder pasteurization. *Mycobacterium fortuitum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gráfico semi-logarítmico para o cálculo do Valor D.....	30
Figura 2 -	Esquematização da etapa de preparo do inóculo.....	40
Figura 3 -	Esquema de obtenção das amostras e sub-amostras.....	42
Figura 4 -	Esquematização das etapas de pasteurização, diluição e semeadura das sub-amostras	46

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Resultados em log das contagens de UFC/mL de *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573) no controle de contaminação do leite bovino integral e nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos do tratamento térmico a 65°C, em cada repetição 50
- Quadro 2 - Resultados em log das contagens de UFC/mL de *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573) em leite bovino contaminado desnatado e nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos do tratamento térmico a 65°C, em cada repetição..... 54

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino integral nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear.
Repetição 1.....50
- Gráfico 2 - Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino integral nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear.
Repetição 2.....51
- Gráfico 3 - Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino integral nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear.
Repetição 3.....51
- Gráfico 4 - Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino integral nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear, obtida à partir das 3 repetições.....52
- Gráfico 5 - Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino desnatado nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear.
Repetição 1.....53
- Gráfico 6 - Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino desnatado nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear.
Repetição 2.....54
- Gráfico 7 - Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino desnatado nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear.
Repetição 3.....54
- Gráfico 8 - Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino desnatado nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear, obtida à partir das 3 repetições.....55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	grama
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HOVET	Hospital Veterinário
L	Litro
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Log	Logarítmo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>M. paratuberculosis</i>	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>
Min	Minuto
n.	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
%	Porcentagem
Seg	Segundos
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Leite.....	22
3.2 Tuberculose humana e animal.....	23
3.3 Micobactérias.....	25
3.4 Pasteurização e resistência térmica.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Amostras de leite.....	36
4.2 Controles realizados no leite.....	37
<i>4.2.1 Prova de esterilidade.....</i>	<i>37</i>
<i>4.2.2 Análise da porcentagem de gordura.....</i>	<i>38</i>
<i>4.2.3 Desnate das amostras de leite destinadas à experimentação.....</i>	<i>38</i>
4.3 Inóculo.....	39
4.4 Contaminação do leite.....	42
4.5 Pasteurização.....	44
4.6 Controle do processo de pasteurização.....	44
<i>4.6.1 Fosfatase Alcalina.....</i>	<i>44</i>
<i>4.6.2 Peroxidase.....</i>	<i>44</i>
4.7 Diluição e semeadura das sub-amostras.....	45
4.8 Contagem de colônias e registro de resultados.....	47
4.9 Construção da curva de sobreviventes e cálculo do Valor D.....	47
5 RESULTADOS.....	48

5.1 Leite integral	49
5.2 Leite desnatado	52
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO	63
8 CONSIDERAÇÃO FINAL	65
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE	74

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de grande importância em saúde pública tanto por suas propriedades nutricionais quanto pelos perigos que pode veicular e, por isso, a legislação brasileira (BRASIL, 1952) determina que todo leite destinado ao consumo “in natura”, bem como para a produção de derivados comestíveis, deve ser propriamente pasteurizado. Exceção é feita a queijos que tiverem maturação acima de 60 dias, em temperatura superior a 5°C, produzidos por empresas sob Inspeção Federal (BRASIL, 1996, item 7.1) e de 90 dias quando sob Inspeção Estadual-SP (SÃO PAULO, 1994).

A determinação do tempo e temperatura de pasteurização do leite teve como principal parâmetro a resistência térmica do *Mycobacterium* spp e da *Coxiella burnetti*. O primeiro padrão, estabelecido em 1924, indicava que o aquecimento a 61,1°C por 30 minutos eliminava o *M. tuberculosis* (NORTH; PARK, 1927), porém, mais tarde verificou-se que a *Coxiella burnetti* sobrevivia à 61,7°C/30 minutos (HUEBNER et al., 1949); tal fato determinou o aumento da temperatura para 62,8°C/30 minutos como padrão oficial nos Estados Unidos (STABEL, 2003).

No Brasil, a pasteurização lenta é freqüentemente utilizada pelas pequenas usinas e queijarias (CARVALHO, 1998) e o binômio 62 à 65°C/30 minutos foi estipulado na década de 50 (BRASIL, 1952). Há uma pequena diferença entre esta legislação federal e a do estado de São Paulo, cujo artigo 124, item 3.1, prevê 63-65°C/30 minutos (SÃO PAULO, 1994).

Muito pouco foi estudado, após 1960, sobre a resistência térmica do *Mycobacterium* spp.; exceção feita ao *M. paratuberculosis* que, à partir da década de 90, devido à sua potencial relação com a doença de Crohn e de poder estar presente no leite cru,

foi premente estudá-lo; assim, várias pesquisas foram realizadas até que se assegurasse que a pasteurização conferia inativação aceitável com adequada margem de segurança (GRANT; BALL; ROWE, 1996; STABEL, 2001; SUNG; COLLINS, 1998).

Dessa forma, estudos que possam atualizar as informações são fundamentais, especialmente se consideradas a grande evolução que a microbiologia e a ciência dos alimentos testemunhou nas últimas décadas e a eventual seleção/adaptação de cepas devido, entre outros, ao emprego corriqueiro da pasteurização do leite.

Porém, a eficácia da pasteurização não depende somente do tempo e temperatura, mas também dos fatores que influenciam na termorresistência dos microrganismos. Nesse sentido, há pouco relato sobre a influência das características do substrato sobre a termorresistência do *Mycobacterium* spp, embora a literatura evidencie a ação protetora, por exemplo, da gordura, contra a morte térmica de outros microrganismos (BUSATTA, 2005; CHHABRA et al., 1999; DONNELLY; BRIGGS, 1986; FRANCO; LANDGRAF, 1996; MCDONALD; SUTHERLAND, 1993; MOLIN; SNYGG, 1967).

O estudo o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium* spp é de alta relevância para a análise de perigo no processamento térmico do leite, já que possibilita calcular o nível de segurança que a pasteurização lenta confere ao produto, segundo a população inicial do agente e as características do substrato.

Soma-se a isso, o fato de que a tuberculose bovina ainda é um problema de saúde pública veterinária brasileira, que o homem é tão susceptível ao *M. bovis* quanto ao bacilo humano (ABRAHÃO, 1999; KILLEBERG, 1984) e que o Brasil figura na lista das 22 nações que concentram 80% das ocorrências de tuberculose no mundo

(PIVETTA, 2004), fica evidente a importância de esforços para atualizar os conhecimentos sobre a destruição térmica do *Mycobacterium*, nos diferentes e principais substratos em que pode ser encontrado.

Nesse sentido, o *M. fortuitum* é recomendado como espécie teste por ser menos patogênico e apresentar rápido crescimento nos meios de cultura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984). Além disso, o padrão de formação de grumos dessa espécie não influencia a cinética de inativação térmica, quando comparado com o *M. bovis*, embora influencie quando se compara *M. bovis* com outras espécies (GRANT; BALL; ROWE, 1996).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos:

- Geral: determinar o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NTCN 8573) para o leite bovino integral e desnatado.
- Específicos: avaliar o efeito da gordura do leite na resistência térmica do agente à 65°C e calcular a máxima contaminação do leite de vaca que a pasteurização lenta seria capaz de reduzir a níveis abaixo de 1UFC/mL.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura compreende informações relevantes sobre o leite, tuberculose humana e animal, micobactérias, pasteurização e resistência térmica, contribuindo para melhor compreensão deste trabalho.

3.1 Leite

No ano de 2004, a produção mundial de leite foi estimada em 515,8 bilhões de litros sendo 70% desse volume produzido na Europa e na América, porém, existe uma tendência de redução da produção de leite nos países desenvolvidos e de crescimento nos países em desenvolvimento (EMBRAPA, 2005a).

O Brasil é o sétimo maior produtor de leite do mundo e cresce a uma taxa anual de 4%, respondendo por 4,4% da produção mundial e 66% do volume total de leite produzido nos países que compõem o Mercosul (CARVALHO et al., 2003; EMBRAPA, 2005b).

Além da importância econômica, o leite é considerado um dos alimentos mais completos devido ao seu grande valor nutritivo, sendo essencial para todas as idades (CARVALHO et al., 2003). A riqueza em nutrientes o torna também um excelente meio de cultura e pode transmitir vários microrganismos que causam

danos à saúde do consumidor, sendo a tuberculose uma das principais doenças transmitidas pelo leite (ALVES; PINHEIRO, 2002).

São muitas as espécies pecuárias exploradas na produção leiteira, como a ovelha, a cabra e a búfala, mas nenhuma assume tanto destaque como a vaca, que é responsável por 84% do total de leite produzido no país, em 2005. (EMBRAPA, 2005c; VALSECHI, 2001).

Segundo a legislação brasileira, leite, sem outra especificação, é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

É composto, em média, por 87% de água e 13% de substâncias sólidas nutritivas, denominadas Extrato Seco Total, sendo representadas por, aproximadamente, 4,0% de gordura, 4,8% de lactose, 3,5% de proteínas e 0,7% de sais minerais. Essa composição do leite varia com a raça, espécie, individualidade, alimentação, tempo de gestação e muitos outros fatores (CLAEYS; LOEY; HENDRICKX, 2002; VALSECHI, 2001).

A gordura, ou simplesmente “lipídeos”, é a fração mais variável do leite e pode modificar-se durante a ordenha, sendo que o primeiro leite é relativamente magro (0,7%), enquanto que o último ordenhado é mais gordo (11%) (PINHEIRO; MOSQUIM, 1991), e possui constituição muito complexa, formada por cerca de 99,5% de compostos lipídicos (lipídios simples, lipídios complexos e ácidos graxos livres), e 0,5% de compostos lipossolúveis (colesterol, hidrocarbonetos, vitaminas lipossolúveis e alguns álcoois) (VALSECHI, 2001).

3.2 Tuberculose humana e animal

Há séculos a relação entre a tuberculose dos animais, principalmente a bovina, e a tuberculose humana constituem motivo de preocupação para as autoridades sanitárias (SOUZA et al., 1999).

A tuberculose bovina é uma zoonose de evolução crônica e efeito debilitante, causada pelo *Mycobacterium bovis*, cujo hospedeiro primário é o bovino. Entretanto, diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem, são também susceptíveis a este bacilo (ABRAHÃO, 1999).

Apesar de existirem medidas sistemáticas aplicadas à pecuária, como os testes de rotina para o diagnóstico de diversas doenças nos rebanhos, a pasteurização do leite, reduzindo o risco de tuberculose humana por *M. bovis*, e medidas de prevenção e quimioterapia anti-tuberculosa eficaz, a transmissão da tuberculose animal para o homem é crescente, principalmente em países e regiões submetidos à maior privação social, nos quais essas medidas não foram adotadas de modo mais efetivo (ABRAHÃO, 1999; ANTUNES, 2002).

As taxas de morbidade e mortalidade da doença humana também têm aumentado nos últimos tempos devido à emergência de cepas de diversas espécies de *Mycobacterium* resistentes a múltiplas drogas, acompanhando, em particular, o surto da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida – AIDS (KONEMAN et al., 2001).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os países latino-americanos apresentam cerca de 300 milhões de bovinos, dos quais somente 80 milhões estão localizados nos países onde a prevalência da tuberculose animal é considerada baixa ou nula. Os outros 220 milhões de animais estão distribuídos em países cujos

dados sobre a prevalência desta doença são escassos. Esse é o caso do Brasil, que apresenta um rebanho de aproximadamente 170 milhões de bovinos e somente 40% dos resultados dos testes de tuberculina são notificados (PARDO, 2001).

No Brasil, a escassez de trabalhos epidemiológicos em humanos, que realizam tipagem do agente causador da tuberculose, associada ao caráter crônico da doença, dificulta a avaliação da situação real da doença (SOUZA et al., 1999).

Estima-se de que a doença afete cerca de 200.000 bovinos e suspeita-se que o *Mycobacterium bovis* seja responsável por cerca de 4.000 dos 80.000 casos de tuberculose humana relatados a cada ano (LEITE et al., 2003).

Indiscutivelmente a ingestão de leite cru contaminado constitui uma das principais formas de infecção humana pelo bacilo bovino (COVISI et al., 1998; SOUZA et al., 1999). Um animal infectado é capaz de eliminar o agente pelo leite mesmo antes do desenvolvimento de lesões teciduais (ROXO, 1997).

