



## ARTIGO ORIGINAL

## Efeito da fervura doméstica e da refrigeração na carga bacteriana do leite pasteurizado tipo C

*Effect of in-home boiling and refrigeration on bacterial load of pasteurized milk*

Tania B. Morais<sup>1</sup>, Dirce M. Sigulem<sup>2</sup>

### Resumo

**Objetivos:** Avaliar a eficácia da fervura na redução da carga bacteriana do leite pasteurizado e da refrigeração na conservação deste alimento.

**Métodos:** Trinta embalagens de 1 litro de leite pasteurizado tipo C foram adquiridas no comércio varejista do município de São Paulo. Em laboratório, as amostras foram submetidas a processo de fervura. De cada amostra foram retiradas alíquotas, em seis ocasiões, para a realização de análises laboratoriais: antes da fervura; após a fervura; após duas, quatro, seis e vinte e quatro horas de refrigeração. As análises realizadas foram a contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbias facultativas e a determinação do número de coliformes e *Escherichia coli* (*E.coli*).

**Resultados:** Nenhuma amostra apresentou contagem de bactérias mesófilas acima dos padrões legais permitidos ou presença de *E.coli*. Dez amostras (33%) apresentaram coliformes, das quais 3 (10%), acima dos padrões permitidos. A mediana das contagens de bactérias mesófilas imediatamente após a fervura foi significativamente menor do que antes da fervura, enquanto a mediana após 24 horas de refrigeração foi maior do que a mediana imediatamente após a fervura. Entre os intervalos de duas, quatro, seis e vinte e quatro horas de refrigeração não ocorreram aumentos significantes. A presença de coliformes foi significativamente maior antes da fervura. Nas amostras positivas para coliformes não ocorreu a recuperação destes microorganismos em nenhum momento após a fervura.

**Conclusões:** A fervura do leite mostrou-se eficaz em diminuir a carga bacteriana, enquanto a refrigeração manteve as contagens em níveis baixos após a fervura.

*J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(5): 357-360: leite, contaminação.*

### Abstract

**Objectives:** To assess the efficacy of in-home boiling of pasteurized milk in reducing the bacterial load and the ability of the refrigeration in preserving the milk after boiling.

**Methods:** Thirty samples of pasteurized milk bought in São Paulo, Brazil, were submitted to in-home boiling procedure at the laboratory. Portions of samples were taken before and after boiling, and after 2, 4, 6 and 24 hours under refrigeration for microbiological analyses. Methods used were mesophilic bacteria count, and coliforms and *Escherichia coli* (*E.coli*) enumeration.

**Results:** No sample presented mesophilic bacteria count above the Brazilian standard for pasteurized milk. *E.coli* was not recovered from any sample. Ten samples (33%) had coliform bacteria; of these, 3 samples (10%) were above the standard. Mesophilic bacteria count after boiling was significantly lower than before boiling. After 24 hours under refrigeration, mesophilic bacteria count was significantly higher than after boiling. No significant differences were found between the intervals of 2, 4, 6 and 24 hours under refrigeration. Samples before boiling presented significantly higher coliform bacteria. No coliform bacteria were recovered at any time after boiling.

**Conclusions:** In-home boiling of milk reduced bacterial load, while refrigeration kept bacteria under low counts.

*J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76(5): 357-360: milk, contamination.*

### Introdução

A introdução da pasteurização do leite, no início deste século, constituiu-se em notável avanço tecnológico e de saúde pública. Relatos da época mostraram uma

impressionante redução da mortalidade infantil na Europa e nos Estados Unidos após a pasteurização<sup>1,2</sup>. No entanto, mesmo nos dias de hoje, tanto no Brasil como em países desenvolvidos, falhas de processamento têm permitido a contaminação do leite pasteurizado por microorganismos patogênicos<sup>3-6</sup>. A par do risco de contaminação, essas falhas podem permitir a sobrevivência de grande número de bactérias saprófitas capazes de se multiplicar em baixas

1. Doutora em Ciências – Laboratório de Bromatologia e Microbiologia de Alimentos.

2. Professor Adjunto Doutor – Departamento de Pediatria.

Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

temperaturas, as quais poderão deteriorar o leite, um dos alimentos mais suscetíveis devido às suas propriedades físico-químicas e nutricionais.

