DANIELE CRISTINE RAIMUNDO

**Estudo comparativo entre a eficiência da filagem da *Mozzarella* e da
pasteurização lenta do leite na inativação do *Mycobacterium*
fortuitum e da *Listeria monocytogenes* experimentalmente
inoculados no leite de búfala**

São Paulo

2008

DANIELE CRISTINE RAIMUNDO

**Estudo comparativo entre a eficiência da filagem da *Mozzarella* e da
pasteurização lenta do leite na inativação do *Mycobacterium*
fortuitum e da *Listeria monocytogenes* experimentalmente
inoculados no leite de búfala**

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

Orientador:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

São Paulo

2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2040
FMVZ

Raimundo, Daniele Cristine

Estudo comparativo entre a eficiência da filagem da *Mozzarella* e da pasteurização lenta do leite na inativação do *Mycobacterium fortuitum* e da *Listeria monocytogenes* experimentalmente inoculados no leite de búfala / Daniele Cristine Raimundo. – São Paulo : D. C. Raimundo, 2008.
58 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. Pasteurização. 2. Filagem. 3. *Mycobacterium fortuitum*. 4. *Listeria monocytogenes*. 5. Inativação térmica. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo comparativo entre a eficiência da pasteurização lenta do leite e da filagem da mozzarella contra o *Mycobacterium fortuitum* e a *Listeria monocytogenes* experimentalmente inoculados no leite de búfala", protocolado sob o nº1272/2007, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 20 de fevereiro de 2008.

We certify that the Research "Comparative study between holder pasteurization of milk and mozzarella stretch efficiency against *Mycobacterium fortuitum* and *Listeria monocytogenes* experimentally inoculated into the buffalo's milk", protocol number 1272/2007, under the responsibility Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 02/20/08.

São Paulo, 21 de fevereiro de 2008

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética - FMVZ/USP
SP, ____/____/____

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RAIMUNDO, Daniele Cristine

Título: Estudo comparativo entre a eficiência da filagem da *Mozzarella* e da pasteurização lenta do leite na inativação do *Mycobacterium fortuitum* e da *Listeria monocytogenes* experimentalmente inoculados no leite de búfala

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

DEDICATÓRIA

Dedico todo este trabalho aos meus inigualáveis e queridos pais, Neide e Sergio, que sempre me ensinaram a acreditar nos meus sonhos, lutar e nunca abandonar meus objetivos.

Ao meu adorado irmão, Marcio Raymond, que a cada momento de angustia exaltava minhas qualidades e convencia a confiar em meu potencial.

Ao meu amado Leandro, pelo apoio em todas as decisões profissionais, por seus valiosos conselhos e tempo dedicados a mim.

E a minha valiosa orientadora, Evelise, sempre disposta a ouvir, esclarecer e confiar nas minhas palavras. Querida prof^a, nunca deixei claro, mas por acreditar em mim e em minhas idéias você foi responsável pela realização de meu grande sonho, além de me fazer perceber que pequenas coisas podem trazer grandes momentos de alegria.

AGRADECIMENTOS

À notável profissional **Sandra Sanchez**, á sua inestimável ajuda no meu projeto, conselhos, paciência e resguardo que teve e tem comigo.

À professora **Andrea Micke Moreno**, que me acolheu em seu laboratório e teve imensa paciência em tirar minhas dúvidas, dar conselhos imprescindíveis no desenvolvimento de meu projeto, e ficar ouvindo meus lamentos.

À professora **Simone Balian**, que com seu bom humor repassou uma grande responsabilidade a mim no Programa PAE e assim teve grande participação na minha percepção do quanto eu aprendi nestes anos de estudo.

Aos grandes amigos que eu ganhei na sanidade suína, em especial: **Rê, Débinha, Tais, Cleisoca, Sergio e Marina**. Agradeço por ajudarem, darem opiniões, compartilharem os lamentos e risadas, e me introduzirem neste mundo suíno...

Ao **Orlando Bispo**, por toda ajuda principalmente no processo de aprendizagem e fabricação da *Mozzarella*.

Às técnicas do lab. de zoonoses, **Zenaide e Gisele**. Sem elas eu não teria conseguido a realização deste projeto, sempre dispostas a ajudar, fazendo os inóculos, meios de cultura e me “tirando do sufoco”.

Á minha amiga de trabalho **Renata “Molinha”**, por aqueles momentos desesperadores e também pelas gargalhadas durante a realização do projeto.

À professora **Sonia R. Pinheiro**, por ceder as cepas de *Mycobacterium* e nos dar varias sugestões durante a realização do experimento.

Ao laticínio **DI BÚFALA** por ceder todo o leite, o fermento e o coalho usado na fabricação da *Mozzarella*.

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

RESUMO

RAIMUNDO, D.C. **Estudo comparativo entre a eficiência da filagem da *Mozzarella* e da pasteurização lenta do leite na inativação do *Mycobacterium fortuitum* e da *Listeria monocytogenes* experimentalmente inoculados no leite de búfala.** [Comparative study between the efficiency of the *Mozzarella* stretching and the holder pasteurization of milk in the inhibition of *Mycobacterium fortuitum* and *Listeria monocytogenes* experimentally inoculated into buffalo milk]. 2008. 58f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Leite integral de búfala foi experimentalmente contaminado com *Mycobacterium fortuitum* e *Listeria monocytogenes*. Foi feita a análise quantitativa dos agentes imediatamente antes e depois de dois tratamentos térmicos: pasteurização (do leite) e filagem (da *Mozzarella*). Na análise da *Listeria*, foi empregada metodologia adaptada para a obtenção do NMP, usando os meios UVM, Fraser e Palcam como pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e isolamento, respectivamente. O *Mycobacterium* foi semeado em placas com meio Löwenstein-Jensen modificado. Os resultados mostraram que a pasteurização do leite reduziu em média 6,0 log NMP/mL de *Listeria* sp e 4,0 log UFC/mL de *Mycobacterium* sp. A filagem da coalhada reduziu em média 8,37 log NMP/g de *Listeria* sp e 6,3 log UFC/g de *Mycobacterium* sp. Concluiu-se que a filagem da *Mozzarella* foi mais eficiente que a pasteurização do leite na redução do inóculo de *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium fortuitum* em cerca de 2 logaritmos de cada agente.

Palavras-chave: Pasteurização. Filagem. *Mycobacterium fortuitum*. *Listeria monocytogenes*. Inativação térmica.

ABSTRACT

RAIMUNDO, D. C. **Comparative study between the efficiency of the *Mozzarella* stretching and the holder pasteurization of milk in the inhibition of the *Mycobacterium fortuitum* and the *Listeria monocytogenes* experimentally inoculated into buffalo milk.** [Estudo comparativo entre a eficiência da filagem da *Mozzarella* e da pasteurização lenta do leite na inativação do *Mycobacterium fortuitum* e da *Listeria monocytogenes* experimentalmente inoculados no leite de búfala]. 2008. 58f. Dissertação. (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Whole buffalo milk was experimentally contaminated with *Mycobacterium fortuitum* and *Listeria monocytogenes*. The quantitative analysis of the agents was made immediately before and after two thermal treatments: pasteurization (of milk) and stretching (of *Mozzarella*). In the analysis of the *Listeria*, methodology adapted for the attainment of the MPN was used, employing UVM, Fraser and Palcam as not selective enrichment, selective enrichment and isolation, respectively. The *Mycobacterium* was plated onto modified Löwenstein-Jensen. The results had shown that the pasteurization of milk reduced 6,0 log MPN/mL *Listeria* sp on average, and 4,0 log CFU/mL de *Mycobacterium* sp. The stretching of the curd reduced 8,37 log MPN/g de *Listeria* sp on average, and 6,3 log CFU/g de *Mycobacterium* sp. It has been concluded that the stretching of *Mozzarella* was more efficient than the pasteurization of milk in the reduction of *Listeria monocytogenes* inoculum and *Mycobacterium fortuitum* in about 2 logarithms of each agent.