Sobre isso, Ball (1943) relata que a contaminação natural máxima do leite por *M. bovis* pode chegar a 10^4 UFC/mL mas, segundo Lerche (1969), como o leite não apresenta alterações visíveis fica difícil a detecção para segregação e adequado tratamento do produto.

Motivado pela melhoria das condições de saúde pública animal e humana, o governo brasileiro lançou o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal, que padroniza as ações profiláticas, de diagnóstico e de vigilância sanitária ativa, visando baixar a prevalência e a incidência de novos casos da doença, e criar um número significativo de propriedades certificadas que oferecem ao consumidor produtos de baixo risco sanitário (BRASIL, 2004).

3.3 Micobactérias

A primeira característica pela qual o microrganismo é classificado como micobactéria é a “ácido-resistência”, ou seja, essas bactérias resistem à descoloração com álcool acidificado quando coradas com carbolfucsina (KONEMAN et al., 2001).

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium*. São bacilos curtos aeróbicos, imóveis, não capsulados, não flagelados, apresentando aspecto granular quando corados, medindo de 0,5 a 0,7 micrômetros de comprimento por 0,3 micrômetros de largura. Diferem das demais bactérias em uma série de propriedades, muitas das quais estão relacionadas com a quantidade e tipos de lipídeos complexos que estes germes contêm na parede celular (KANTOR, 1979).

O gênero *Mycobacterium* é altamente exigente no que se refere a nutrientes, quando comparados com outras bactérias patogênicas (BALIAN et al., 2002).

Além dos prejuízos, de longa data já registrados, tanto para a saúde humana quanto animal causados pelas micobactérias de crescimento lento, entre elas o *M. tuberculosis*, *M. bovis* e o complexo *M. avium*, tem sido observado também um aumento da ocorrência de doenças associadas às micobactérias de crescimento rápido, como o *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* (BALIAN et al., 2002; BLANCO et al., 2002; FALKINHAM, 1996).

Essas micobactérias são ambientais, porém, patógenos oportunistas e podem ser encontrados no solo e na água (rios, lagos e água tratada) (BLANCO et al., 2002), e podem crescer em um amplo intervalo de temperatura, pH, salinidade e tensão de

oxigênio. As doenças por elas causadas não são exclusivamente pulmonares, podendo acometer outras regiões do corpo humano, principalmente em pacientes imunodeficientes como os HIV positivos (FALKINHAM, 1996).

3.4 Pasteurização e Resistência Térmica

No início do século XX, a comunidade científica mundial reconheceu a pasteurização do leite como método importante no combate à alta incidência de doenças humanas diretamente relacionadas ao consumo de leite cru e determinou padrões comerciais para seu tratamento térmico, o que resultou em um decréscimo significativo das doenças transmitidas pelo leite (STABEL, 2003).

A termo-resistência do *Mycobacterium* spp e da *Coxiella burnetti* é o critério empregado na definição do binômio tempo x temperatura de pasteurização do leite, pois são os microrganismos patogênicos mais resistentes que, comumente, contaminam o leite (BEHMER, 1991).

North e Park, em 1927, mostraram que o tratamento a 61,1°C por 30 minutos era eficaz contra o *M. tuberculosis*; porém, Huebner et al. em 1949, verificaram que a *Coxiella burnetti* era mais resistente, sobrevivendo à 61,7°C/30 minutos. Em 1957, Enright et al¹. (apud SUNG; COLLINS, 1998) recomendaram a elevação da temperatura de pasteurização lenta nos EUA, de 61,7°C para 62,8°C, que foi eficaz para matar aproximadamente 10⁶ células de *Coxiella burnetti* por mililitro.

A escassez de dados sobre a resistência do *M. tuberculosis* var. *bovis* motivou Kells e Lear a estudarem, em 1960, a curva de tempo de morte térmica do agente, em

¹ ENRIGHT, J. B.; SADKER W. W.; THOMAS, R. C. Thermal inactivation of *Coxiella burnetti* and its relation to pasteurization of milk. **Public Health Monograph**. v. 47, n.54, p. 1-30, 1957.

leite bovino, e encontraram que a relação 61,6°C por 30 minutos oferecia uma margem de segurança de aproximadamente 28,5 minutos, considerando uma concentração inicial de *M. bovis* de 10⁴ UFC/mL de leite. Em 1965, Harrington e Karlson submeteram *M. bovis*, *M. avim* e *M. fortuitum* à pasteurização lenta e rápida em leite desnatado, pelo método do tubo-teste, concluindo que houve a desvitalização completa das 3 espécies.

Nesse sentido, vale ressaltar que, no Brasil, a legislação Federal remonta à década de 50, e define como parâmetros de pasteurização lenta, 62 a 65°C por 30 minutos (BRASIL, 1952), enquanto a legislação estadual estabelece 63 a 65°C por 30 minutos (SÃO PAULO, 1994); já o critério para a pasteurização rápida é coincidente (72 a 75°C por 15 a 20 segundos).

A pasteurização lenta é a mais utilizada pelas micro e pequenas usinas beneficiadoras/queijarias devido a menor modificação do leite, menor desnaturação da albumina, globulinas e menor insolubilização dos sais de cálcio (BEHMER, 1968; PORTO, 1998), e se caracteriza pelo baixo custo e maior flexibilidade das instalações, embora exija um controle mais efetivo do processo (CARVALHO, 1998).

Entende-se por pasteurização, segundo a legislação brasileira, “o emprego conveniente do calor, com o fim de destruir totalmente a flora microbiana patogênica sem alteração sensível da constituição física e do equilíbrio do leite, sem prejuízo de seus elementos bioquímicos, assim como de suas propriedades organolépticas normais”; o controle do processo deve ser confirmado pelas enzimas fosfatase alcalina e peroxidase, que devem resultar, respectivamente, negativa e positiva no leite pasteurizado (BRASIL, 1952).

A fosfatase alcalina é uma enzima termo sensível que está sempre presente no leite cru, porém, é mais resistente que o *Mycobacterium* spp, e quando o leite é aquecido em temperatura e tempo ótimos de pasteurização, ela é destruída (BEHMER, 1991).

A peroxidase, sempre presente no leite cru, é inativada à 85°C, devendo estar intacta no leite pasteurizado; sua inativação é indício de sobre-aquecimento do leite (PORTO, 1998)

Com o intuito de compreender melhor a destruição térmica dos microrganismos, o valor “D” pode ser estudado. Ele é normalmente denominado de tempo de redução decimal, ou seja, é o tempo necessário para reduzir o número de microrganismos a um décimo de seu inicial, a uma temperatura específica (TEIXEIRA NETO, 2000).

A morte dos microrganismos, quando submetidos a uma dada temperatura, é logarítmica, ou seja, quando se coloca num gráfico semi-logarítmico, na ordenada o número de microrganismos sobreviventes (em log), e na abscissa o tempo de aquecimento, obtém-se uma linha reta. Através deste gráfico, anotando-se dois pontos na reta, correspondendo à redução de um ciclo logarítmico dos sobreviventes, e projetando-os ao eixo referente ao tempo, encontra-se o valor D (Figura 1); esse dado é de alta relevância para a análise de risco, possibilitando calcular o nível de segurança conferido ao produto devido a um processamento térmico (TEIXEIRA NETO, 2000).

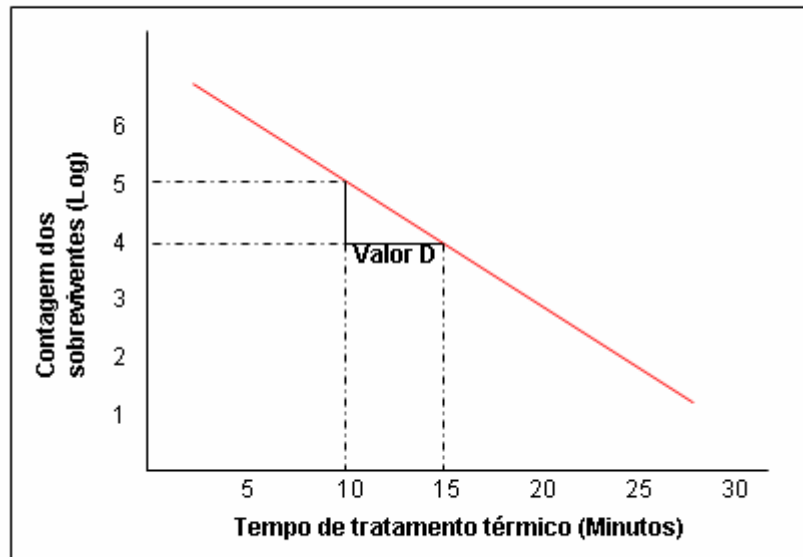


Figura 1 – Gráfico semi-logarítmico para o cálculo do Valor D

A eficácia do tratamento térmico não depende somente do tempo e da temperatura empregados, mas também de outros fatores que afetam a morte térmica dos microrganismos, como a carga microbiana inicial, a atividade de água, pH, NaCl, proteínas e porcentagem de gordura dos produtos (CHHABRA et al., 1999).

As teorias sobre o aumento da resistência térmica dos microrganismos em produtos com elevado teor de gordura relacionam-se à baixa condutividade térmica ou à reduzida atividade de água na porção gordurosa (CHHABRA et al., 1999).

Quanto maior a quantidade de microrganismos, maior a quantidade de calor necessária para destruí-los; o mecanismo que tenta explicar essa proteção está relacionado à produção de substâncias excretadas pelas células, que as protegeriam (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Embora haja poucos dados sobre o comportamento do *Mycobacterium* spp em diferentes substratos, especialmente quanto ao teor de gordura, há estudos que

revelam a importância das características do substrato sobre a resistência térmica de outros microrganismos.

Surtos provocados por *Listeria monocytogenes* justificaram estudos sobre sua resistência térmica. Em 1986, Donnelly e Briggs observaram pouca diferença no tempo de morte térmica para o agente em leite desnatado e integral quando a gordura foi estudada como único fator afetando sua resistência térmica. No entanto, Chhabra et al. (1999) estudaram os efeitos do pH, gordura do leite e temperatura na inativação da *L. monocytogenes* e verificaram que o efeito protetor da gordura foi importante na região de máxima morte térmica da curva de sobreviventes; observaram também que às temperaturas mais altas, as curvas de sobreviventes tendem a ser mais lineares.

Em 1993, MacDonald e Sutherland pesquisaram o efeito do aquecimento a 65°C em método de tubo-teste sobre bactérias gram negativas e *L. monocytogenes* em leite da espécie bovina, caprina e ovina, com diferentes níveis de gordura. Concluíram que a gordura aumenta a resistência térmica dos agentes, embora nenhuma *Listeria* tenha sido recuperada após 30 minutos de tratamento; que não é somente a quantidade de gordura que afeta a resistência térmica, mas também a composição dos ácidos graxos; e que o leite de ovelha apresenta fatores que protegem a bactéria do aquecimento. Isto foi concluído porque a adição da gordura do leite de ovelha aos leites desnatados de vaca, cabra e ovelha resultaram em valor D maior do que quando a gordura do leite de vaca, ou de cabra, foi adicionada aos leites desnatados.

Estudos com *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. indicaram que a composição do ácido graxo presente na fração lipídica pode ter um efeito estabilizante sobre seus

esporos durante o processamento térmico, entretanto, o autor diz que há necessidade de estudos sobre a fisiologia deste efeito (MOLIN; SNYGG, 1967).

Com relação às micobactérias, pouco foi reportado sobre a sua resistência térmica entre as décadas de 60 e 90, embora a microbiologia tenha se desenvolvido muito. Além disso, eventualmente, as micobactérias podem ter sofrido adaptação/seleção devido, por exemplo, ao uso corriqueiro da pasteurização. A partir da década de 90, estudos foram desenvolvidos para avaliar se a pasteurização empregada garantiria adequado nível de segurança contra o *M. paratuberculosis*, como pode ser observado pelas várias publicações. Isso porque o agente é causador da doença de Johne nos animais, podendo ser veiculado pelo leite cru, e suspeita-se que esteja relacionado com a ocorrência da doença de Crohn no homem (GRANT; BALL; ROWE, 1996; GRANT et al., 1996; LUND; GOULD; RAMPLING, 2002; STABEL, 2001, 2003; SUNG; COLLINS, 1998, 2000).