No Brasil, a qualidade microbiológica do leite pasteurizado tem se mostrado insatisfatória devido às deficiências na produção, processamento e comercialização deste produto, como pode ser observado na Tabela 1<sup>3,7-15</sup>. Dentre os tipos de leite comercializados, o tipo C é o que tem normas menos restritas para sua produção, apresentando, ainda, os padrões microbiológicos legais mais liberais em relação aos outros tipos de leite. Por ser o mais barato, é o tipo de leite pasteurizado mais consumido por crianças de famílias de baixa renda<sup>16</sup>.

Embora seja grande, em termos populacionais, a segurança oferecida pelo consumo de leite pasteurizado, os tratados de pediatria<sup>17,18</sup> têm achado prudente preconizar, como uma medida de higiene alimentar, a fervura doméstica do leite destinado a crianças, sendo que nossa população, tanto de nível socioeconômico alto como de nível socioeconômico baixo, tem adotado amplamente essa medida<sup>19</sup>. No entanto, não foi encontrado nenhum trabalho experimental demonstrando a eficácia desse procedimento na diminuição da carga bacteriana.

Essa lacuna motivou a realização do presente trabalho, cujos objetivos foram avaliar a eficácia da fervura na redução da carga bacteriana do leite pasteurizado e da refrigeração na conservação deste alimento.

## Material e Métodos

Foram adquiridas no comércio varejista próximo à Universidade Federal de São Paulo, no município de São Paulo, trinta embalagens de 1 litro de leite pasteurizado tipo C, de três marcas diferentes, sendo dez embalagens de cada marca. No laboratório, o conteúdo total de cada embalagem foi vertido em leiteira esterilizada tampada e submetido à fervura. A fervura foi definida como sendo o procedimento de aquecimento ao fogo até que houvesse a ebulição, caracterizada pela “subida” do leite pelas paredes do recipiente até a borda superior. Neste ponto, a leiteira era retirada imediatamente do fogo e colocada em geladeira doméstica a 7°C. A relação temperatura/tempo (medida com termômetro certificado e cronômetro) atingida pelo procedimento de fervura foi de aproximadamente 95°C/3 segundos.

De cada amostra foram retiradas alíquotas, em seis ocasiões, para a realização de análises laboratoriais: *a*) imediatamente antes da fervura (AF); *b*) imediatamente após a fervura (PF); *c*) após duas de refrigeração (R2); *d*) após quatro horas de refrigeração (R4); *e*) após seis horas de refrigeração (R6); *e*, *f*) após vinte e quatro horas de refrigeração (R24). As análises laboratoriais às quais as amostras foram submetidas foram a contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbias facultativas e a determinação do Número mais provável de coliformes totais e de *Escherichia coli* (*E.coli*)<sup>20</sup>.

**Tabela 1** - Porcentagens de amostras em desacordo com os padrões legais, segundo o tipo de leite, em diferentes regiões brasileiras

Local	Tipo de leite (N)	Amostras em desacordo (%)
São Paulo, SP, 1989 <sup>3</sup>	“A” (103)	71,0
	“B” (162)	36,0
	“C” (165)	21,0
Campina Grande, PB, 1995 <sup>7</sup>	“C” (36)	14,0
Belo Horizonte, MG, 1995 <sup>8</sup>	“C” (1795)	25,0
Salvador, BA, 1995 <sup>9</sup>	- (31)	33,0
Ribeirão Preto, SP, 1996 <sup>10</sup>	“integral” (141)	25,5
	“B” (188)	26,0
	“C” (368)	11,0
Natal, RN, 1998 <sup>11</sup>	“C” (71)	53,5
Maringá, PR, 1998 <sup>12</sup>	“C” (50)	77,0
Bauru, SP, 1998 <sup>13</sup>	“A” (21)	71,0
	“B” (30)	50,0
	“C” (29)	52,0
Belém, PA, 1999 <sup>14</sup>	“C” (18)	72,0
Uberlândia, MG, 1999 <sup>15</sup>	“B” (25)	40,0

Os resultados obtidos foram comparados aos padrões microbiológicos máximos definidos pelo Ministério da Saúde para o leite tipo C, segundo a Portaria nº 451 de 1997: mesófilas:  $3 \times 10^5$ /ml; coliformes: 10/ml; e coliformes fecais: 2/ml.