Key words: Pasteurization. Stretching. *Mycobacterium fortuitum*. *Listeria monocytogenes*. Thermal inhibition.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVO.....	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Micobactérias.....	21
3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>.....	23
3.3 Resistência Térmica.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Obtenção dos Inóculos e Contaminação do Leite.....	28
4.1.1 Obtenção do Inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i>	28
4.1.2 Obtenção do Inóculo do <i>Mycobacterium fortuitum</i>	29
4.2 Pasteurização.....	29
4.2.1 Contaminação do Leite.....	29
4.2.2 Pasteurização Propriamente Dita.....	30
4.2.3 Controle do Processo de Pasteurização.....	30
4.2.4 Análise Microbiológica do Leite.....	31
4.2.4.1 Quantificação da <i>Listeria monocytogenes</i>	31

4.2.4.2 Quantificação do <i>Mycobacterium fortuitum</i>	34
4.3 Filagem	35
4.3.1 Contaminação do Leite e Fabricação da <i>Mozzarella</i>	35
4.3.2 Análise da Coalhada e Massa Filada.....	36
4.3.3 Medidas de Segurança Durante a Fabricação da <i>Mozzarella</i> Contaminada.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICES	54

1 INTRODUÇÃO

A pasteurização do leite é obrigatória para a fabricação de queijos frescos ou com maturação inferior a 60 dias e destina-se a reduzir a microbiota deteriorante e eliminar a patogênica que eventualmente possa estar presente no leite (BRASIL, 1952).

A filagem é uma etapa da fabricação de alguns queijos, como a *mozzarella*, e consiste em adicionar água quente à massa coalhada e madura (que foi obtida pela ação do coalho, ácido e/ou fermento láctico sobre o leite) e submetê-la à tração de modo a provocar a formação dos “fios” (WALSTRA et al., 1999).

Na Itália, berço da *mozzarella* de búfala, foi permitida a fabricação desse queijo com leite cru, desde que a contagem bacteriana fosse inferior a 500.000UFC/cm³ (CITRO¹, 1992). Isso encontrou justificativa em trabalhos que comprovaram a dificuldade, a despeito de tentativas tecnológicas, de repor uma cultura fermentadora que garantisse as características organolépticas particulares e inerentes ao produto, bem como devido às alterações que a pasteurização do leite acarreta às características reológicas do queijo (PARENTE et al., 1989; COPPOLA et al., 1990; THANKER et al., 1991; CITRO¹, 1992).

Em pesquisa para averiguar a eficiência da filagem da *mozzarella* de búfala, Ramos e Silva et al. (1999) constataram que a filagem determina a inativação da enzima fosfatase alcalina; enzima que é testada para comprovar que a pasteurização do leite atingiu temperatura mínima estabelecida pela legislação nacional, conferindo segurança ao produto.

O gênero *Listeria* compreende oito espécies, mas a *L. monocytogenes* é a que causa maior preocupação no que concerne às enfermidades transmitidas por alimentos. A espécie foi isolada de vários ambientes, incluindo vegetação em decomposição, terra, ração animal, esgoto e água; já foi encontrada em vários

¹Informação fornecida em sala de aula por CITRO, A. curso de fabricação de mozzarella. em Curitiba: ABUPAR em maio de 1993.

alimentos, crus e processados, e pode se multiplicar em temperaturas de refrigeração (FORSYTHE, 2000).

O *Mycobacterium* é considerado, juntamente com a *Coxiella burnetti*, a bactéria não esporulada mais termoresistente que comumente contamina o leite; os parâmetros atualmente empregados de tempo e temperatura de pasteurização do leite têm como referência a sensibilidade térmica desses agentes (BEHMER, 1991).

Para estudos preliminares com o gênero *Mycobacterium*, a espécie *M. fortuitum* é a recomendada pela Organização Mundial da Saúde, por ser menos patogênica e apresentar rápido crescimento nos meios de cultura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984). Além disso, a literatura cita que 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).

Pelos motivos expostos propõe-se o estudo comparativo do efeito da pasteurização do leite de búfala e da filagem da *mozzarella* de búfala sobre o *Mycobacterium fortuitum* e a *Listeria monocytogenes*.

2 OBJETIVO

Avaliar a eficiência da pasteurização do leite de búfala em comparação à da filagem da *mozzarella* de búfala na redução da carga microbiana de *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium fortuitum* experimentalmente inoculados no leite integral de búfala.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A produção de leite de búfala gira em torno de 10,5% de todo o leite produzido no mundo. Desse montante, 92,12% são produzidos na Índia, China e Paquistão, que possuem aproximadamente 78% da população mundial de búfalos; na Índia, 55% do leite produzido é de búfala (SILVA et al., 2003).

O rendimento do leite bubalino é cerca de 40-50% maior na elaboração de derivados que o leite bovino. Por conter um teor de gordura maior, são necessários apenas 14 litros de leite de búfala para produzir 1 kg de manteiga, ao passo que para obter a mesma quantidade de manteiga com leite de vaca bovina, são necessários mais de 20 litros. Por outro lado, com apenas 5,0 litros de leite de búfala pode-se obter 1 kg de queijo *mozzarella* de alta qualidade (SILVA et al., 2003).

A sua coloração totalmente branca, devido à ausência total de pigmentos carotenóides, o que também confere coloração branca à manteiga e ao queijo produzidos, e o sabor levemente adocicado são as características marcantes do leite de búfala (RAO; DASTUR, 1984).

A *mozzarella* é um queijo fresco de massa filada e não maturado, originário do sul da Itália (no século XVI) na região de Campana, próxima a Nápoles. A fabricação naquele país é feita com a adição do soro-fermento ao leite de búfala integral. Posteriormente são realizadas as etapas de adição do coalho, e após a formação da coalhada procede-se ao corte da massa, drenagem do soro, filagem da massa com pH entre 5,2 e 5,4, com água a 85 °C e por fim molde e salga (opcional) da massa em solução a 2% de NaCl (CONSORZIO DI TUTELA, 2008).

A obtenção higiênica do leite é um primeiro ponto crítico no processo de fabricação de queijos e outros derivados lácteos, uma vez que animal, equipamentos e ambiente de ordenha podem representar importantes fontes de contaminação (LANGE et al., 2003). A pasteurização elimina os patógenos do leite, mas pode ocorrer recontaminação durante o processamento (FOX, 1993). Dessa forma, as

boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são cruciais para a garantia de um produto de qualidade.

A acidificação da massa é uma etapa muito importante e deve ser cuidadosamente controlada, pois a conversão da dicálcio-paracaseína em monocálcio-paracaseína, realizada pelo ácido láctico (produzido na fermentação) durante a exposição à alta temperatura da água, é que dará a elasticidade adequada ao queijo. A mozzarella feita com leite de búfala que tenha, por exemplo, 3% de gordura, apresentará cerca de 18% de gordura, 53,6% de umidade, 22,1% de proteína total e 0,3% de lactose em sua composição (KOSIKOWSKI, 1979; VERRUMA et al., 2000), ao passo que a mozzarella produzida com leite de búfala integral apresenta umidade entre 55-60%; 23 a 27% de gordura e 19 a 20 % de proteína total (DEL PRATO, 1998).