Comparando a resistência térmica de micobactérias, Pavlas (1990), reporta que o *M. bovis* é mais sensível ao calor (foi eliminado em 2 minutos a 65°C) que as outras micobactérias (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. gordonae*). Em contraposição, Jay (1992) e Grant, Ball e Rowe (1996) relataram que o *M. fortuitum* mostrou ser mais termo sensível que *M. avium*, *M. bovis*, *M. intracellulare* e *M. kansaii*.

Segundo McFadden (1992), um fator que pode influenciar na resistência térmica de muitas micobactérias é a tendência de formar grumos em meios líquidos, devido à natureza hidrofóbica da sua parede celular.

Outro aspecto importante são as diferenças nos padrões de formação desses grumos, o que pode influenciar na cinética de inativação térmica quando se compara

o padrão de agrupamento do *M. bovis* com outras espécies, exceto quando se compara com o *M. fortuitum* (GRANT; BALL; ROWE 1996).

Sung e Collins (1998) calcularam o valor D (62, 65, 68 e 71°C) de cepas de origem humana e bovina de *Mycobacterium paratuberculosis* em solução de lactato e em leite, concluíram que o agente foi mais termotolerante do que o *M. bovis* e que poderia sobreviver à pasteurização rápida quando a concentração inicial de organismos fosse maior que 10^1 células por mililitro de leite, pois o $D_{71^\circ\text{C}}$ foi igual a 11,7 segundos, no entanto, haveria maior segurança na pasteurização lenta, cujo o valor $D_{65^\circ\text{C}}$ foi de 47,8 segundos. Comparativamente o valor D foi maior no leite que no lactato, em todas as temperaturas estudadas, mostrando a importância do substrato na sobrevivência do agente.

Os autores testaram ainda, em meio lactato, dois métodos de quantificação das células, por método de cultura radiométrica (BACTEC) e contagem padrão em placas, para o cálculo do valor $D_{62^\circ\text{C}}$. A curva de sobreviventes referente à contagem em placas não foi linear ($R^2=0,61$) e o valor D foi de 11,2 min enquanto que pelo método radiométrico a curva foi linear ($R^2=0,95$) e o D foi mais baixo, 5,4 min. Sugerem que a contagem em placas não seria tão exata quanto à radiométrica para estudos de termotolerância desse agente, devido à influência da formação de grumos na contagem de células viáveis. No entanto esses autores não encontraram diferença significativa, em lactato, no valor $D_{65^\circ\text{C}}$ do *M. paratuberculosis* entre amostras com grumos e sem grumos.

Leite et al. (2003) pesquisaram a presença de micobactérias em 78 amostras de leite cru, 40 amostras de leite pasteurizado (71,7°C por 15 segundos), e 10 amostras de leite esterilizado pelo processo UHT (150°C por 2 segundos). Foram encontradas micobactérias em 23 das 128 (18%) amostras de leite, distribuídas da seguinte

forma: no leite cru, foram encontradas 1 (1,3%) *M. bovis* e 13 (16,7%) micobactérias de crescimento rápido, sendo 4 (30,8%) identificadas como *M. fortuitum*; no leite pasteurizado, foram encontradas 9 (22,5%) micobactérias de crescimento rápido, sendo 2 (22,2%) identificadas como *M. fortuitum*. No leite esterilizado não foram isoladas micobactérias.

Em 2002, Lund, Gould e Rampling fizeram uma revisão crítica sobre as informações relacionadas com a resistência térmica do *M. avium* subsp. *paratuberculosis* no leite em relação às condições de pasteurização. E ressaltaram que as diferenças nos resultados obtidos por vários autores (que variaram de <2 reduções decimais à >10, considerando 63°C/30min), podem estar relacionadas aos fatores: a) características do agente (natureza hidrofóbica, formação de grumos); b) tratamento do inóculo (congelamento prévio, utilização ou não de substância para quebra de grumos na suspensão); c) método de pasteurização (tubo teste, tubo selado submerso, tubo capilar, tempo requerido para atingir a temperatura desejada); d) meio de cultura para a contagem, entre outros; Sung e Collins (1998) relataram diferenças devido ao método de quantificação.

O *M. paratuberculosis* suscitou, ainda, a preocupação com a sua inativação por processamentos não térmicos, como mostram Sung e Collins (2000) que, após contaminarem o leite pasteurizado com para fabricação de queijo branco macio (tipo hispânico) curado por 60 dias a 4°C, observaram que o valor $D_{4^{\circ}\text{C}}$ no queijo foi de 59,9 dias. Assim, se produzido com leite cru, com contaminação acima de 1 log UFC/mL, a cura do queijo não garantiria adequada margem de segurança.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Ressalta-se que foram realizadas 3 repetições de pasteurização lenta com amostra de leite bovino integral e 3 com leite desnatado contaminados com *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573). Considerou-se integral o leite obtido na ordenha, sem alteração posterior de seu conteúdo original, e como leite desnatado, aquele que foi submetido, no laboratório, ao desnate (método descrito no momento oportuno, mais adiante).

4.1 Amostras de leite

Com o intuito de minimizar as diferenças entre as amostras de leite, todas foram obtidas de uma única vaca sabidamente negativa ao teste da tuberculina, proveniente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Foi realizado manejo higiênico pré-ordenha: com inicial lavagem dos tetos e do úbere do animal com solução de Lysoform (diluído 1:3 em água); secagem com papel toalha, inicialmente no orifício do teto e depois com movimentos ascendentes até a base do teto; posterior desinfecção dos tetos e mãos do ordenhador com algodão banhado em álcool iodado. Foram desprezados os primeiros jatos de leite e realizado o teste do fundo escuro, para verificar a presença de grumos indicando possível alteração do leite, e descarte da amostra em caso de teste positivo.

Para coleta foi utilizado erlenmeyer de 1 litro com tampa, previamente esterilizado em autoclave, 121°C por 15 minutos. No momento da ordenha, o erlenmeyer foi posicionado afastado 15cm e inclinado à aproximadamente 45° do teto, para evitar a contaminação da amostra.

Em cada repetição foram coletados 200 mL de leite e imediatamente transportados ao Laboratório de Higiene Alimentar da FMVZ – USP. As amostras foram refrigeradas em temperatura de aproximadamente 4°C por no máximo 3 dias, até a sua utilização.

4.2 Controles realizados no leite

Foram realizados alguns procedimentos de controle nas amostras de leite, como a prova de esterilidade, análise da porcentagem de gordura e o desnate das amostras.

4.2.1 Prova de esterilidade

Para atestar que o protocolo empregado na ordenha não comprometeria a qualidade microbiológica do leite, a primeira amostra de leite coletado foi semeada em ágar sangue e incubada a 37°C por 5 dias, comprovando sua esterilidade.

4.2.2 Análise da porcentagem de gordura

As amostras de leite integral e desnatado tiveram as suas porcentagens de gordura verificadas através do método ácido-burômetro de Gerber, estabelecido nos Métodos Analíticos para o controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes – Métodos Físico-Químicos, do Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA (BRASIL, 1981).

4.2.3 Desnate das amostras de leite destinadas à experimentação

Processo realizado nas 3 amostras em que se estudou a pasteurização de leite desnatado contaminado com *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573). Para obtenção de leite desnatado as amostras de leite (cerca de 200 mL) foram acondicionadas em tubos plásticos de 50 mL estéreis e submetidas ao desnate por centrifugação a 5000 rpm durante 15 minutos, utilizando-se centrífuga BECKMAN refrigerada à 0°C, do modelo J2-21 da ESALAB. Após a centrifugação, foi retirada a nata de gordura sobrenadante e o leite desnatado foi recolhido em erlenmeyer estéril.

4.3 Inóculo

Foi utilizada cultura de *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573) proveniente do Centro Panamericano de Zoonoses, com até 7 dias de cultivo em tubos com meio Lowenstein-Jensen ou Petragnani, cedida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Todo procedimento de manipulação do inóculo e do leite foi realizado em fluxo laminar, previamente descontaminado utilizando-se álcool 70%, seguido de luz ultravioleta por aproximadamente 30 minutos.

O inóculo utilizado na contaminação do leite foi padronizado de forma a obter uma concentração do *Mycobacterium fortuitum* próxima a 10^7 UFC/mL de leite (Apêndice A – Projeto piloto de padronização do inóculo), e assim permitir a quantificação do agente durante e após o tratamento térmico, garantindo a obtenção da curva de sobreviventes.

Três tubos contendo cultura de *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573) foram numerados e pesados em balança de precisão. Com uma haste de plástico retirou-se quantidade aproximada de 0,600 g de colônias dos tubos, colocando-as em cadinho estéril. Essa massa de *M. fortuitum* foi diluída em 1mL de solução salina 0,85% com 0,05% de tween 80 e macerada vigorosamente. Em seguida, foram adicionados 24mL de solução salina 0,85%, até completar 25 mL de volume do inóculo, que foi transferido para erlenmeyer esterilizado contendo pérolas de vidro para evitar formação de grumos.

A figura 2, a seguir, ilustra este procedimento de preparação do inóculo.

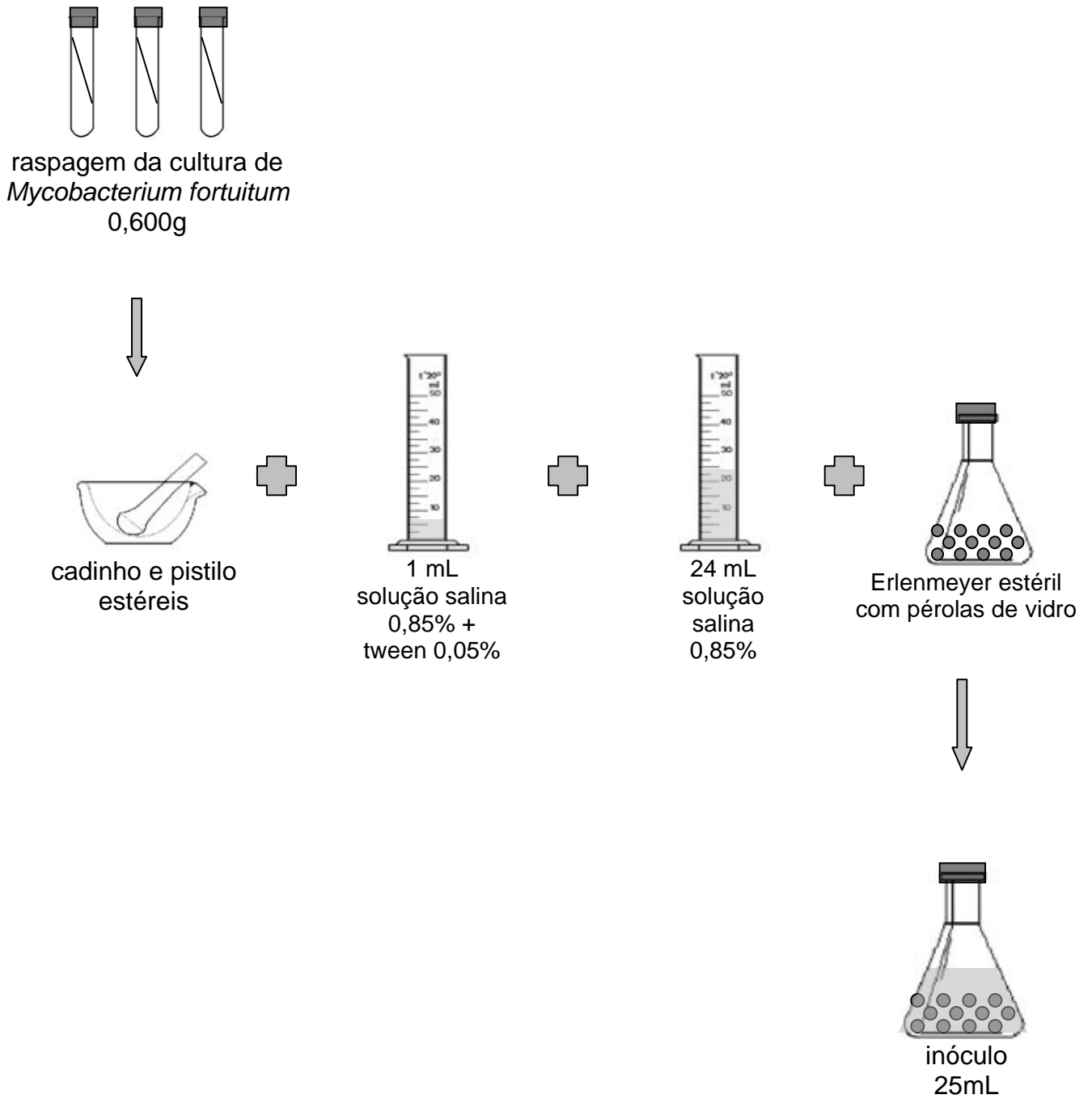


Figura 2 – Preparação do inóculo

4.4 Contaminação do leite

O inóculo foi homogeneizado vigorosamente e, então, retirados 2 mL para a contaminação de 50 mL de leite.