Na realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software Sigma Stat for Windows*. Considerando os resultados das contagens de bactérias mesófilas, foram analisadas as diferenças entre as marcas e as diferenças entre AF; PF; R2; R4; R6 e R24. Para determinar as diferenças entre marcas, aplicou-se a análise de variância por postos de Kruskal-Wallis, complementada pelo teste de comparações múltiplas quando a diferença foi significativa, utilizando-se os resultados obtidos antes da fervura (AF) com as 10 amostras de cada marca. Para avaliar as diferenças das contagens segundo os tempos de refrigeração, utilizou-se o teste de Friedman, complementado pelo teste de comparações múltiplas, quando significativa, agrupando-se os resultados das 30 amostras, sem divisão por marca. A eficácia da fervura foi determinada através do teste de MacNemar para significância das mudanças, utilizando-se a presença/ausência de coliformes nas 30 amostras analisadas, antes e após o procedimento de fervura. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## Resultados

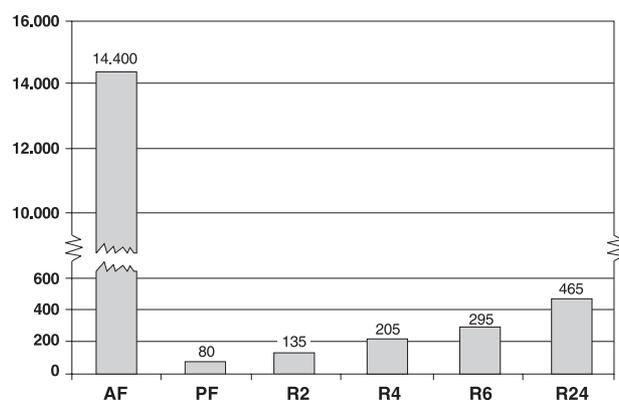
A Tabela 2 apresenta as distribuições das freqüências das contagens de bactérias mesófilas das três marcas analisadas. A marca C apresentou a mediana das contagens significativamente maior que as medianas das marcas A e B. As marcas A e B não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si.

**Tabela 2** - Distribuição das freqüências das contagens de bactérias mesófilas aeróbias facultativas em três marcas de leite pasteurizado tipo C

Nº de bactérias/ml	Marca A n=10	Marca B n=10	Marca C n=10
0   10 <sup>3</sup>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
10 <sup>3</sup>   10 <sup>4</sup>	5 (50%)	7 (70%)	1 (10%)
10 <sup>4</sup>   10 <sup>5</sup>	5 (50%)	3 (30%)	9 (90%)
Mediana	13.700	8.250	24.400
P25-P75	5.300–21.800	4.800–10.500	20.700–43.000

Nenhuma amostra das três marcas analisadas apresentou contagem de bactérias mesófilas acima dos padrões legais permitidos. Dez amostras (33%) apresentaram coliformes, sendo que duas amostras da marca A e uma amostra da marca C (10%) apresentaram coliformes acima dos padrões permitidos. A marca B não teve nenhuma amostra com coliformes acima dos padrões, no entanto, foi a marca que apresentou o maior número de amostras positivas para coliformes (5 amostras). *E. coli* não foi detectada em nenhuma amostra.

O Gráfico 1 ilustra a acentuada queda no número de bactérias mesófilas após a fervura e o lento aumento das contagens de bactérias durante o período de refrigeração.



**Gráfico 1** - Medianas das contagens de bactérias mesófilas aeróbias facultativas, em AF, PF, R2, R4, R6 e R24

O teste de comparações múltiplas mostrou que a mediana da contagem de bactérias mesófilas imediatamente após a fervura (PF) foi significativamente menor que a mediana antes da fervura (AF). A mediana após 24 horas de refrigeração (R24) foi significativamente maior que a mediana imediatamente após a fervura (PF). Entre os intervalos R2, R4, R6 e R24 não ocorreu um aumento significativo nas medianas das contagens.