3.1 Micobactérias

Pertencentes a família Mycobacteriaceae, as micobactérias são bacilos curtos que medem em seu comprimento aproximadamente 0,5µm a 0,7µm e 0,3µm na sua largura. São aeróbias, não flageladas, sem cápsula e quando coradas apresentam aspecto granular. A quantidade e os tipos de lipídeos complexos que compõe sua parede celular são propriedades que as diferem das demais bactérias (KANTOR, 1979). A resistência à descoloração com álcool acidificado quando coradas com carbolfuccina (álcool ácido-resistência) é a característica fundamental para a classificação do microrganismo em micobactéria (KONEMAN et al., 2001).

Além dos prejuízos registrados há muitos anos tanto para a saúde animal quanto para a humana pelas micobactérias de crescimento lento, como *M. bovis*, *M. tuberculosis* e o complexo *M. avium*, observa-se um aumento da ocorrência de doenças associadas às micobacterias de crescimento rápido, como o *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* (BALIAN et al., 2002; BLANCO et al., 2002).

Estas micobactérias são patógenos oportunistas, encontram-se disseminadas no ambiente, como na água (rios, lagos e água tratada) e no solo (BLANCO et al., 2002). Conseguem crescer em um amplo intervalo de temperatura, salinidade, pH e tensão de oxigênio (FALKINHAM, 1996).

Ball, em 1943, relata que a máxima contaminação natural do leite por *M. bovis* pode chegar a 10^4 UFC/mL; uma vez infectado, o animal é capaz de eliminar o agente pelo leite mesmo antes do desenvolvimento de lesões teciduais (ROXO, 1997).

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). 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).

A tuberculose está disseminada por todo o território nacional embora a prevalência e distribuição regional não estejam ainda bem caracterizadas (BRASIL, 2008) nos bovinos. Lau (1990) enfatiza que pouco se sabe sobre a sanidade dos rebanhos bubalinos no país e a maioria dos rebanhos é tratada sem controle sanitário específico para a espécie. Por ser associado à rusticidade, surgiu entre vários criadores a idéia de que os bubalinos são resistentes a várias doenças que atingem os bovinos, entretanto, os búfalos são susceptíveis à maioria dos agentes infecciosos que acometem os bovinos (VALE, 1994).

Mota et al. (2002) isolaram o *M. bovis* de pool de fragmentos de linfonodos de búfalos provenientes das 7 propriedades estudadas (Parintins - AM), o que, segundo os autores, enfatiza tratar-se de uma doença relevante nos bubalinos.

Freitas et al. (2001) realizaram um estudo anatomopatológico e microbiológico sobre tuberculose em búfalos abatidos para consumo em Belém - PA. O isolamento do agente ocorreu em 7,7% dos animais; o *M. bovis* foi a espécie predominante, correspondendo a 67,3%, 16,3% eram *M. fortuitum*, 8,2% eram do complexo *M. avium* e 4,1% de *M. gordonae*.

3.2 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é constituído por organismos de morfologia cocóide a cocobacilar, gram-positivos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos (FARBER; PETERKIN, 1991). Este gênero compreende oito espécies, no entanto apenas a *L. monocytogenes* tem interesse em saúde pública como agente transmitido por alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A atividade de água (A_w) mínima para sua multiplicação é 0,90, com ótimo entre 0,94 e 0,99. O potencial hidrogênio (pH) tolerado encontra-se na faixa de 4,3 e 9,6 (FABER et al., 1989; FABER; HARWING, 1996). Ela é psictrófica e pode se multiplicar em temperaturas entre - 4°C e 50°C (FARBER; PETERKIN, 1991) com ótimo entre 30 e 37°C (SEELINGER; JONES, 1986). Isso é importante à medida que os queijos frescos, como a mozzarella, atendem essas características, permitindo a multiplicação do agente.

São conhecidos 13 sorotipos de *L. monocytogenes* com base na presença de antígenos O e H (FARBER; PETERKIN, 1991). Segundo Person e Marth (1990) o sorotipo comumente isolado de leite cru é o 4b.

A *L. monocytogenes* é um agente ubiqüitário e tem como reservatório o meio ambiente, encontra-se amplamente disseminada em plantas, solo, amostras de água superficiais, assim como, silagem, esgoto, resíduos de abatedouro, leite de vacas saudáveis e com mastite, e fezes de humanos e animais (FABER; PETERKIN, 1991; GRAY; KILLINGER, 1966; CHASSEIGNAUX et al., 2001). Um úbere infectado pode eliminar entre 10^3 a 10^6 *L. monocytogenes* por mililitro de leite (BEMRAH et al., 1998).

A dose necessária para causar a doença ainda não está bem definida, estima-se que varia de 10^3 a 10^9 organismos por grama ou mililitro (FARBER; PERKIN, 1991). Além do fator virulência da cepa, a dose infectante pode ainda variar em função da susceptibilidade do hospedeiro (FARBER; PERKIN, 1991).

A contaminação de produtos lácteos por *L. monocytogenes* tem sido amplamente estudada, dentre estes produtos, os queijos frescos são os mais pesquisados devido à grande associação destes com casos de listeriose humana (MARSHALL; SCHMIDT, 1988; GERMANO; GERMANO, 2003). Quando no queijo, seu crescimento pode ser retardado pela cultura láctica starter, mas não cessado (PERSON; MARTH, 1990). Este patógeno tem sido relatado em muitas variedades de queijos importados e exportados nos Estados Unidos (KOZAK et al., 1996).

Kabuki (2004) descreve que estudos sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos tipo frescal têm revelado grande variação, de 0,0 a 41,2%, podendo ser explicada pelas diferentes metodologias utilizadas na detecção da bactéria, diferença entre as amostras devido a diferenças no processamento e pelo uso de leite cru ou pasteurizado.

3.3 Resistência Térmica

Pasteurização é *“emprego conveniente do calor, com 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).

Filagem é uma etapa da fabricação de alguns queijos e consiste em fundir massa da coalhada, previamente esmiuçada, em água quente e sob tração (WALSTRA et al., 1999), causando seu alongamento e formação dos “fios” até a obtenção de uma massa homogênea e brilhante.

Os critérios de tempo e temperatura da pasteurização lenta empregados em diversos países foram definidos com base nos estudos de North e Park, em 1927, de

Huebner et al. em 1949, e Enright, Sadler e Robert em 1957. Esses estudos de inativação térmica do *Mycobacterium* e *Coxiella burnetti* realizados no século passado deram origem aos critérios de tempo x temperatura de pasteurização do leite em vários países. Esses são os microrganismos patogênicos não formadores de esporos mais resistentes que comumente contaminam o leite (BEHMER, 1991).

No ano de 1927 North e Park mostraram que o tratamento a 61,1°C/30 minutos era eficaz contra o *M. tuberculosis*, mas em 1949 Huebner et al. mostraram que a *Coxiella burnetti* sobrevivia a 61,7°C/30 minutos. Enright, Sadler e Robert recomendaram, em 1957, a elevação da temperatura da pasteurização lenta nos EUA, de 61,7°C para 62,8°C, pois essa temperatura foi eficaz para eliminar uma concentração de cerca de 10^6 células da *Coxiella* sp por mililitro.

Devido à escassez de dados, Kells e Lear estudaram, em 1960, a curva de tempo de morte térmica do *M. tuberculosis* var. *bovis* em leite bovino. Os resultados mostraram que binômio 61,6°C/30min. oferecia uma margem de segurança de aproximadamente de 25,5 minutos, partindo de uma população de 10^4 UFC/mL de leite.