O leite contaminado foi homogeneizado e distribuído em 8 tubos 16x160 mm estéreis (5 mL em cada), identificados com os tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, e um tubo nomeado como controle de contaminação do leite. Essas sub-amostras foram submetidas ao tratamento térmico em banho-maria, com exceção da sub-amostra controle de contaminação do leite, que foi utilizada para a contagem do número de colônias inicial do leite inoculado.

A figura 3, a seguir, ilustra este procedimento de contaminação do leite e obtenção das sub-amostras.

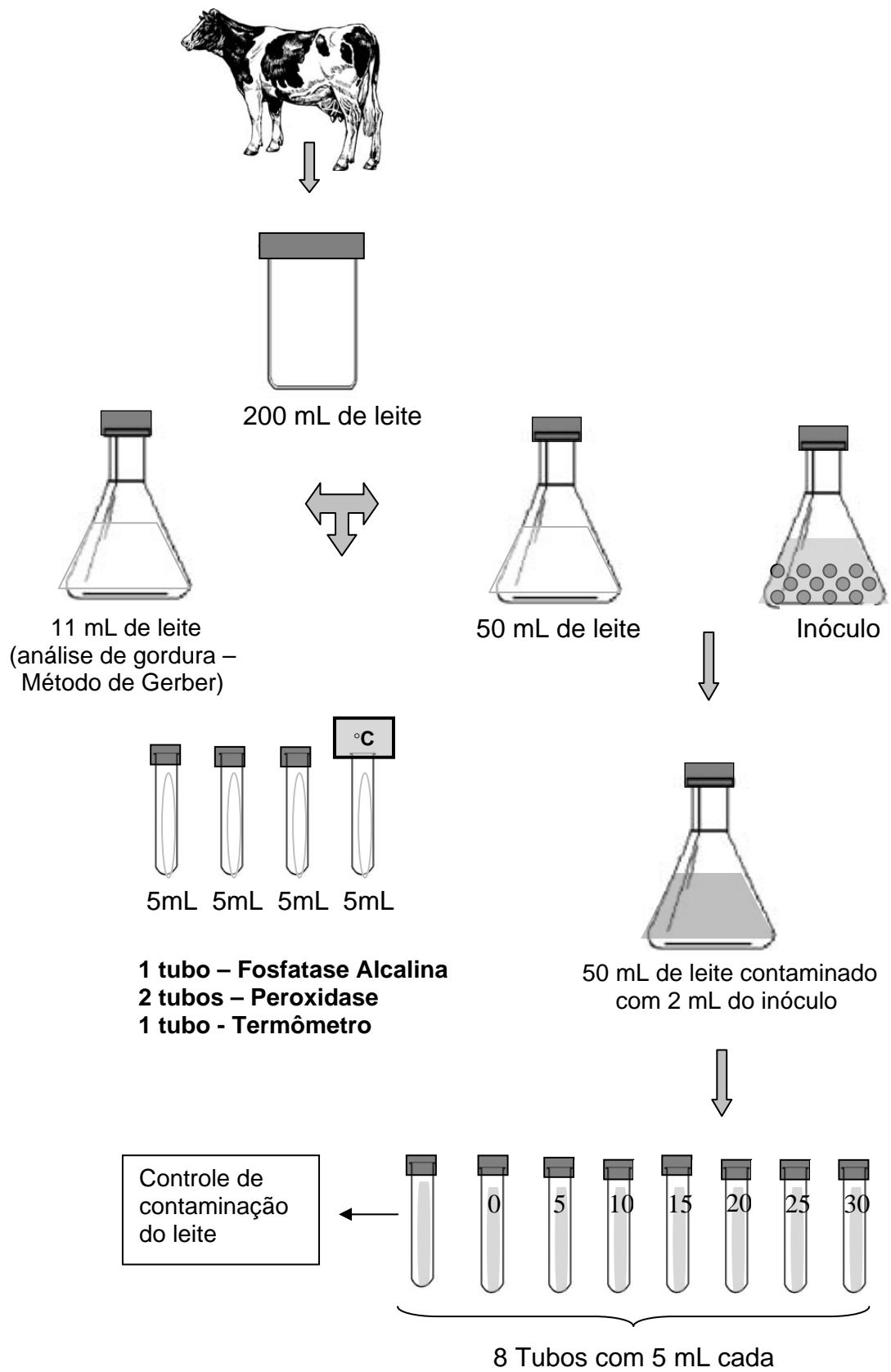


Figura 3 - Contaminação do leite e obtenção das sub-amostras

4.5 Pasteurização

Com o intuito de agilizar o processo de aquecimento do leite e mimetizar o processo natural de pasteurização lenta feita em tanques, foi realizada uma etapa de pré-aquecimento dos tubos em banho-maria a 85°C até que fosse atingida a temperatura de 65°C. (Apêndice B – Piloto de pré-aquecimento).

Ao atingir a temperatura de 65°C, retirou-se para análise a sub-amostra 0 (que foi colocada em banho de gelo) e o restante das sub-amostras foram transferidas ao banho-maria à 65°C, para manutenção da temperatura, iniciando-se a contagem do tempo de pasteurização.

A sub-amostra 0 foi utilizada para avaliar esta etapa de aquecimento do leite, até que atingisse a temperatura desejada de 65°C.

Alcançando-se o tempo desejado de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, os respectivos tubos eram retirados do banho-maria e colocados em um banho de gelo para cessar o efeito térmico sobre as células.

4.6 Controle do processo de pasteurização

Foram colocados no banho-maria mais 4 tubos com leite não inoculado, e com o mesmo volume de leite das sub-amostras, desde o aquecimento até o fim do tratamento térmico. Em um desses tubos foi colocado um termômetro, com o intuito

de controlar a temperatura, tomando-se o cuidado para que o bulbo do termômetro não entrasse em contato com as paredes do tubo. Os outros tubos foram empregados para pesquisa das enzimas fosfatase alcalina (1 tubo) e peroxidase (2 tubos) (BRASIL, 1981).

4.6.1 Fosfatase Alcalina

Após o tratamento térmico, utilizou-se o teste colorimétrico da Laborclin para determinação qualitativa da enzima fosfatase alcalina no leite. É um teste que consiste na mistura 2mL de amostra de leite para 1mL de reagente e posterior incubação em banho-maria a 37°C por 10 minutos. A presença de fosfatase alcalina é caracterizada pela coloração amarela na mistura.

4.6.2 Peroxidase

A verificação qualitativa da enzima peroxidase foi realizada seguindo-se os procedimentos recomendados pelos Métodos Analíticos para o controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes – Métodos Físico-Químicos, do Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA (BRASIL, 1981).

4.7 Diluição e Semeadura das sub-amostras

Terminado o tratamento térmico, cada sub-amostra resfriada - tubos 0 a 30 minutos e o tubo que não sofreu tratamento térmico (tubo controle de contaminação do leite) - foi submetida à diluição decimal seriada até 10^{-7} , usando como diluente, a solução salina estéril 0,085%. Após homogeneização vigorosa em vórtex por 10 segundos, 0,1mL de cada diluição foi semeado, empregando-se micropipetas estéreis, na superfície do meio Löwenstein-Jensen (placas), em duplicata. As placas semeadas foram vedadas com parafilm, para evitar que ressecassem, e incubadas por 5 dias em estufa à 37°C, conforme Koneman et al. (2001).

A figura 4, a seguir, ilustra os procedimentos de pasteurização, diluição e semeadura das sub-amostras.

O meio de cultura *Lowenstein-Jensen* foi preparado segundo a técnica do Centro Panamericano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985).

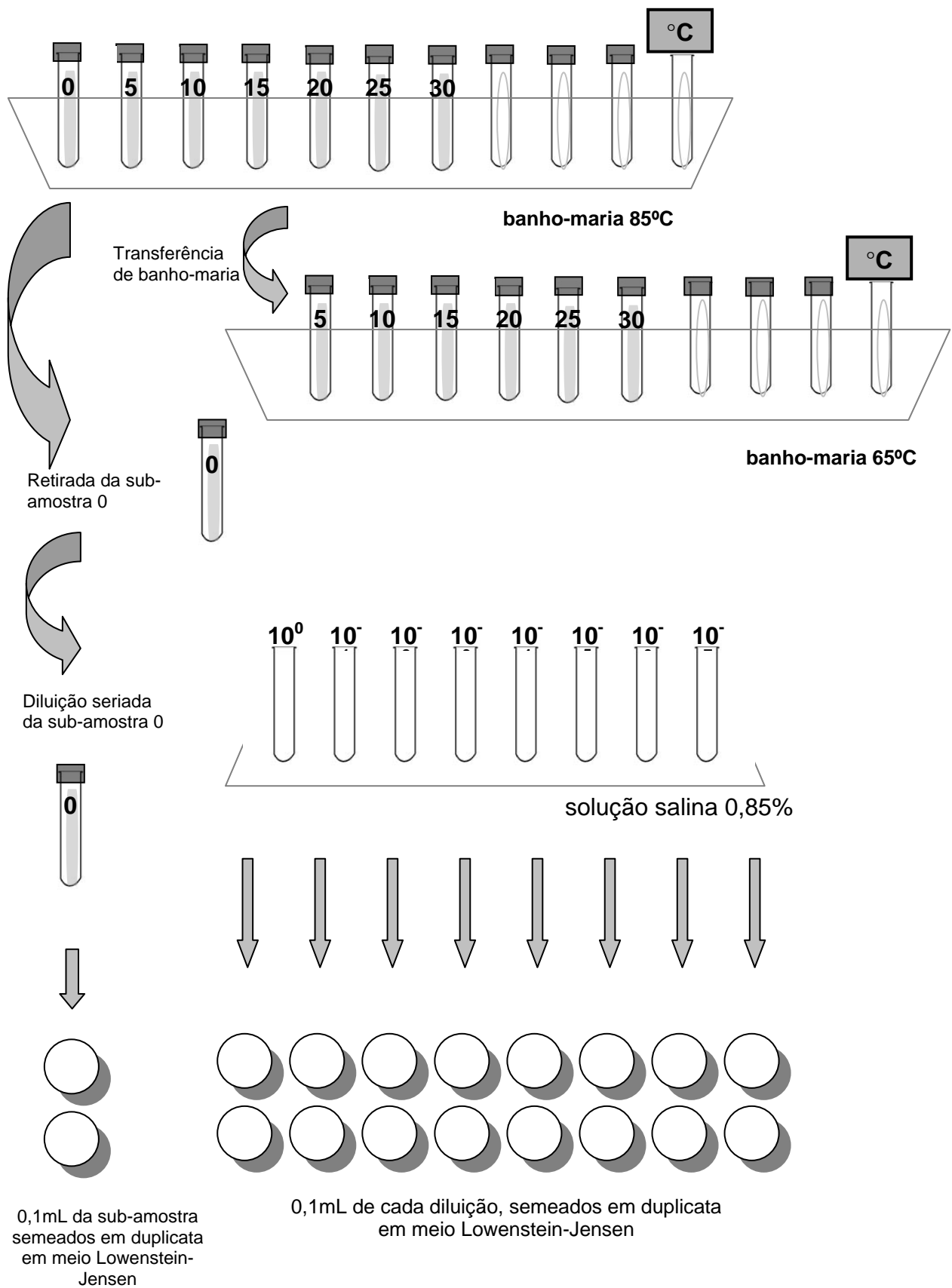


Figura 4 - pasteurização, diluição e semeadura das sub-amostras

4.8 Contagem de colônias e registro de resultados

Para o registro dos resultados, considerou-se a média das UFC entre as duplicatas da diluição que apresentou entre 15 e 150 colônias.

4.9 Construção da curva de sobreviventes e Cálculo do valor D

Os dados das 3 repetições do leite integral geraram um único gráfico com os resultados das contagens (log de sobreviventes) na ordenada, e os tempos (0 a 30 minutos) na abscissa. O mesmo foi feito com os dados obtidos com o leite desnatado. Nota-se que não foram utilizados os resultados da sub-amostra “controle da contaminação do leite”.