Nas 10 amostras positivas para coliformes não ocorreu a recuperação destes microrganismos em nenhum momento após a fervura. O teste de MacNemar mostrou que a presença de coliformes nas amostras foi significativamente maior antes da fervura ( $p < 0,0001$ ).

## Discussão

Bactérias mesófilas, coliformes e *Escherichia coli* são microrganismos denominados indicadores, de grande utilidade na determinação da qualidade microbiológica de alimentos, uma vez que apresentam características ecológicas semelhantes às dos microrganismos patogênicos, mas cuja análise laboratorial é mais rápida, fácil, segura e barata. A presença de indicadores, em certo número, sugere que os alimentos estiveram expostos a condições que permitiriam, também, a presença de microrganismos patogênicos, revelando, portanto, o risco potencial da presença desses agentes. Os indicadores são utilizados, também, para verificar se foram eficazes os tratamentos destinados a assegurar a inocuidade de um produto alimentício.

Apesar de amplamente utilizada, a fervura doméstica do leite não havia ainda sido testada quanto à sua eficácia na diminuição ou eliminação da carga bacteriana. Os resultados obtidos demonstraram que este é um procedimento bastante eficiente - imediatamente após a fervura houve uma redução de quase duzentas vezes nas contagens de bactérias mesófilas e a aparente eliminação dos coliformes sobreviventes à pasteurização.

Em relação à refrigeração, observou-se que a mediana das contagens de mesófilas foi significativamente maior após 24 horas de refrigeração, quando comparada com os resultados obtidos imediatamente após a fervura. Este é um resultado esperado, pois a refrigeração não impede a multiplicação bacteriana, que ocorre, porém, de forma bastante lenta. O número de bactérias mesófilas encontrado (465/ml), no entanto, é insuficiente para causar qualquer alteração organoléptica, a qual ocorre, geralmente, quando as contagens alcançam mais de 1.000.000 de bactérias por ml. Em relação aos coliformes, se houve alguma célula sobrevivente à fervura, a refrigeração foi eficiente para mantê-los em números não detectáveis.

A pasteurização do leite, sem dúvida, é um processo tecnológico que trouxe grandes benefícios à saúde pública. No entanto, devido a falhas de processamento, tem sido relatada a presença de microrganismos patogênicos neste alimento após a pasteurização<sup>5,6</sup>. No Brasil, estudo realiza-

do em Fortaleza<sup>4</sup>, CE, demonstrou a presença de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp* em 10% das 20 amostras analisadas.

O presente estudo mostrou que houve uma melhora na qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de São Paulo. No estudo realizado em 1989<sup>3</sup>, 21% das amostras não obedeceram aos padrões legais; no presente trabalho, esta porcentagem foi de 10%. A qualidade do leite comercializado na cidade de São Paulo, no entanto, é superior à dos leites comercializados em outras regiões do estado e do País. Como pode ser visto na Tabela 1, um elevado percentual de amostras não atendeu aos padrões legais. Essa situação exige providências imediatas das autoridades sanitárias.

Tendo em vista a situação da qualidade do leite pasteurizado comercializado em nosso país, parece ser prudente manter a recomendação de fervura doméstica do leite destinado a crianças, uma vez que esse procedimento, bastante simples e acessível, acompanhado da refrigeração, mostrou-se eficaz em aumentar a segurança do consumo de leite pasteurizado e em preservar as qualidades organolépticas do produto.

#### Agradecimento

À Janice T. Silva, pelo auxílio laboratorial.