Em 1965, Harrington e Karlson testaram a sobrevivência de *M. bovis*, *M. avium* e *M. fortuitum* frente à pasteurização lenta e rápida em leite desnatado, pelo método do tubo-teste, concluindo que houve a desvitalização completa das 3 espécies.

Entre as décadas de 60 e 90, pouco foi reportado sobre a resistência térmica das micobactérias. Aspectos importantes que podem afetar a cinética de inativação térmica do *M. bovis* foram pouco testados desde então, embora a literatura mostre a importância das características do substrato sobre a resistência térmica de outros microrganismos, como a *Listeria monocytogenes* (DONNELLY; BRIGGS, 1986; MACDONALD; SUTHERLAND, 1993; CHHABRA, et al. 1999).

Nos anos 90 do século passado, vários estudos sobre a resistência do *M. paratuberculosis* à pasteurização foram realizados, tendo em vista a suspeita de que o consumo do leite contaminado com o agente estivesse relacionado com a ocorrência da doença de Crohn no homem (GRANT; BALL; ROWE, 1996; SUNG; COLLINS, 1998, 2000; LUND; GOULD; RAMPLING, 2002; STABEL, 2003).

Em análise dos resultados desses estudos sobre a resistência térmica do *M. paratuberculosis*, Lund, Gould e Rampling (2002) ressaltaram que as diferenças reportadas (que variaram de <2 reduções decimais à >10, considerando 63°C/30min), poderiam estar relacionadas, entre outros fatores, ao método de pasteurização empregado em cada trabalho (tubo teste, tubo selado submerso, tubo capilar), ao tempo requerido para atingir a temperatura desejada, bem como às diferenças nos métodos de quantificação do agente.

O *M. fortuitum*, segundo a literatura, apresenta um o padrão de formação de grumos que 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). Isso mostra que os dados de comportamento térmico obtidos com essa espécie oportunista são comparáveis aos da espécie patogênica. Além disso, o a Organização Mundial da Saúde recomenda que se use o *M. fortuitum* em testes iniciais com micobactérias, por ser menos patogênico e apresentar rápido crescimento nos meios de cultura (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1984).

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 (tempo em minutos para reduzir um ciclo logarítmico do agente, a uma dada temperatura) maior do que quando a gordura do leite de vaca, ou de cabra, foi adicionada aos leites desnatados.

A variabilidade na resistência térmica reportada nos estudos do *M. paratuberculosis*, anteriormente citada, também foi reportada sobre a resistência térmica da *Listeria monocytogenes*. Pearson e Marth (1990) fizeram uma revisão sobre a ameaça representada pela *Listeria monocytogenes* à segurança dos alimentos e ressaltam que as divergências a respeito da sobrevivência desse agente à pasteurização, encontradas em algumas publicações, deve-se, pelo menos parcialmente, aos métodos usados para determinar sua resistência térmica e o estado fisiológico da bactéria durante o aquecimento. Esses autores relatam a técnica do plaqueamento direto, após o tratamento térmico, tende a não recuperar o agente, enquanto que o uso de técnicas de enriquecimento, antes do plaqueamento, aumenta o índice de recuperação porque usam um volume maior de amostra e permitem a recuperação de células termicamente injuriadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Leite cru integral de búfala foi cedido pelo Laticínio Di Búfala (6 litros) e dividido em duas alíquotas. Um litro foi fervido e empregado no teste de pasteurização e os 5 litros restantes foram mantidos crus e empregados na fabricação da mozzarella. Uma amostra do leite cru foi submetido à pesquisa qualitativa dos agentes em estudo e à determinação do teor de gordura (BRASIL, 2006).

4.1 Obtenção dos Inóculos e Contaminação do Leite

Foi empregado um inóculo previamente padronizado de *Listeria monocytogenes* e um inóculo de *Mycobacterium fortuitum* a fim de obter aproximadamente 10^7 UFC/mL de cada agente.

4.1.1 Obtenção do Inóculo de *Listeria monocytogenes*

Foi empregada uma cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115, 4b), mantida em ágar estoque semi-sólido, cedida pelo Laboratório de Sanidade Suína (FMVZ/USP). O agente foi semeado em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubado à 37°C/24 horas. Uma alçada desta cultura foi semeada em Ágar Palcam, que foi incubado à 37°C/24 horas. Após, inoculou-se 2 colônias do agente em caldo BHI, que foi incubado à 37°C/24 horas.

4.1.2 Obtenção do Inóculo do *Mycobacterium fortuitum*

Foi empregada uma cultura de *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573) com até sete dias de cultivo em tubos com meio Lowenstein-Jensen, proveniente do Centro Panamericano de Zoonoses, cedida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas (FMVZ/USP).

O preparo do inóculo foi realizado conforme padronizado por Nishimoto (2006) e Starikoff (2006). Cerca de 0,600g da cultura de *Mycobacterium fortuitum* foi macerado em cadinho estéril com 1mL solução salina 0,85% com 0,05% de tween 80. Em seguida, adicionados 24mL de solução salina 0,85%, completando 25 mL de volume do inóculo, que foi transferido para Erlenmeyer esterilizado com pérolas de vidro para evitar formação de grumos.

4.2 Pasteurização

4.2.1 Contaminação do Leite

Um volume de 100mL de leite integral de búfala, previamente fervido, foi contaminado com 4 mL do inóculo de *M. fortuitum* e 0,2 mL do inóculo de *L. monocytogenes*, previamente homogeneizados.

4.2.2 Pasteurização Propriamente Dita

O leite contaminado foi homogeneizado e distribuído em 11 de tubos estéreis 16x160 mm, 5 mL em cada tubo. Um tubo foi empregado para análise do controle da contaminação e os outros 10 foram submetidos ao tratamento térmico em banho-maria à 65°C.

Como o processo térmico foi a variável pesquisada, a pasteurização foi repetida 5 vezes, num mesmo dia. Em cada processo foram empregados 2 tubos, um para análise do leite ao atingir 65°C (tempo 0 – T^0) e o outro ao final dos 30 min à 65°C (tempo 30 – T^{30}).

Os tubos foram colocados em banho-maria à 65° C, com leve inclinação, para que todo o seu conteúdo estivesse submerso, inclusive as paredes vazias do tubo, ficando para fora da água somente as tampas seladas por “parafilm”. Ao serem retirados do banho-maria os tubos foram colocados em gelo para cessar o efeito térmico sobre as células e mantidos em geladeira até o momento da análise.

4.2.3 Controle do Processo de Pasteurização

Para verificar a propriedade com que o tratamento térmico foi realizado, em cada repetição do processo foram empregados 4 tubos contendo 5 mL de leite cru e não inoculado. A um deles foi acoplado um termômetro, certificando-se que o bulbo não estivesse em contato com as paredes do tubo, para controlar a temperatura de aquecimento do leite. As outras 3 amostras de leite foram submetidas à pesquisa das enzimas fosfatase alcalina (Laborclin-Biodiagnóstica) e peroxidase (BRASIL, 2003) após o tratamento térmico.

4.2.4 Análise Microbiológica do Leite

As amostras de leite (controle da contaminação, T⁰ e T³⁰) foram homogeneizadas e submetidas à diluição decimal seriada em água peptonada a 0,1%. A diluição da amostra controle foi realizada até 10⁻¹⁰; a amostra T⁰ até 10⁻⁵ e a amostra T³⁰ até 10⁻³.

4.2.4.1 Quantificação da *Listeria monocytogenes*

Foi empregada a metodologia oficial (BRASIL, 2003), que é qualitativa, adaptada para a quantificação do agente pelo método do NMP (Número Mais Provável), apresentada na figura 1.