A partir da equação da reta, o valor D foi calculado: elegeu-se 2 pontos da ordenada que compreendessem um ciclo logarítmico e, para cada ponto, obteve-se o respectivo valor de x (tempo); a diferença entre os dois tempos ($x_2 - x_1$) corresponde ao valor $D_{65^\circ\text{C}}$ do *M. fortuitum*. Os resultados da análise do controle de contaminação do leite não foram considerados para a construção da reta, apenas os resultados provenientes do tratamento térmico.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Vale ressaltar que as sub-amostras de leite contaminado levaram cerca de 32 segundos para atingir 65°C no banho-maria a 85°C quando foram, então, transferidos para o banho-maria a 65°C, iniciando a contagem do tempo de tratamento térmico (Apêndice B - Piloto de pré-aquecimento).

5.1 Leite integral

Os resultados obtidos na contagem das colônias (log UFC/mL) nos diferentes momentos da pasteurização estão contidos no quadro 1. Ressalta-se que todas as repetições apresentaram resultado negativo para a enzima fosfatase alcalina e positivo para peroxidase, comprovando que houve observância dos parâmetros de tempo e temperatura mínimo e máximo estabelecidos para a pasteurização.

O teor de gordura do leite integral nas repetições 1, 2 e 3 foram, respectivamente: 5,8; 6,0 e 6,0%.

	Controle da contaminação do leite	Tempo (minutos)						
		0*	5	10	15	20	25	30
Repetição 1	6,8	4,3	4,2	3,5	3,8	3,2	3,1	2,2
Repetição 2	6,8	4,6	4,5	4,0	3,9	3,7	3,6	3,0
Repetição 3	5,8	4,4	4,6	4,1	4,1	4,1	3,7	2,5

*início da pasteurização (quando a temperatura da sub-amostra atingiu 65°C)

Quadro 1 – Resultados em log das contagens de UFC/mL de *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573) no controle de contaminação do leite bovino integral e nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos do tratamento térmico a 65°C, em cada repetição

Os gráficos 1, 2 e 3 ilustram as curvas de sobreviventes (e suas equações) do *Mycobacterium fortuitum* em leite bovino integral obtidas em cada repetição; o gráfico 4 mostra a melhor curva de sobreviventes (e sua equação), obtida a partir das 3 repetições.

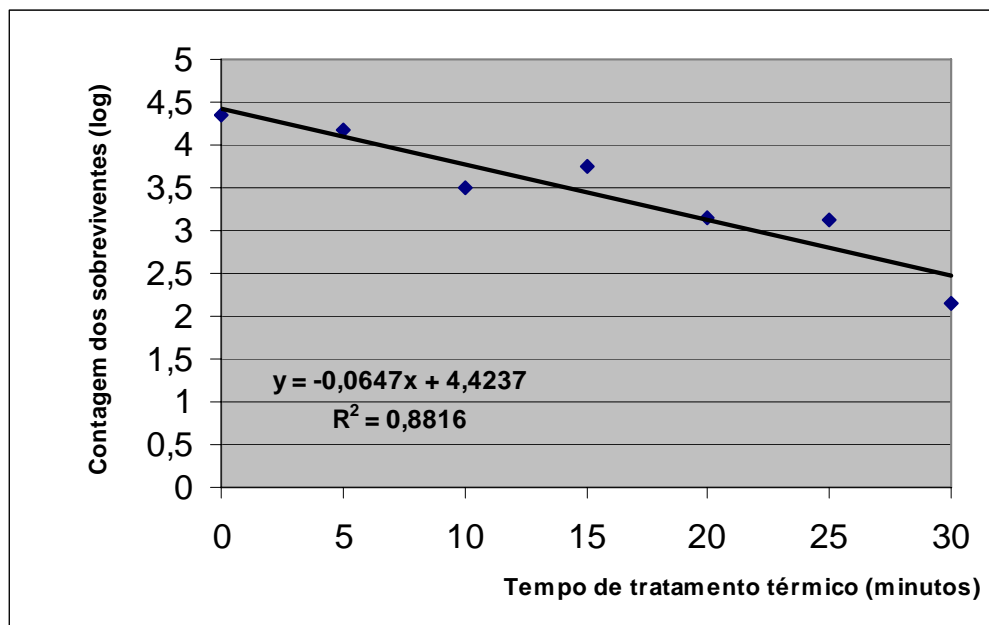


Gráfico 1 – Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino integral nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear. Repetição 1

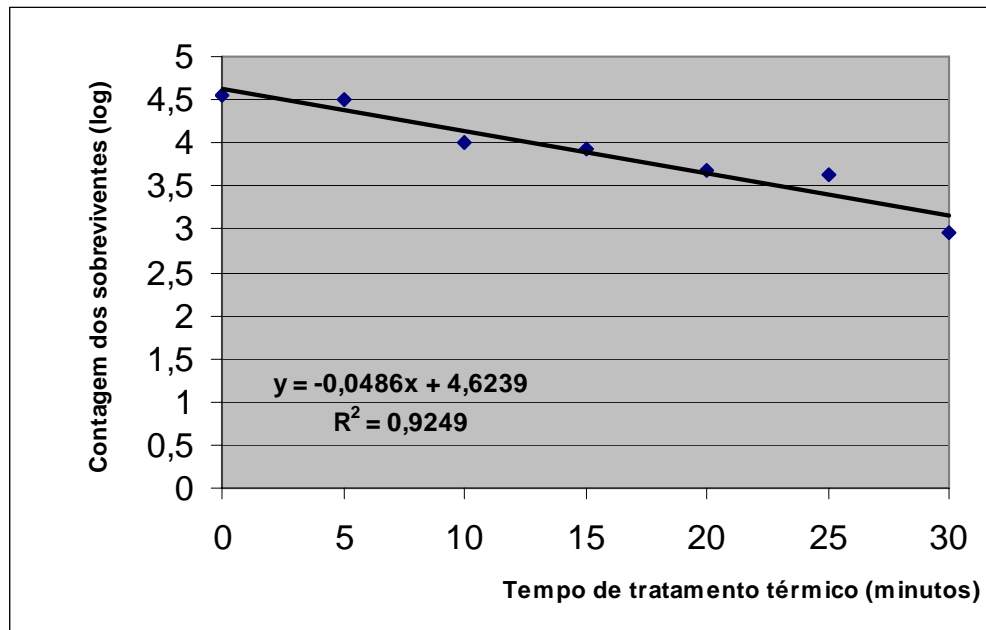


Gráfico 2 – Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino integral nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear. Repetição 2

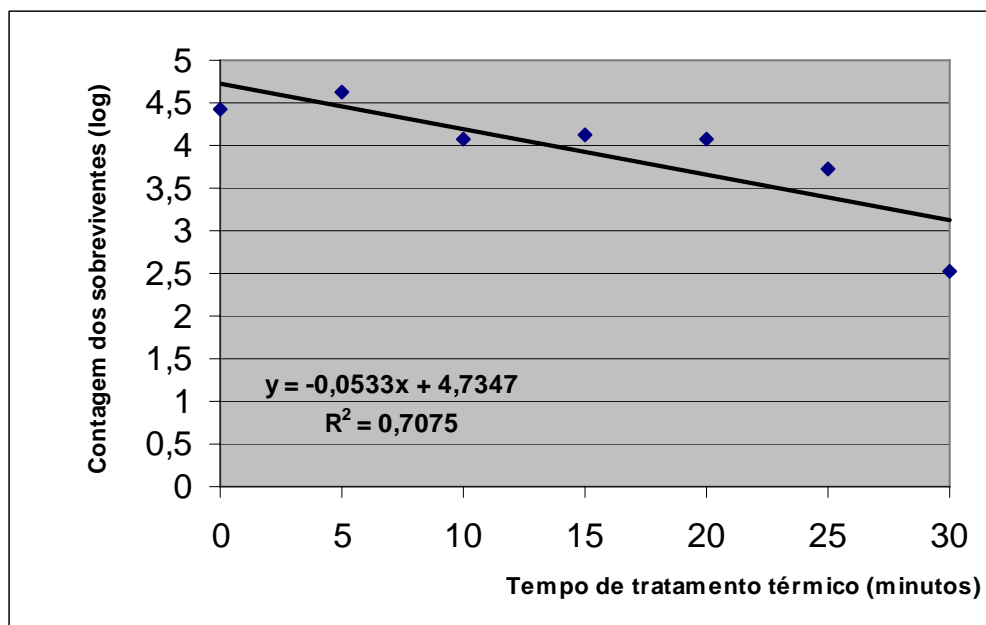


Gráfico 3 – Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino integral nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear. Repetição 3

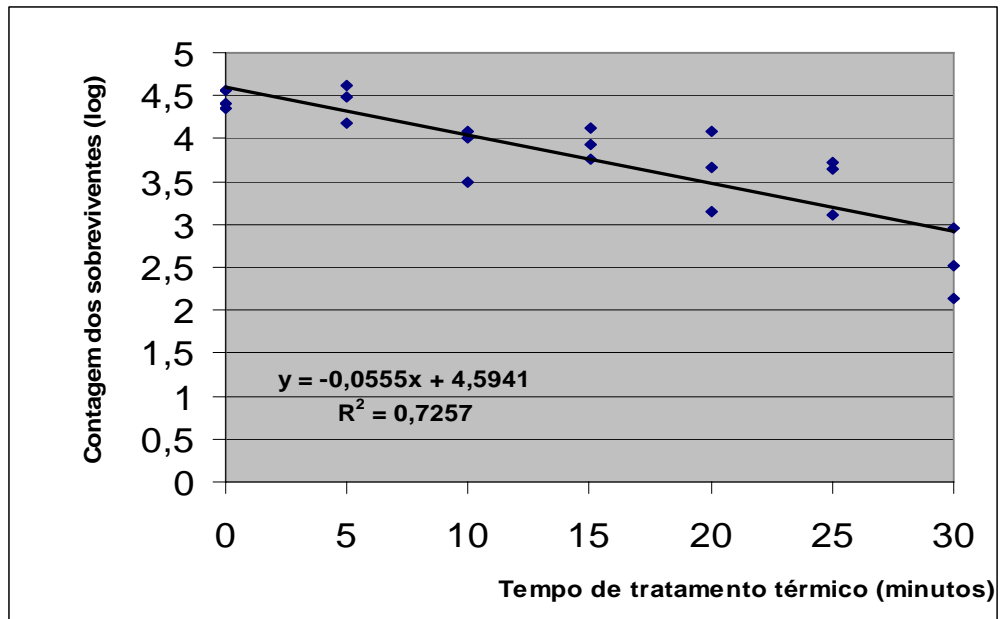


Gráfico 4 – Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino integral nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear, obtida à partir das três repetições

Os valores de $D_{65^{\circ}\text{C}}$ em leite integral, obtidos a partir da equação de cada reta foram: 15,46; 20,57 e 18,77 para as repetições 1, 2 e 3, respectivamente e de 18,02 minutos considerando a melhor reta para as 3 repetições.

5.2 Leite desnatado

Os resultados obtidos na contagem das colônias (log UFC/mL) nos diferentes momentos do tratamento térmico estão contidos no quadro 2. Ressalta-se que todas as repetições apresentaram resultado negativo para a enzima fosfatase alcalina e positivo para peroxidase, comprovando que houve observância dos parâmetros de tempo e temperatura mínimo e máximo estabelecidos para a pasteurização.

O teor de gordura do leite desnatado nas 3 repetições foi de 0,2%.

	Controle de contaminação do leite	Tempo (minutos)						
		0*	5	10	15	20	25	30
Repetição 1	7,2	6,8	3,3	3,3	2,7	2,9	2,4	2,5
Repetição 2	7,2	6,9	3,6	2,6	3,0	3,8	2,0	1,6
Repetição 3	7,0	6,8	3,7	3,3	3,3	3,3	2,1	1,0

* início da pasteurização (quando a sub-amostra atingiu 65°C)

Quadro 2 – Resultados em log das contagens de UFC/mL de *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573) em leite bovino contaminado desnatado e nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos do tratamento térmico a 65°C, em cada repetição

Os gráficos 5, 6 e 7 ilustram as curvas de sobreviventes (e suas equações) do *Mycobacterium fortuitum* em leite bovino desnatado obtidas em cada repetição; o gráfico 8 mostra a melhor curva de sobreviventes (e sua equação), obtida à partir das 3 repetições.