#### Referências bibliográficas

1. Dwork D. The milk option – An aspect of the history of the infant welfare movement in England, 1898-1908. *Med Hist* 1987; 31:51-69.
2. Wolf JH. “Don’t kill your baby”: Feeding infants in Chicago, 1903-1924. *J Hist Med Allied Sci* 1998;53:219-53.
3. Silveira NVV, Sakuma H, Duarte M, Rodas MAB, Saruwtari JH, Chicourel EL. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1989; 49:19-25.
4. Martins SCS, Albuquerque LMB. Qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Fortaleza. Bactérias multirresistentes a antibióticos. *Higiene Alimentar* 1999; 13:39-42.
5. Ryan CA, Nickels MK, Hargrett-Bean NT, Potter ME, Mayer L, Langkop CW, et al. Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. *JAMA* 1987; 258: 3269-74.
6. Upton P, Coia JE. Outbreak of *Escherichia coli* O 157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet* 1994;344:1015.
7. Leite Júnior AFS, Torrano ADM, Silva M. Qualidade microbiológica do leite tipo “C” pasteurizado comercializado em Campina Grande, Paraíba. Livro de Resumos do IX Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. João Pessoa (PB); 1995. p.85.
8. Silva MCC, Martins-Vieira MBC, Dias RS. Condições microbiológicas do leite tipo C em Belo Horizonte. Livro de Resumos do IX Encontro Nacional de Analistas de Alimentos; João Pessoa (PB), 1995. p.112.

9. Lopes MV, Lima, EMP, Simões AMM, Morais SIM, Góes RCS, Pereira LO, et al. Avaliação da qualidade de leite pasteurizado distribuído na cidade de Salvador. Livro de Resumos do IX Encontro Nacional de Analistas de Alimentos; João Pessoa (PB), 1995. p.133.
10. Garrido NS, Martins AMB, Ribeiro EGA, Faria RD, Yokosawa CE, Oliveira MA, et al. Condições físico-químicas e higiênic-sanitárias do leite pasteurizado tipos “C”, “B” e “integral” comercializados na região de Ribeirão Preto, SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1996;56:65-70.
11. Silva AA, Gonçalves GF, Fonseca IL, Moura JÁ, Silva LMM, Soares STM, et al. Estudo da qualidade do leite fluido pasteurizado, tipo “C”, comercializado na cidade de Natal e distribuído no Programa de Apoio ao Desnutrido: aspectos microbiológicos. Livro de Resumos do V Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos. Águas de Lindóia (SP); 1998. p.107.
12. Herrero F, Guilhermetti E, Bidóia AD, Svidzinsky TIE. Avaliação de leite tipos “C” e “B” pasteurizado produzido na região de Maringá, PR. Livro de Resumos do V Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos. Águas de Lindóia (SP); 1998. p.111.
13. Tanaka AY, Leite MA, Busnardo DP, Quaioti Bolzan TC, Leite CQF. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado comercializado na cidade de Bauru, SP. Livro de Resumos do V Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos. Águas de Lindóia (SP); 1998. p.113.
14. Sousa CL, Morgado FAF, Vasconcelos NCV, Costa CMR. Presença de coliformes em leite e derivados comercializados na cidade de Belém, PA. Livro de Resumos do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Salvador (BA); 1999. p.346.
15. Franciscato RF, Rossi DA, Sousa, RP, Oliveira JLG. Qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo “B” comercializado em Uberlândia, MG. Livro de Resumos do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Salvador (BA); 1999. p.363.
16. Morais TB. Indicadores de contaminação bacteriana no conteúdo lácteo de mamadeiras preparadas no domicílio, em duas classes socioeconômicas. [Dissertação]. São Paulo (SP). Universidade Federal de São Paulo; 1993.
17. Marcondes E. *Pediatria básica*. Vol. 1. 8ª ed. São Paulo: Sarvier; 1994.
18. Nelson, WE. *Tratado de Pediatria*. Tomo I. 7ª ed. México: Salvat; 1980.
19. Morais TB, Morais MB, Sigulem DM. Bacterial contamination of the lacteal contents of feeding bottles in metropolitan São Paulo, Brazil. *Bull World Health Org* 1998;76:173-81.
20. American Public Health Association. Standard methods for the examination of dairy products. 15ª ed. Washington DC: APHA; 1985.

Endereço para correspondência:

Dra. Tania B. Morais

Rua Araiões, 75

CEP 05442-010 - São Paulo - SP

Fone: (11) 576.4525 – Fax: (11) 571.1160