Etapa de pré-enriquecimento: após homogeneização das diluições em vórtex por 10 segundos, 1 mL de cada diluição foi semeada, em triplicata, em caldo UVM (9 mL) e os tubos incubados a 37°C/24h.

Etapa de enriquecimento seletivo: Cada um dos tubos de UVM foi semeado (0,1mL) em outro tubo contendo caldo Frazer (10mL), que foram incubados a 30°C/24h.

Etapa de isolamento: cada tubo Fraser foi semeado em ágar Palcam pela técnica de esgotamento. As placas foram incubadas a 37°C/48h. Considerou-se positivo o tubo que apresentou, na placa, pelo menos uma colônia característica de *L.monocytogenes*. Como se trata de inoculação experimental de leite negativo para o agente, considerou-se como *Listeria* todo crescimento de colônias com característica do agente no referido ágar.

O resultado foi obtido após consulta à tabela específica, conforme Brasil (2003) e expresso em NMP/mL.

A figura 1, a seguir, ilustra o procedimento de quantificação deste agente, pela técnica de NMP.

Figura 1- Esquema da técnica de quantificação do agente pelo método de Número Mais Provável

4.2.4.2 Quantificação do *Mycobacterium fortuitum*

O meio empregado foi o Lowenstein-Jensen, preparado segundo a técnica do Centro Pan-americano de Zoonoses (CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, 1985), modificado. A modificação consistiu na adição de quatro antibióticos ao meio, antes de sua distribuição e coagulação: Anfotericina B (5µg/mL), Ácido Nalidíxico (60µg/mL), Polimixina B (50U/mL) e Trimethoprim (5µg/mL).

Razões da modificação: bactérias lácticas (para fabricação da *mozzarella* há adição de fermento láctico) crescem demasiadamente no meio em questão, comprometendo os resultados de quantificação do agente alvo. Assim, foram realizados vários testes de adição dos antibióticos ao meio de cultura Lowenstein-Jensen, até se obter uma fórmula que não afetasse a enumeração do agente alvo e inibisse a contaminação láctica. A metodologia e os resultados do piloto estão apresentados nos APÊNDICES A e B. Usou-se como referência a pesquisa de Donaghy, Totton e Rowe (2003), que obtiveram sucesso na supressão das bactérias lácticas de queijo Cheddar pela adição de antibióticos ao meio de cultura para detecção de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Análise: 0,1 mL de cada diluição foi semeado, em duplicata, na superfície do meio de cultura Lowenstein-Jensen (placas) modificado. Foi realizada a incubação a 37°C/5 dias, de acordo com Koneman et al. (2001). Após 24 horas todas as placas foram vedadas com parafilm, para impedir o ressecamento do meio.

Contagem e registro de resultados: foi considerada a média das UFC entre as placas da diluição que apresentaram entre 15 e 150 colônias. O resultado foi multiplicado pelo inverso da diluição e, no fim, multiplicado por 10 (fator de correção do volume semeado: 0,1mL) e expresso em UFC/mL

4.3 Filagem

4.3.1 Contaminação do Leite e Fabricação da Mozzarella

Cinco litros de leite cru e integral de búfala foram aquecidos à 38°C e então contaminados com 7,5 mL do inóculo de *L. monocytogenes* e 150 mL do inóculo de *M. fortuitum*. Após homogeneização, foram adicionados 5,0 mL de fermento (ST-M7/Chr. Hansen) e após 30 minutos, foi adicionado 1,5 mL de coalho (estrela/Chr. Hansen), que foram doados pelo laticínio DI BÚFALA. Passados 45 minutos, a massa foi cortada em X e depois de 15 minutos, foi cortada em quadrados de 1,5 a 2,0 cm, e a massa revirada com a faca de forma a cortar “cubos” de 1,5 a 2,0cm. Após 20 minutos, o soro foi retirado e a massa permaneceu em descanso por aproximadamente 2 horas e 30 minutos, quando os testes de filagem foram iniciados e repetidos a cada 30min. Quando a coalhada estava madura para filagem (4h30 após a dessoragem), ela foi transferida para uma bandeja de polietileno onde foi esmiuçada com a faca e homogeneizada. Neste momento foi retirada uma alíquota de 25 gramas para análise microbiológica. O restante da coalhada foi dividido em cinco partes aproximadamente iguais para a filagem (5 repetições).

A filagem consistiu em adicionar à massa da coalhada esmiuçada, água fervente (97°C) para “derreter” a massa. A coalhada foi submetida à tração em a água quente até formar uma massa lisa e brilhante, da qual foram retiradas 25 gramas para análise.

Todo material empregado na fabricação do queijo no laboratório foram previamente esterilizado. Foram usadas duas panelas de alumínio, sendo que uma serviu de banho Maria para a outra, onde o queijo foi elaborado.

O banho Maria foi mantido sobre uma fonte de calor (bico de Bunsen) para que fosse possível a manutenção da temperatura a 34-36°C, durante a produção da coalhada; havia um termômetro na água para o monitoramento da temperatura.

A filagem foi realizada em recipientes de alumínio (todos os 5 do mesmo tamanho), com o auxílio de dois garfos estéreis para realizar a tração.

4.3.2 Análise da Coalhada e Massa Filada

As amostras (25g) foram homogeneizadas em *stomacher*, com 225mL de água peptonada a 0,1% (diluição 10^{-1}). A partir desta, foram realizadas as diluições decimais e seriadas em água peptonada a 0,1%, até 10^{-10} na coalhada e até 10^{-3} nas massas filadas.

A análise de *L. monocytogenes* e do *M. fortuitum* seguiu o mesmo método descrito no item análise microbiológica do leite (3.2.4.1 e 3.2.4.2). O resultado de *L. monocytogenes* foi expresso em NMP/g e do *M. fortuitum*, em UFC/g.

4.3.3 Medidas de Segurança Durante a Fabricação da Mozzarella Contaminada

Duas pessoas foram responsáveis pela fabricação do queijo, no laboratório. Não houve saída ou entrada de outras pessoas no recinto, até finalizar o processo.

Ao ficarem prontas, a massa da coalhada e a massa filada foram pesadas em sacos de *stomacher* e imediatamente entregues, pela porta do laboratório, para a análise microbiológica.

Durante toda a fabricação, foram usados os seguintes EPIs: avental de mangas compridas com fechamento atrás, touca, luvas e máscara *air safety*, todos

descartáveis, além de calças compridas e botas de borracha. Após o uso, todo o material descartável foi acondicionado em sacos plásticos autoclaváveis e, no final das atividades, foram autoclavados e colocados no lixo em sacos brancos. As botas, meias e calças, foram lavadas com água sanitária (2,5% de hipoclorito de sódio) diluída 1:10 v/v.

Todos os utensílios empregados na fabricação, exceto alumínios, e os resíduos da fabricação, bem como o soro e as sobras de massa, sofreram uma desinfecção química com água sanitária (1:2 v/v), overnight, antes da desinfecção física em autoclave (121°C/15min.). Essa diluição foi empregada porque Pinheiro (2001) mostrou que, embora a uma solução de água sanitária (2,5% de cloro) a 1:10(v/v) seja eficiente contra *M. avium*, a presença de matéria orgânica reduz sua eficácia bactericida. Nos alumínios foi empregado Lysoform (1:10 v/v).