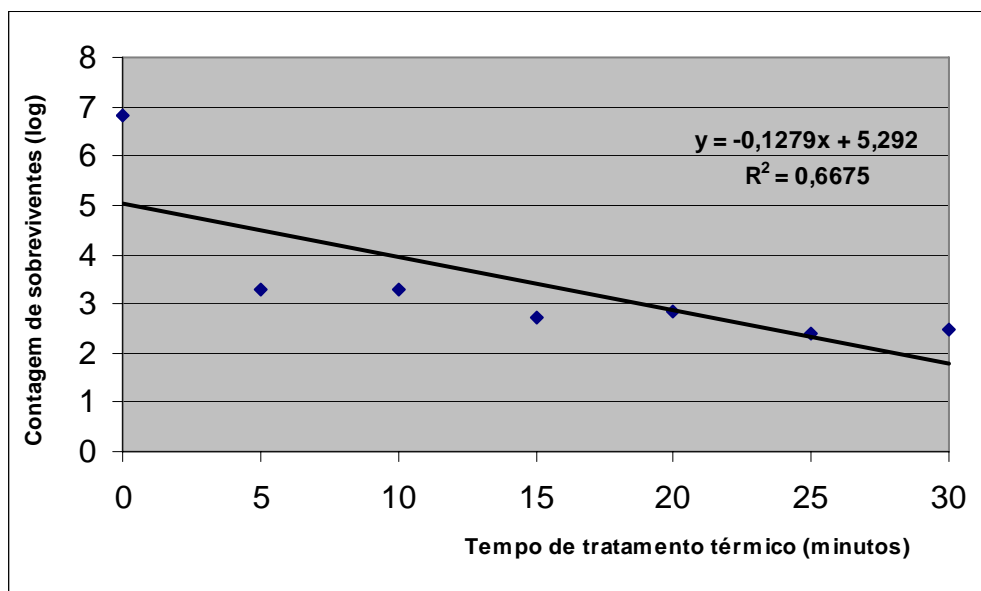


Gráfico 5 – Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino desnatado nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear. Repetição 1

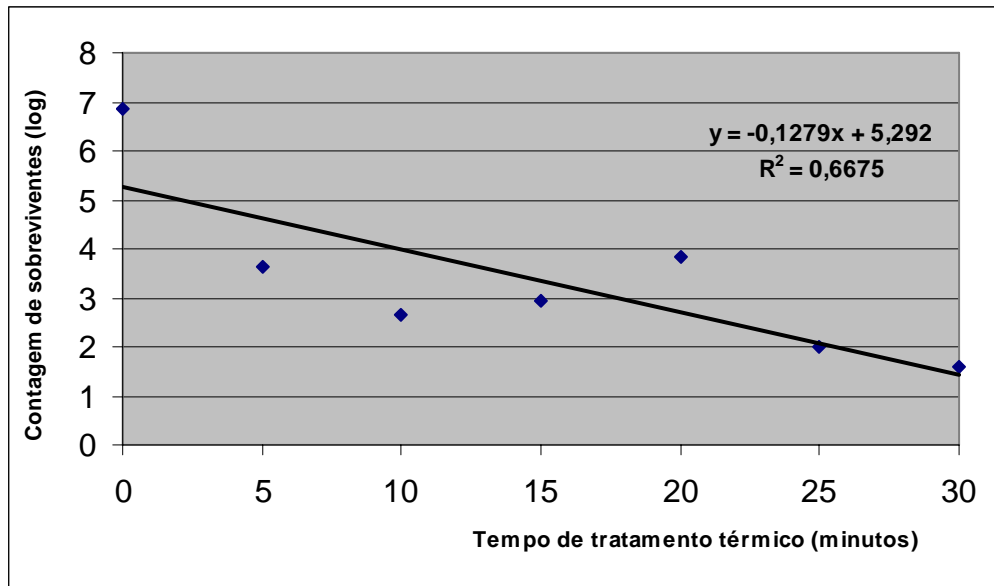


Gráfico 6 – Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino desnatado nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear. Repetição 2

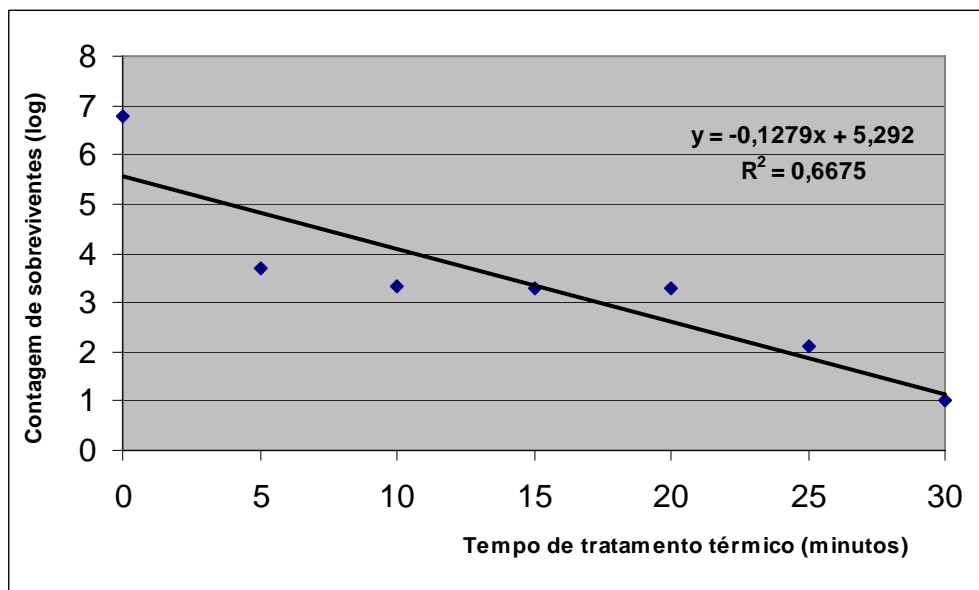


Gráfico 7 – Curva de sobreviventes do *M. fortuitum* em leite bovino desnatado nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear. Repetição 3

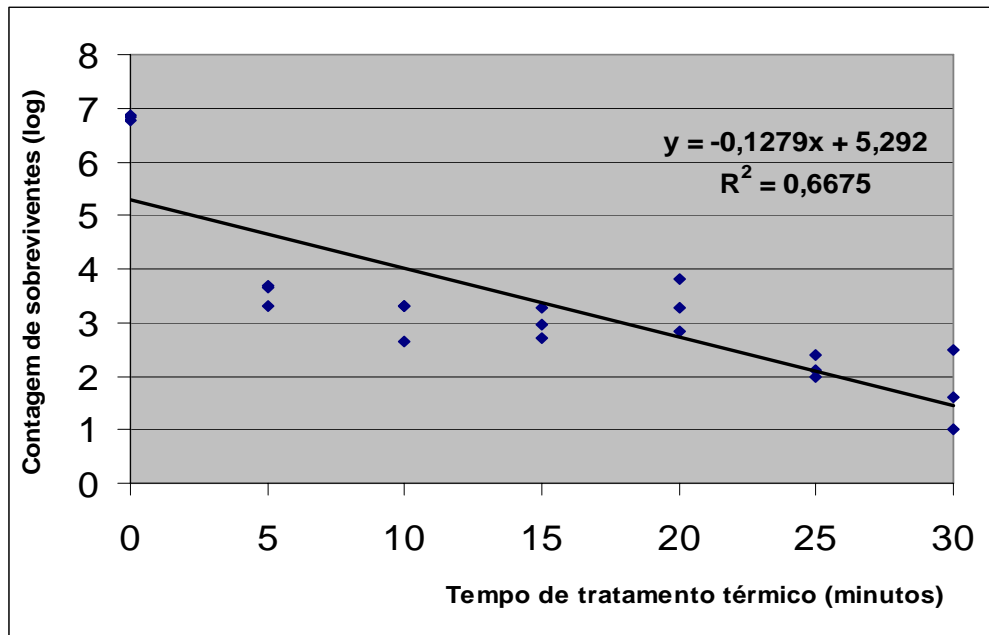


Gráfico 8 – Curva de sobreviventes do *Mycobacterium fortuitum* em leite bovino desnatado nos diferentes tempos à 65°C e sua regressão linear, obtida à partir das 3 repetições

Os valores de $D_{65^{\circ}\text{C}}$ em leite desnatado foi coincidente para as 4 retas obtidas: 7,82 minutos.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A literatura sobre a termo-resistência das micobactérias é bastante restrita, especialmente quando se considera o efeito da gordura ou o cálculo do valor D; embora alguns pesquisadores tenham descrito a curva de morte térmica de algumas espécies, o conceito do valor D aparece apenas mais recentemente, nos trabalhos que averiguaram o nível de segurança conferida pela pasteurização do leite frente ao *M. paratuberculosis*.

Pode-se observar, neste trabalho, que houve variação no valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ entre as repetições no leite integral. É pouco provável que essa diferença seja devida apenas ao teor de gordura, pois as repetições 2 e 3 tinham a mesma porcentagem de gordura (6%) e mostraram uma diferença de 3,31 minutos no valor D; uma diferença maior (5,11 minutos) foi registrada entre as repetições 1 e 2, com 5,8 e 6,0% de gordura, respectivamente. No entanto, quando o teste se deu com o leite desnatado, os valores D encontrados foram coincidentes, nas 3 repetições, que tinham igual teor de gordura de 0,2%.

Embora o leite utilizado no presente trabalho fosse oriundo do mesmo animal, talvez o fato da vaca estar no final da lactação e/ou o interregno de 1 semana, aproximadamente, entre as colheitas das amostras, possa ter contribuído para a variação observada. MacDonald e Sutherland (1993) relataram que a composição da gordura em ácidos graxos parece influenciar na resistência térmica dos microrganismos.

Outra hipótese é que a gordura tenha gerado erros analíticos intrínsecos. Lund, Gould e Rampling (2002) ponderaram, numa avaliação sobre as diferenças encontradas em vários trabalhos que estudaram a morte térmica do *M. paratuberculosis*, que a natureza hidrofóbica das células tenderia a agrupá-las nas superfícies dos líquidos e em filmes nas paredes dos tubos ou pipetas determinando erros de distribuição do agente nas diluições seriadas.

Em um dos trabalhos iniciais sobre a resistência térmica do *M. tuberculosis* var. *bovis*, Kells e Lear (1960) construíram a curva do tempo de morte térmica do agente para o cálculo do valor Z. Embora essa curva se baseie nos valores D em várias temperaturas, os autores não explicitam o valor D encontrado em quaisquer temperaturas estudadas. Porém, ao relatar que a pasteurização a 61,6°C fora eficaz para destruir 10⁴ UFC/mL e que o tratamento térmico ofereceu uma segurança de 28,5 minutos, seria lícito concluir que o valor D_{61,6°C} tenha sido de 22,5 segundos (em 1,5 minuto eliminou 4 ciclos logarítmicos do agente).

A diferença entre esse resultado e o da presente pesquisa torna-se ainda mais significativa sob a luz dos registros de Jay (1992) e Grant, Ball e Rowe (1996) que observaram que o *M. bovis* é mais resistente ao calor que o *M. fortuitum*.

Não houve, nesta pesquisa, redução da contagem do agente para níveis abaixo do detectável (<10 UFC/mL) após a pasteurização, em nenhuma das repetições realizadas, tanto com o leite integral quanto com o desnatado.

Esses resultados divergem daqueles obtidos por Harrington e Karlson (1965) que, em estudo sobre a destruição de micobactérias pela pasteurização (62,8°C/30 min. e 71,7°C /15 seg.), em leite desnatado, concluíram que *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M.*

avium e *M. fortuitum* não sobreviveram a nenhum dos tratamentos, apesar de terem utilizado suspensões que excediam em muito o número de microrganismos presumivelmente encontráveis no leite cru. Entrementes, não citam a carga inicial e também não avaliaram quanto tempo levou para que o inóculo fosse inviabilizado.

Também Grant, Ball e Rowe (1996), que pesquisaram os padrões da curva de sobreviventes de cinco espécies de micobactérias (*M. fortuitum* NCTC 10394, *M. avium* NCTC 8552, *M. bovis* T/94/163C, *M. intracellulare* NCTC10425 e *M. kansasii* NCYC 10268) em leite, verificaram que *M. bovis* e *M. fortuitum* não sobreviveram ao tratamento térmico, mesmo tendo usado temperatura mais baixa (63,5°C/30 min.) que a empregada no presente estudo, utilizando semelhante contaminação inicial (10^7 UFC/mL).