O ambiente foi fumigado com formol (permanganato de potássio acrescido de lisoform) e o laboratório permaneceu fechado por 24 horas. Todo o material a ser submetido à desinfecção física permaneceu fechado nesse laboratório até o momento da autoclavagem.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as repetições de pasteurização mostraram-se com resultado enzimático em concordância com os parâmetros oficiais, ou seja, fosfatase alcalina negativa e peroxidase positiva.

O leite cru resultou negativo para ambos os gêneros *Listeria* spp e *Mycobacterium* spp e o teor de gordura foi de 6,0%.

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados quantitativos da redução dos agentes, respectivamente, frente à pasteurização lenta e a filagem.

Nota-se na tabela 1, que houve uma grande redução da *Listeria* durante o aquecimento do leite, em média de 3,7 ciclos logarítmicos, e durante o tratamento propriamente dito (65°C/30min.) houve uma redução de 2,6 ciclos. Já com relação ao *Mycobacterium*, o aquecimento ocasionou uma redução de 0,9 ciclo logarítmico enquanto a pasteurização reduziu 3,1 ciclos.

Considerando o efeito do processo térmico como a somatória das taxas de mortalidade durante aquecimento e tratamento propriamente dito, a pasteurização lenta em banho-maria foi capaz de determinar uma redução de 6,0 ciclos logarítmicos, em média, da *Listeria* sp, e 4,0 ciclos do *Mycobacterium* sp.

Há pouca informação disponível sobre a resistência desses agentes à esses tratamentos térmicos, especialmente em leite de búfala.

MacDonald e Sutherland (1993) investigaram a sobrevivência de 3 cepas *Listeria monocitogenes* em leites de vaca, cabra e ovelha com variados níveis de gordura, tratados termicamente. Os resultados mostraram uma redução de 4 a 5 ciclos logarítmicos quando os leites eram tratados a 65°C/30minutos (partindo de uma contaminação inicial igual a 10^7 UFC/mL), considerando teores de gordura de 7 a 10%.

Ao contrário do que registrado nesta pesquisa, Grant, Ball e Rowe (1996) não observaram sobreviventes de *M. bovis* ou *M. fortuitum* quando submetidos à pasteurização (63°C/30 minutos), empregando uma contaminação inicial semelhante (10^7 CFU/mL).

Nishimoto (2006) obteve reduções de *M. fortuitum* em leite integral de vaca submetido à 65°C/30 minutos na ordem de 3,3 a 4,4 ciclos logarítmicos e Starikoff (2006), em trabalho semelhante realizado em leite integral de cabra, obteve reduções de 3,7 a 5,0 ciclos. Nesses trabalhos, a redução durante o aquecimento do leite, foi de 0,3 ciclos no leite de cabra e de 2,0 no leite de vaca.

Harrington e Karlson (1965) estudaram a inativação de vários tipos de *Mycobacterium* pela pasteurização, em leite desnatado. Os resultados mostraram que certas cepas foram totalmente inativadas (*M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. avium*, entre outras), mas que um pequeno número de algumas cepas de micobactérias não classificadas sobreviveram à pasteurização lenta e, menos freqüentemente, ao processo rápido de pasteurização.

Paolicchi (200_) relata que a pasteurização a 63°C/30 minutos diminui a viabilidade de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* em 5 ciclos logarítmicos em alguns estudos, mas que em outros a redução é de apenas 2 ciclos.

Considerando a máxima contaminação natural do leite por *M. bovis*, que segundo Ball (1943) é de 10^4 UFC/mL, e por *Listeria monocytogenes*, que segundo Bemrah et al. (1998) é de 10^3 a 10^6 UFC/mL, poderia se dizer que tanto a pasteurização do leite de búfala quanto a filagem da mozzarella de búfala seriam capazes de reduzir a contaminação à níveis não detectáveis dos dois agentes.

Pesquisando grupos de bactérias de interesse higiênico-sanitário à alguns tratamentos térmicos realizados por fábricas de queijos (60°C/10min. e 63°C/20min.) Ambrosili, em 1991, obteve redução de cerca de 2 ciclos logarítmicos de *Staphylococcus* em cada.

Tabela 1 - Resultado da enumeração de *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium fortuitum* em leite integral de búfala experimentalmente contaminado submetido à pasteurização lenta em banho-maria (65°C/30minutos) - São Paulo - ago 2008

Processo/repetição	<i>Listeria monocytogenes</i> (log NMP/mL)			<i>Mycobacterium fortuitum</i> (log UFC/mL)		
	Leite controle	leite T ^{0*}	leite T ^{30**}	Leite controle	leite T ⁰	leite T ³⁰
Pasteurização 1		3,0	0,0***		5,4	3,3
Pasteurização 2		3,0	0,7		6,2	3,4
Pasteurização 3	6,6	2,6	1,4	7,7	7,9	3,9
Pasteurização 4		3,0	0,7		7,9	4,1
Pasteurização 5		3,0	0,0		6,4	4,0
Média	-	2,9	0,6	-	6,8	3,7

* quando o leite chegou a 65°C

** fim da pasteurização

*** indica que a contaminação estava abaixo do limite de quantificação da técnica empregada, ou seja <0,3NMP/mL.

Quanto à filagem, a tabela 2 revela que houve inativação completa do inóculo de *Listeria* em 4 das 5 repetições realizadas e em 3 repetições, de *Mycobacterium*, que somado aos valores médios de redução da carga microbiana (8,37 ciclos logarítmicos para *Listeria* sp e 6,3 ciclos para *Mycobacterium* sp) revela que a filagem é mais eficiente que a pasteurização na redução desses agentes.

Aos dois tratamentos térmicos o *Mycobacterium* sp mostrou-se mais resistente que a *Listeria* sp, conforme esperado.

O comportamento de uma mistura de 4 cepas de *Listeria monocytogenes* foi estudado durante a produção tradicional de mozzarella de búfala por Villani et al. (1996). Os autores registraram uma redução de cerca de 2 ciclos logarítmicos após a filagem em água quente (95°C). Esse grau de redução está muito abaixo do que foi encontrado na presente pesquisa. Aqueles autores ressaltam que a filagem apresenta um perfil de tempo/temperatura irregular, não eliminando completamente o agente.

Estudando o efeito da filagem da mozzarella na redução de *Salmonella javiana* inoculada no leite (10⁴, 10⁵ e 10⁶ UFC/mL), Eckner et al. (1990) concluíram que o processo foi capaz de eliminar toda a população presente e que a pasteurização foi capaz de reduzir o agente em níveis superiores a 9 ciclos logarítmicos.

Ramos e Silva (1997) mostrou que a filagem da mozzarella de búfala foi capaz de reduzir a carga de *Staphylococcus* na ordem de 99,88%, que significa aproximadamente 3 ciclos logarítmicos.

Ramos e Silva et al. (1999) pesquisaram o efeito microbiocida da filagem na fabricação de mozzarella de búfala a partir de leite cru, em condições naturais de produção, e concluíram que o potencial microbiocida da filagem, somado aos resultados da análise das enzimas fosfatase alcalina e peroxidase na massa filada, sugerem que a eficiência desse tratamento é comparável à pasteurização do leite.

Após a filagem, reduções de cerca de 5, 2 e 4 ciclos logarítmicos, respectivamente de *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, foram reportadas por Caserio et al. (1977). Segundo os autores, a filagem em água quente não deve ser um substituto para a pasteurização devido à existência de várias variáveis que tornam os resultados da filagem desiguais.

Esse fato foi registrado na presente pesquisa, quando se observa que, mesmo fixada variáveis importantes como característica do leite, ponto da maturidade da coalhada, carga microbiana inicial e temperatura da água, ainda em dois processos houve inativação sensivelmente menor (4,72 e 2,3 log de UFC/g de *Mycobacterium*) quando comparada com as outras 3 repetições. Uma possível explicação para o fato, é que a relação volume de água adicionada e volume de massa tratada não tenha sido igual nas repetições e/ou o tempo de contato da água com a massa.

Tabela 2 - Resultado da enumeração de *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium fortuitum* na coalhada e na massa filada de mozzarella elaborada com leite cru integral de búfala - São Paulo - ago 2008

Processo/repetição	<i>Listeria monocytogenes</i> (log NMP/g)		<i>Mycobacterium fortuitum</i> (log UFC/g)	
	coalhada	massa filada	coalhada	massa filada
Filagem 1		0,0*		0,0*
Filagem 2		0,0		4,72
Filagem 3	8,4	0,15	7,7	2,3
Filagem 4		0,0		0,0
Filagem 5		0,0		0,0
Média	-	0,03	-	1,4

* indica que a contaminação estava abaixo do limite de quantificação da técnica empregada, ou seja <3,0NMP/g e <5,0x10¹UFC/g.

Os resultados mostram que, segundo as condições desse experimento, seria segura a fabricação de mozzarella a partir de leite cru, se o rebanho fosse proveniente de área indene para as principais zoonoses e se fossem atendidas as regras das Boas Práticas de Fabricação, com especial atenção à não ocorrência de contaminação cruzada entre as etapas *antes* e *depois* da filagem.

6 CONCLUSÃO

Nas condições dessa pesquisa, a filagem da mozzarella foi mais eficiente que a pasteurização do leite na redução do inóculo de *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium fortuitum* em cerca de 2 logaritmos de cada agente.

REFERÊNCIAS

AMBROSILI, R. Effetto della pastorizzazione in caldaia su batteri di interesse igienico-sanitario in alcuni caseifici artigianali. **Annali di microbiologia ed enzimologia**, v. 41, n. 2, p. 237-242, 1991. Congrès Società Italiana di Microbiologia. N°23, Palermo, Italie, 1990.

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.

BLANCO, R. M.; INUMARU, V. T. G.; MARTINS, M. C.; GIAMPAGLIA, C. M. D.; UEKI, S. Y. M.; CHIMARA, E.; YOSHIDA, J. T. U.; TELLES, M. A. S. Estratégias para identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, n. 2, p. 91-96, 2002.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. [S.l.]: Nobel, 1991. p. 22, 72, 109.

BEMRAH, N.; SANAA, M.; CASSIN, M. H.; GRIFFITHS, M. W.; CERF, O. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1, p. 129-145, 1998.

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 Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa** n.62, de 26 ago. 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa** n.68, de 12 dez. 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químico para o controle de leite e produtos lácteos. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>> Acesso em: mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal** – PNCEBT. Brasília: MAPA/SDA/DAS, 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,982143&_dad=portal&_schema=PORTAL> Acesso em: ago 2008

CASERIO, G.; SENESI, E.; FORLANI, M.; EMALDI, G. Condizioni igieniche delle Mozzarelle in rapporto alla tecnologia di produzione. **L'Industria del latte**, v. 2, p. 19- 39, 1977.

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

CHHABRA, A. T.; CARTER, W. H.; LINTON, R. H.; 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.

CHASSEIGNAUX, E.; TOQUIN, M. T.; RAGIMBEAU, C.; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 888-899, 2001.

CONSORZIO DI TUTELA. **Mozzarella di búfala Campana DOP**. 2008. Disponível em: <<http://www.mozzarelladop.it/>>. Acesso em: 25 set. 08.

COPPOLA, S.; VILLANI, F.; COPPOLA, R.; PARENTE, E. Comparison of different starter systems for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. **Lait**, v. 70, p. 411-423, 1990.

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.

DEL PRATO, O.S. **Trattato di tecnologia casearia**. Bologna: [s.n.], 1998. 1070 p.

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.

ECKNER, K. F.; ROBERTS, R. F.; STRANTZ, A. A.; ZOTTOLA, E. A. Characterization and behavior of *Salmonella javiana* during Manufacture of mozzarella type cheese. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 6, p. 461-464, 1990.

DONAGHY, J. A.; TOTTON, N. L.; ROWE, M. T. Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 285-291, 2003.

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.

FARBER, J. M.; HARWIG, J. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in read to eat foods. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 253-258, 1996.

FARBER J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Review**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; DUNFIELD, S.; PRESCOTT, R. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 181-183, 1989.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 424 p.

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

FOX, P. F. **Cheese**: chemistry, physics and microbiology. London: Chapman & Hall, 1993. 463 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182 p.

FREITAS, J. A.; GUERRA, J. L.; PANETTA, J. C. Características da tuberculose observada em búfalos abatidos para consumo: aspectos patológicos e identificação de micobactérias. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S141395962001000400005>>. Acesso em: set. 2008.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Thermal inactivation of several *Mycobacterium* spp. in milk by pasteurization. **Letters in applied Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 253-256, 1996.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003, 655 p.

GRAY, M. L.; KILLINGER, A. H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological reviews**, v. 30, n. 2, p. 309-382, 1966.

HARRINGTON, R.; KARLSON, A. G. A destruction of various kinds of mycobacteria in milk by pasteurization. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 33, 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, n.16, p. 499-511, 1949.

KABUKI, D. Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo fresco tipo latino, nos Estados Unidos da América, empregado a subtipagem molecular.** 2004.165f.Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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.

KNIGHT, D. P. ; PAINE, J. E.; SPELLER, D. C. A selective medium for *Pasteurella multocida* and its use with animal and human specimens. **Journal of clinical pathology**, v. 36, n. 5, p. 591–594, 1983.

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

KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 215-221. 1996.

KOSIKOWSKI, F. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3. ed. [S.I.]: Westport Brothers, 1979. 2 v.

LANGE, C. C.; BRITO J. R. F. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das altas contagens microbianas. In:

BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. (Ed). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa, 2003, p. 117-138.

LAU, H. D. Common buffalo diseases in Amazonian Brazil. **Buffalo Bulletin**, v. 9, p. 75-77, 1990.

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, n. 1, p. 135-145, 2002

MACDONALD, F.; SUTHERLAND, A. D.; Effect of heat treatment on *Listeria monocytogenes* and Gram –negative bacteria in sheep, cow and goat milks. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 4, n. 75, p. 336-343, 1993.

MARSHALL, D. L.; SCHMIDT, R. H. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk preincubated with selected pseudomonads. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 4, p. 277-282, 1988.

MOTA, P. M. P. C.; LOBATO, F. C. F.; ASSIS, R. A.; LAGE, A. P.; PARREIRAS, P. M.; LEITE, R. C. Ocorrência de tuberculose em rebanhos bubalinos (*Bubalus bubalis* var. *bubalis*-Linneus, 1758) no Município de Parintins, Amazonas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010209352002000400017&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: out. 2008.

NISHIMOTO, E. J. **Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor D65°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.

NORTH, C. E.; PARK, W. H. Standards for milk pasteurization. **American Journal of Hygiene**. v. 7, n. 2, p. 147-173, 1927.

PARENTE, E.; VILLANI, F.; COPPOLA, R.; COPPOLA, S. A multiple strain startes for water-buffalo Mozzarella chesse manufactore. **Lait**, v. 69, p. 271-279, 1989.

PERSON, L. J.; MARTH, E. *Listeria monocytogenes*- Threat to a safe food supply: a review. **Journal of dairy science**, v. 73, p. 912-928, 1990.