Quanto às características da curva dos sobreviventes, observou-se neste trabalho, que a função linear não foi a mais adequada para explicar o decaimento da contagem como função do tempo no leite desnatado, no entanto, foi necessário fazer o ajuste linear para se obter o valor D. Isso se revela pela grande queda no log de sobreviventes nos primeiros 5 minutos de tratamento térmico; essa taxa de morte não se mantém nos outros intervalos de tempo testados. Contudo, quando se avalia a curva no leite integral, observa-se maior tendência à linearidade. Ressalta-se, entretanto, que no leite integral houve grande redução da população na etapa de pré-aquecimento do leite (até atingir os 65°C).

Isso diverge, em parte, dos dados de Grant, Ball e Rowe (1996) que verificaram que *M. bovis* e *M. fortuitum* apresentaram padrões lineares para a curva de morte térmica, enquanto o *M. intracellulare*, *M. avium* e *M. kansasii* não. Destaca-se que,

para a quantificação do agente, os autores empregaram a técnica do Número Mais Provável, em meio sólido inclinado.

Sobre o assunto, em seu estudo com *M. paratuberculosis*, inoculado em meio lactato, Sung e Collins (1998) compararam as curvas dos sobreviventes (62°C/30 minutos) obtidas através de dois métodos de quantificação e calcularam os respectivos valores $D_{62^\circ\text{C}}$. A curva obtida pela cultura radiométrica (BACTEC) teve R^2 igual a 0,95 e a obtida com a contagem em placas, R^2 igual a 0,61. Esse resultado é, em parte, divergente dos encontrado na presente pesquisa. O R^2 no leite desnatado foi de 0,67 para todas as curvas, à semelhança do obtido no lactato pelos autores, mas no leite integral, o R^2 foi superior, variando de 0,71 a 0,92 nas 3 repetições. Isso indica que o tempo de pasteurização explicou apenas 67% da variação observada no log de UFC/mL no leite desnatado e que, no leite integral, variou de 71 a 92%, sugerindo que outros fatores concorrem para a dinâmica de morte térmica durante o aquecimento, além da gordura.

Sung e Collins (1998) encontraram, ainda, valor $D_{65^\circ\text{C}}$, do *M. paratuberculosis* em leite, igual a 38,9 segundos, utilizando como método de quantificação de células, a cultura radiométrica. Em contraste, o presente trabalho encontrou para o *M. fortuitum* o valor de 18,02 minutos (calculado a partir da melhor curva das 3 repetições), utilizando a contagem em placa como método de quantificação dos sobreviventes. Essa diferença no valor D causa surpresa, uma vez que vários autores indicam que o *M. fortuitum* é menos resistente ao calor (GRANT; BALL; ROWE, 1996; JAY, 1992) e que o *M. paratuberculosis* é o mais resistente dos patógenos do leite (SUNG; COLLINS, 1998). No entanto, isso poderia ser explicado pelo método de quantificação dos sobreviventes empregado, em cada pesquisa. Comparando os

valores $D_{62^{\circ}\text{C}}$ do *M. paratuberculosis* em lactato, Sung e Collins (1998) verificaram que a contagem em placas resulta em um valor D igual a 11,2 minutos, enquanto com o método radiométrico o equivalente valor D foi de 5,41 minutos.

Analisando os resultados dos valores $D_{65^{\circ}\text{C}}$ obtidos a partir da melhor curva, em leites integral (18,02 minutos) e desnatado (7,82 minutos) percebe-se a proteção que a gordura exerce sobre o *M. fortuitum*, determinando uma diferença de 10,2 minutos.

Depreende-se daí que a pasteurização lenta seria capaz de reduzir 1,67 log de UFC/mL de *M. fortuitum* em leite integral e 3,85 log UFC/mL em leite desnatado. Isso mostra que o tratamento térmico imprime diferentes níveis de segurança ao leite, mas nenhum confere a redução de 4 ciclos, conforme Ball (1943) sugere ser a máxima contaminação natural no leite.

Não há relatos na literatura sobre a influência da gordura do substrato sobre a resistência térmica das micobactérias, contudo, a proteção conferida pela gordura foi estudada para outros microrganismos.

Considerando *L. monocytogenes*, Donnelly e Briggs (1986) encontraram apenas uma pequena diferença no tempo de morte térmica quando a gordura foi estudada como único fator afetando a resistência térmica do agente. O valor $D_{62,7^{\circ}\text{C}}$ foi de 1,0 minuto para leite integral (3,5% gordura) e 0,9 minuto para leite desnatado (0,5%).

McDonald e Sutherland (1993) estudaram os efeitos do tratamento térmico variando os teores de gordura dos leites de vaca, cabra e ovelha, e observaram que quanto maior o teor de gordura do leite, maior o tempo necessário para inativar toda a população de *Listeria*.

Por fim, vale ressaltar que, uma vez que o agente hora pesquisado mostrou-se muito mais resistente ao calor do que revela a literatura e que é uma espécie oportunista e considerada mais sensível ao calor que outras do gênero (GRANT; BALL; ROWE, 1996; JAY, 1992), inclusive patogênicas, são necessários novos estudos, com espécies patogênicas, para se inferir com propriedade sobre o impacto para a saúde pública.

Quando desta análise, há que se considerar, além da resistência térmica do microrganismo, o nível de contaminação do leite cru, a higidez da população consumidora e o grau de segurança desejado do produto.

Sugere-se, todavia, que em futuros testes, a pasteurização seja realizada em banho-maria com agitação das amostras e usando frascos hermeticamente fechados e imersos na água, empregando-se um termopar para o controle da temperatura de pasteurização.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Através do presente trabalho obteve-se o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* em leite bovino integral de 18,02 minutos, e 7,82 minutos para o leite desnatado, evidenciando que a gordura exerce um efeito protetor significativo sobre essa micobactéria.

Nesse cenário, a pasteurização lenta é capaz de reduzir 3,85 log de *M. fortuitum* em leite desnatado, mas apenas 1,67 log em leite integral e, portanto, resulta em diferentes níveis de segurança ao consumidor.

A gordura do leite interfere negativamente na eficiência da pasteurização lenta sobre destruição de *M. fortuitum*, e interfere também sobre o padrão da curva de morte térmica. A importância dessa informação para a saúde pública é dependente, em primeiro lugar, da comprovação que esse fenômeno é comum, e determinar sua intensidade, às espécies patogênicas de micobactérias.

São necessários estudos com espécies patogênicas para estimar o nível de segurança que a pasteurização confere ao leite.

CONSIDERAÇÃO FINAL

8 CONSIDERAÇÃO FINAL

À luz das informações de Sung e Collins (2000), após estudo da curva de sobreviventes de *M. paratuberculosis* em processo não térmico, que obtiveram o valor $D_{4^{\circ}C}$ de 59,9 dias em queijo maturado, sugere-se, ainda, estudar o valor D de micobactérias patogênicas em queijos nacionais maturados e fabricados com leite cru. Tal preocupação vem do fato de que a pasteurização do leite destinado à produção de queijos não é obrigatória quando a maturação for superior a 60 e 90 dias, respectivamente, pela legislação federal e estadual (BRASIL, 1996; SÃO PAULO, 1994).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. **Archives of Veterinary Science**, v. 4, n. 1, p. 5-15, 1999.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. A importância do leite de cabra na nutrição humana. **O Noroeste**, Sobral, p. 05, 2002.
- ANTUNES, J. L. F.; MORAES, M. de; BIAZEVIC, M. G. H.; WALDMAN, E. A.; CORRÊA, M. O. A.: 'Tuberculose e leite: elementos para a história de uma polêmica'. **História, Ciências, Saúde — Mangueiras**, v. 9, n. 3, p. 609-23, 2002.
- BALIAN, S. C.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; MORAIS, Z. M.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S. Estudo comparativo de dois métodos de descontaminação na pesquisa de micobactérias. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 11-14, 2002.
- BALL, C. O. Short-time pasteurization of milk. **Industrial Engineering Chemistry**, v. 35, p. 71-84. 1943.
- BEHMER, M. L. A. **Laticínios**. São Paulo. Melhoramentos, 1968. p.104-141.
- BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. Nobel, 1991. p. 22, 72, 109.
- BLANCO, R. M.; INUMARU, V. T. G.; MARTINS, M. C.; GIAMPAGLIA, C. M. S.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E.; YOSHIDA, J. T. U.; TELLES, M. A. S. Estratégias para a identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 2, p. 91-96, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal**. Brasília – DF. 1952.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA. **Métodos Analíticos para o controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes** – Métodos Físico-Químicos. Brasília – DF, 1981.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria 146 de 7 de março de 1996**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 11 jul 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de leites tipo A, B,

C, Pasteurizado, Cru Refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa DAS n. 6, de 08 de janeiro de 2004. Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 07, seção 1, p. 06-10, 12 janeiro 2004.

BUSATTA, C.; VALDRUGA, E.; CANSIAN, R. L. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* in integral and skimmed UHT milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 3, p. 408-411, 2005.

CARVALHO, M. G. X. **Características físico-químicas, biológicas e microbiológicas do leite de cabra processado em micro-usinas da região da Grande São Paulo-SP**. 1998. 102 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

CARVALHO, L. A.; NOVAES, L. P.; MARTINS, C. E.; ZOCCAL, R.; MOREIRA, P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LIMA, V. M. B. Importância do Leite, **Embrapa**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.html>>. Acesso em: 23 mar 2003.

CENTRO PANAMERICANO DE ZONOSIS. **Manual de normas y procedimientos técnicos para la bacteriología de la tuberculosis**. Buenos Aires. OPA/OMS, 1985, 25p. (Nota técnica, 27).

CHHABRA, A. T.; CARTER, W. H.; LINTON, R. T.; COUSIN, M. A. A predictive Model to Determine the Effects of pH, Milkfat, and Temperature on Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of food Protection**, v. 62, n. 10, p. 1143-1149, 1999.

CLAEYS, W. L.; LOEY, A. M. V.; HENDRICKX, M. E. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. **Trends in Food Science & Technology**. v. 13, p. 293-311, 2002.

COVISI, O.; GRANGE, J. M.; DABORN, C. J.; RAVIGLIONE, M. C.; FUJIKURA, T.; COUSINS, D.; ROBINSON, R. A.; HUCHZERMAYER, H. F. A. K.; KANTOR, I.; MESLIN, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. **Emerging Infectious Diseases**. v. 4, n. 1, p. 59-70, 1998.

DONNELLY, C. W.; BRIGGS, E. H. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. **Journal of food Protection**. v. 49, n. 12, p. 994-998, 1986.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA GADO DE LEITE. **Agência de Informação – Agronegócio do Leite**. 2005a. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/Abertura.html>>. Acesso em: 26 abr. 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA GADO DE LEITE. **Classificação mundial dos principais países produtores de leite**. 2005b. Disponível em:

<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/Abertura.html>>. Acesso em: 26 abr 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA GADO DE LEITE. **Produção mundial de leite de diferentes espécies de animais, 1995-2005**. 2005c. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/Abertura.html>>. Acesso em: 26 abr. 2006.

ENRIGHT, J. B.; SADLER, W. W.; ROBERT, R. C. Thermal inactivation of *Coxiella burnetti* and its relation to pasteurization of milk. **Public Health Monograph**. n. 47, v. 54, p. 1-30, 1957.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Resolução SAA 24 de 01 de agosto de 1994**. Normas Técnicas sobre as Condições Higiênico-Sanitárias Mínimas Necessárias para a Aprovação, Funcionamento e Re-aparelhamento dos Estabelecimentos de Produtos de Origem Animal. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/index.php#>>. Acesso em: 12 jul 2006.

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 177-215, 1996.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. In: **Controle do desenvolvimento microbiano nos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 111.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. Nobel, São Paulo, 1984. p. 284.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; NEILL, S. D.; ROWE, M. T. Inactivation of Mycobacterium paratuberculosis in cows' milk at Pasteurization Temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 631-636, 1996.

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.

GRANT, I. R.; WILLIAMS, A. G.; ROWE, M. T.; MUIR, D. D. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 2853-2861, 2005.

HARRINGTON, R.; KARLSON, A. G. A destruction of various kinds of mycobacteria in milk by pasteurization. **Applied Microbiology**, n. 13, p. 494-495, 1965.

HUEBNER, R. J.; JELLISON, W. L.; BECK, M. D.; WILCOX, F. P. Q fever studies in southern California: III. Effects of pasteurization on survival of *C. burnetti* in naturally infected milk. **Public Health Reports**, v. 64, p. 499-511, 1949.