PINHEIRO, S. R. **Avaliação da atividade de desinfetantes químicos sobre estirpes de *Mycobacterium avium*, isoladas de suínos abatidos no estado de Santa Catarina, no ano de 1999**. 2001.Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RAMOS E SILVA, E. O. T. **Fabricação artesanal de mozzarella elaborada com leite cru de búfala. Estudo da contaminação microbiológica associada à manipulação em produção manual ou parcialmente mecanizada**. 1997. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

RAMOS E SILVA, E. O. T.; PANETTA, J. C.; ISHIZUKA, M. M. Efeito microbiocida da fase de filagem durante a fabricação de “mozzarella” elaborada com leite cru de búfala. **Revista Higiene Alimentar**, v. 13, n. 59, p. 28-34, 1999.

ROXO, E. *M. bovis* como causa de zoonose. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 18, n. 1, p. 101-118, 1997.

SEELINGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M. E. Bergey's manual of sistematic bacteriology. 9. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v.2, p.1235-1245

SILVA, M. S. T.; LOURENÇO JR., J. B.; MIRANDA, H. A.; ERCHESSEN, R.; FONSECA, R. F. S. R.; MELO J. A.; COSTA, J. M. **Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores** – PRONAF. Belém, PA: CPATU, 2003. Disponível em:<<http://www.cpatu.Silva et al, 2003.br/búfalo>>. Acesso em: ago. 2004.

SOUSA, 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. On-farm batch pasteurization destroys *Mycobacterium paratuberculosis* in waste milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 2, p. 524-527, 2001.

STARIKOFF, K. R. **Efeito da gordura do leite de cabra sobre o valor D65°C do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573)**. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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.

THANKER, P. N.; GANGOPDHYAY, S. K.; MIYANI, R. V. Influence of manufacturing parameters on rheology of mozzarella cheese made from buffalo milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 46, n. 2, p. 53-56, 1991.

VALE, W. G. Reproductive management of water buffalo under amazon condition. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 85-90, 1994.

VERRUMA, M. R.; DAMASIO, M. H.; VALLE, J. L. E.; OLIVEIRA, A. J. Elaboração do queijo mozzarella de leite de búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p.138-144. 2000. Disponível em:<<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010120612000000200002&script=sciarttex>>. Acesso em: ago. 2008

VILANI, F.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; MOSCHETTI, G.; SANNINO, L.; COPPOLA, S. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the traditional manufacturing of water buffalo Mozzarella cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 357-360, 1996.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Heat treatment. In: _____. **Dairy technology**: principles on milk properties and processes. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 679-686.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A - Projeto piloto de padronização do meio Lowenstein-Jensen modificado

Objetivo

Testar a eficiência de três formulações de Lowenstein-Jensen contendo antibióticos para inibir o crescimento de da microbiota de queijo fresco de búfala, permitindo o crescimento do *Mycobacterium fortuitum*:

Material e Métodos

Um queijo fresco de leite de búfala foi homogeneizado com salina peptonada a 0,1% (25g:225mL) e realizada diluição decimal e seriada até 10^{-4} . Cada diluição, 0,1 mL, foi semeada em triplicata em placas contendo cada um dos meios testados (e incubados a 37°C/7dias), descritos a seguir. A triplicata foi constituída por: a) antibiótico aplicado na superfície do meio já preparado; b) antibiótico previamente incluído ao meio, antes da coagulação, e c) meio sem antibiótico.

Fórmula 1: antibióticos propostos por Donaghy et al. (2003) para inibir lactobacilos em pesquisa de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, exceto a azlocilina porque esse antibiótico não foi encontrado: ácido nalidíxico 60µg/mL; anfotericina B 5µg/mL; polimixina B 50U/mL; trimetoprim 5µg/mL.

Fórmula 2: antibióticos propostos por Knigth et al. (1983) para inibir contaminantes de trato respiratório em pesquisa de *Pasteurella multocida*: clindamicina 5mg/L; gentamicina 0,75 mg/L; telurito de potássio 2.5 mg/L; anfotericina B 5mg/L

Fórmula 3: antibióticos propostos por Donaghy et al. (2003) adicionado de Telurito de Potássio, que está presente no meio usado por Knigth et al. (1983) e tem bom efeito seletivo no meio Baird Parker, para pesquisa de *Staphylococcus* spp, inclusive quando se analisa queijos: ácido nalidíxico 60µg/mL; anfotericina B 5µg/mL; polimixina B 50U/mL; trimetoprim 5µg/mL e telurito de potássio 0,25x10⁻⁵ µg/mL

Para avaliar se o meio inibia o crescimento do *M. fortuitum*, cada meio foi semeado com uma alçada de uma suspensão do agente em salina (controle positivo).

Os resultados obtidos na inibição da microbiota do queijo comparando as três formulações do meio Lowenstein-Jensen estão descritos a seguir na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados que mostram a eficiência das três formulações de Lowenstein-Jensen modificado contendo antibióticos para inibir o crescimento de da microbiota de queijo frescal de búfala - São Paulo- jun. 2008.

Meio	Fórmula 1		Fórmula 2		Fórmula 3	
Diluições	Adicionado ao meio	Distribuído na superfície	Adicionado ao meio	Distribuído na superfície	Adicionado ao meio	Distribuído na superfície
10 ⁻¹	†††***	†††***	†*	†*	†††***	††**
10 ⁻²	4 colônias	†††***	†*	†*	††††****	††**
10 ⁻³	1 colônia	†††***	††**	††**	††††****	††**
10 ⁻⁴	0*****	0*****	0*****	0*****	0*****	0*****

†*- crescimento entre 8 e 10 colônias; ††***- crescimento entre 20 e 40 colônias; †††***- crescimento entre 100 e 250 colônias; ††††****- crescimento acima de 300 colônias; 0*****- não houve crescimento. OBS: O controle positivo de *M. fortuitum* cresceu na mesma proporção abundante em todas as diluições e fórmulas do meio.

Conclusão

As fórmulas 1 e 3 foram capazes de impedir o crescimento da microbiota do queijo e permitir o crescimento de *M. fortuitum*.

A adição do antibiótico ao meio, antes da coagulação, mostrou-se aparentemente mais eficiente na inibição da microbiota do queijo.

APÊNDICE B - Projeto piloto para teste de quantificação do *M. fortuitum* no meio com antibiótico

Objetivo

Testar desempenho das fórmulas 1 e 3, com antibiótico adicionado ao meio antes da coagulação, na quantificação de *M. fortuitum* comparado ao meio tradicional.

Material e Métodos

O inóculo padronizado (como o empregado no projeto) de *M. fortuitum* foi diluído com salina peptonada a 0,1% e realizada diluição decimal seriada até 10^{-7} . Cada diluição, 0,1 mL, foi semeada em duplicata dos meio preparado com antibióticos e duplicata do meio sem antibiótico (controle positivo) e as placas incubadas a 37°C/7dias.

Resultados

Os resultados (Tabela 4) mostram que não houve diferença na quantificação do agente nos 3 meios estudados.

Tabela 4 - Média das UFC/mL de *Mycobacterium fortuitum* semeado em Lowenstein-Jensen modificado (2 fórmulas) e tradicional. São Paulo, jun. 2008

Diluição	Meio	Tradicional	Fórmula 1	Fórmula 3
10^{-5}		282	307	267
10^{-6}		29	15	16
10^{-7}		3	3	4

Conclusão

Os 3 meios mostraram a mesma eficiência na quantificação do *Mycobacterium fortuitum*.

Assim, escolheu-se a fórmula 1, para ser empregada no projeto, por ser mais fácil e barata que a 3, já que não tem adição de Telurito de Potássio.