JAY, J. M. High temperature food preservation and characteristics of thermophilic microorganisms. **Modern food microbiology**, 4th ed. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 335-355.

KANTOR, I. N. Bacteriologia de la tuberculosis. **Centro panamericano de zoonosis**, n. 11, p. 63, 1979.

KELLS, H. R.; LEAR, S. A. Thermal death time curve of *Mycobacterium tuberculosis* var. Bovis in artificially infected milk. **Applied Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 234-236, 1960.

KLEEBERG, H. K. Tuberculosis humana de origen bovino y salud publica. **Rev.Sci.Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 3, p. 55-76, 1984.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; JUNIOR, W. C.W. Diagnóstico microbiológico. In: **Micobactérias**, Medsi, 2001. p. 903-946.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P. Risk profile: ***Mycobacterium bovis* in Milk**. Institute of Environmental Science & Research Limited. Christchurch Science Centre, New Zealand, October 2002. Disponível em: <<http://www.esc.cri.nz>>. Acesso em: 23 jan. 2006.

LEITE, C. Q. F.; ANNO, I. S.; LEITE, S. R. A.; ROXO, E.; MORLOCK, G. P.; COOKSEY, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 319-323, 2003.

LERCHE, M. Inspeccion Veterinária de la leche. In: **Obtención higiênica da la leche**, Zaragoza: Ed. Acribia, 1969.

LOURENÇO, R. W.; LANDIM, P. M. B. **Análise de Regressão Múltipla Espacial**. UNESP/Rio Claro, IGCE, DGA, Laboratório Geomatématica, Texto Didático 13, 34p. 2004. Disponível em <http://www.rc.unesp.br/igce/aplicada/textodi.html>. Acesso em: 06 maio 2006.

LUND, B. M.; GOULD, G. W.; RAMPLING, A. M. Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 135-145, 2002.

MCDONALD, F.; SUTHERLAND, A. D. Effect of heat treatment on *Listeria monocytogenes* and Gram negative bacteria in sheep, cow and goat milk. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 75, p. 336-343, 1993.

MCFADDEN, J. J.; COLLINS, J.; BAEMAN, B.; ARTHUR, M.; GITNICK, G. Mycobacteria in Crohn's disease: DNA probes identify the Wood Pigeon strain of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* from human tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 3070-3073, 1992.

MOLIN, N.; SNYGG, B. G. Effect of lipid materials on heat resistance of bacterial spores. **Journal of Applied Microbiology**, v. 15, p. 1422-1426, 1967.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P.; 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.
- NORTH, C. E.; PARK, W. H. Standards for milk pasteurization. **American Journal of Hygiene**. v. 7, p. 147-173, 1927.
- OLIVAL, A. A.; SPEXOTO, A. A.; CAMPOS, D. F. S.; FERREIRA, F.; FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V.; DIAS, R. A. Hábitos de consumo do Leite Informal, associados ao risco de transmissão de doenças, no município de Pirassununga, SP. **Higiene Alimentar**, n. 102-103, p. 35-40, 2002.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Brucelosis y tuberculosis (M. bovis) – Situación de los programas en las Americas**. 2000. Disponível em: <http://www.panaftosa.org.br/Encuesta_BRU_TUB.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2006.
- PARDO, R. B.; LANGONI, H.; MENDONÇA, L. J. P. Isolamento de *Mycobacterium* spp. Do leite de vacas suspeitas e positivas para tuberculose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 284-287, 2001.
- PAVLAS, M. Thermoresistance of mycobacteria. **Acta Veterinaria Brno**, v. 59, p. 65-71, 1990.
- PINHEIRO, A. J. R.; MOSQUIM, M. C. A. V. **processamento de leite de consumo**. Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos. 1991. – Apostila.
- PIVETTA, M. Ferro na tuberculose. **Ciência e Tecnologia no Brasil - Pesquisa FAPESP**, n. 97, p. 32-37, 2004.
- POLETTI, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.
- PORTO, E. **Microbiologia do Leite**. 1998. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/TecnologiaLeite.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2006.
- ROXO, E. *M. bovis* como causa de zoonose, **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 18, n. 1, p.101-108, 1997.
- SOUZA, A. V.; SOUZA, C. F. A.; SOUZA, R. M.; RIBEIRO, R. M. P.; OLIVEIRA, A. L. A. A importância da tuberculose bovina como zoonose. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 59, p. 22-27, 1999.
- STABEL, J. R. Effective methods for postharvest intervention in dairy processing. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 10-15, 2003.
- STABEL, J. R. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p. 524-527, 2001.
- SUNG, N.; COLLINS, M. T. Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1334-1339, 2000.

SUNG, N.; COLLINS, M. T. Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 999-1005, 1998.

TEIXEIRA NETO, R. O. Avaliação dos processos térmicos utilizando o método genérico. In: **Curso de esterilização de alimentos**. Campinas, 2000. cap.IV.

VALSECHI, O. A. O leite e seus derivados. In: **Tecnologia de produtos de origem animal**. Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos. 2001. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/docentes/vico>>. Acesso em: 20 jan. 2006.

VAN DEN HEEVER, L. W. Tuberculosis in milk goats. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 55, n. 4, p. 219-220, 1984.

VAN DENDER, A. G. F. **Publicação eletrônica** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <ejnishimoto@yahoo.com.br> em 31 mar. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on disinfection in animal husbandry for prevention and control of zoonotic diseases**. Geneva: WHO, 1984. p. 49.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE A - Projeto piloto de padronização do inóculo

Objetivos

Padronizar o método de preparo do inóculo a ser utilizado na contaminação do leite e a proporção inóculo/leite, de forma a obter uma concentração do *Mycobacterium fortuitum* próxima a 10^7 UFC/ mL de leite e assim permitir a quantificação do agente durante e após o tratamento térmico, garantindo a obtenção da curva de sobreviventes.

Material e Métodos

Preparo do inóculo: O trabalho foi realizado em fluxo laminar, previamente descontaminado utilizando-se álcool 70% seguido de luz ultravioleta por aproximadamente 30 minutos. Foi utilizada cultura de *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573), proveniente do Centro Panamericano de Zoonoses, cultivadas em meios Löwenstein-Jensen ou Petragani, com cerca de 5 a 7 dias de cultivo a 37° Celsius.

Os tubos contendo a cultura foram numerados e pesados em balança de precisão; o peso de cada tubo foi anotado. Com uma haste de plástico retirou-se a maior quantidade possível de colônias dos tubos, colocando-as em cadinho estéril. Os tubos foram novamente pesados e comparados ao seu peso inicial. Essa diferença corresponde à massa do *M. fortuitum* utilizado no inóculo, que foi diluída em solução

salina 0,85% com 0,05% de tween 80 e macerada vigorosamente. Em seguida, foi adicionada a solução salina 0,85%, até completar o volume do inóculo, e homogeneizada.

As variáveis pesquisadas nesse estudo foram: a massa do agente, o volume da solução salina com tween e o volume da solução salina sem tween.

Contaminação do leite: Nessa etapa, utilizou-se leite UHT integral, comprado em estabelecimentos comerciais. A embalagem do leite foi desinfetada com algodão embebido em álcool 70% e aberta com tesoura estéril, em condições assépticas e 5 mL foram transferidos para um tubo estéril. A variável pesquisada foi o volume do inóculo adicionado ao leite. O leite contaminado foi homogeneizado em vórtex por 10 segundos e, então, realizada a diluição decimal seriada em tubos com solução salina 0,85%.

Contagem das UFC/mL: 0,1 mL do inóculo e do leite contaminado foram semeados, em duplicata, em placas de petri com meio de cultura Löwenstein-Jensen e incubados à 37°C por 5 dias. O inóculo foi semeado para se garantir a viabilidade do agente enquanto o leite foi semeado até diluição 10^{-7} .

Resultados

Piloto 1:

Massa do agente: 0,522 g

Volume de solução salina com tween: 2 mL

Volume de solução salina sem tween: 48 mL

Concentração do inóculo: 0,522 g/50 mL

Volume do inóculo utilizado para contaminar o leite: 0,1 mL

Resultado: perdido, pois as placas ressecaram durante a incubação.

Piloto 2:

Massa do agente: 0,601g

Volume de solução salina com tween: 2 mL

Volume de solução salina sem tween: 48 mL

Concentração do inóculo: 0,601 g/50 mL

Volume do inóculo utilizado para contaminar o leite: 0,1 mL

OBS: utilizou-se parafilm para vedar as placas, evitando ressecamento.

Resultados:

Inóculo e diluições 10^0 e 10^{-1} : incontável

Diluição 10^{-2} : 73 UFC/mL

Diluição 10^{-3} : 1 UFC/mL

OBS: como a concentração foi abaixo da desejada, aumentou-se a massa e o volume do inóculo para contaminar o leite, no piloto 3.

Piloto 3:

Massa do agente: 1,011g

Volume de solução salina com tween: 2 mL

Volume de solução salina sem tween: 48 mL

Concentração do inóculo: 1,011 g/50 mL

Volume do inóculo utilizado para contaminar o leite: 0,2 mL

Resultados:

Inóculo e diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} : incontável

Diluição 10^{-4} : 158 UFC/mL

Diluição 10^{-5} : 21 UFC/mL

Diluição 10^{-6} : 3 UFC/mL

OBS: como a concentração aproximou-se da desejada, foi realizado um último piloto, para avaliar a repetibilidade dos resultados, porém reduzindo-se proporcionalmente as quantidades empregadas, devido a dificuldade de se obter 1 grama do agente.

Piloto 4:

Massa do agente: 0,616 g

Volume de solução salina com tween: 1 mL

Volume de solução salina sem tween: 24 mL

Concentração do inóculo: 0,616 g/25 mL

Volume do inóculo utilizado para contaminar o leite: 0,2 mL

Resultados:

Inóculo e diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} : incontável

Diluição 10^{-5} : 80 UFC/mL

Diluição 10^{-6} : 2 UFC/mL

Conclusão

Nos pilotos 3 e 4 foram definidas as variáveis que determinam a concentração desejada do agente no leite.

APÊNDICE B – Piloto de pré-aquecimento

Objetivos

Verificar se há alteração na contagem de microrganismos com a utilização do pré-aquecimento das sub-amostras em banho-maria a 85°C até que fosse atingida a temperatura desejada de 65°C.

Material e Métodos

Para este piloto, foram utilizados dois equipamentos controladores de temperatura constante Unitemp® da Fanem, sendo um deles regulado para a temperatura de 85°C e o outro à 65°C.

Uma amostra de leite desnatado foi contaminado com inóculo contendo 0,687g de micobactérias, homogeneizado e prosseguiu-se como descrito no item **4.4 Contaminação do leite**. Foram feitas duas séries de tubos, sendo uma delas submetida ao pré-aquecimento em banho-maria a 85°C até atingir 64°C, e a outra série de tubos permaneceu no banho-maria a 65°C até estabilizar a sua temperatura nos mesmos 65°C.

Resultados e Discussão

Contagem de unidades formadoras de colônias:

Diluição	Tubo 1 (Tratamento à 85°C) Contagem de UFC	Tubo 2 (Tratamento à 65°C) Contagem de UFC
10⁰	Incontável	Incontável
10⁻¹	206 197	Incontável
10⁻²	20 19	Incontável
10⁻³	1 2	Incontável
10⁻⁴	0 0	Incontável

Tempo gasto para atingir a temperatura desejada de 65°C utilizando-se os dois tipos de pré-aquecimento:

Tipo de pré-aquecimento Tempo gasto para atingir 65°C

Banho-maria a 85°C 32 segundos

Banho-maria a 65°C 6 minutos

Podemos verificar que o banho-maria a 85°C elevou rapidamente a temperatura da amostra até atingir 65°C e reduziu a contagem inicial de micobactérias, enquanto que a manutenção da amostra no banho-maria a 65°C levou 10 vezes mais tempo para alcançar a temperatura alvo e não alterou a quantidade do microrganismo.

Conclusão

Mesmo com a redução na quantidade de micobactérias ocasionada pelo pré-aquecimento em banho-maria a 85°C, optou-se pela utilização deste procedimento por mimetizar o processo natural de pasteurização lenta feita em tanques de expansão, além de agilizar o aquecimento das amostras. Porém, para a construção

da curva de morte térmica para o cálculo do valor D, somente serão consideradas as contagens de sobreviventes nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após atingida a temperatura de 65°C.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)