



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

OZILIANA CAMPOS DE LACERDA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO
LEITE CRU DA ESTÂNCIA LACERDA**

Assis
2010

OZILIANA CAMPOS DE LACERDA

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU
DA ESTÂNCIA LACERDA

Trabalho de conclusão de curso de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação.

Orientadora: Elaine Amorim Soares Menegon

Área de Concentração: Química Industrial

Assis
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

LACERDA, Oziliana Campos

Avaliação Microbiológica e Físico-Química do Leite Cru da Estância Lacerda / LACERDA, Oziliana Campos. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2010.

50p.

Orientador: Elaine Amorim Soares Menegon

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1.Alimentos. 2.Leite.

CDD:660

Biblioteca da FEMA

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU DA ESTÂNCIA LACERDA

OZILIANA CAMPOS DE LACERDA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Municipal
de Ensino Superior de Assis, como
requisito do Curso de Graduação,
analisado pela seguinte comissão
examinadora:

Orientadora: Elaine Amorim Soares Menegon

Analisador: Idécio Nogueira da Silva

Assis
2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter iluminado durante esta caminhada, aos meus pais, por tudo o que fizeram por mim, sem que, ao menor eu soubesse, sobretudo obrigada pela lição de amor que me ensinaram durante toda a vida. Tomara a Deus que eu possa transmiti-la no exercício de minha profissão.

Também aos meus irmãos Ozana, Ozaine e aos sobrinhos em especial minha irmã e “mãe” Ozinéia que sempre mostrou autoritária, mesmo nas minhas noites mal dormidas e nos sorrisos após a lágrimas, nervosismo antes das provas foram expressos de amor, e ao meu irmão Ozair que sempre mostrou preocupado, vendo minhas lágrimas a rolarem em meu rosto, mostrando que acreditava em mim, que minha inteligência iria além de minha imaginação, tinha vários motivos e razões para reconhecer minha importância através das minhas lutas vencer os obstáculos com coragem.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos da faculdade e em especial Eliane, Piero, Danilo, Priscila, Ana Paula, Keitte que em todos os momentos tiveram ao meu lado, me confortando e apoiando durante esta caminhada.

Além da Marinês do laboratório de solos da faculdade Fundação Gamon de Ensino de Paraguaçu Paulista que ajudou-me muito nesta caminhada e em especial os amigos do pesqueiro D.Maria, que me apoiaram nesta jornada, grandes foram as lutas, maiores as vitórias, vocês sempre estiveram presentes muitas vezes, pensei que este momento nunca chegaria. Queria recuar ou parar, no entanto vocês foram presença viva, respeitaram minha maneira única de ser, a companhia de vocês, o sorriso, brincadeiras e até mesmo as broncas concretizaram nossas idéias, fazendo da derrota uma vitória e da fraqueza uma força, meu muito obrigada por todas aquelas vezes em que me ouviram e deram seus apoios.

Dedico este trabalho aos meus pais que
plantaram e floriram o meu caminho, mesmo
quando distanciei-me deles.

RESUMO

O Leite é um dos produtos indispensáveis principalmente aos mamíferos nos primeiros meses de vida. É necessário que este produto tenha boa qualidade para prevenir das doenças que podem causar danos à saúde pública. Através de análises microbiológicas e físico-químicas é possível identificar se o leite possui condições de consumo. É de extrema importância a assepsia e boas práticas durante o processo de ordenha, garantindo assim a obtenção de um produto com qualidade higienico-sanitária e que não implique em risco para a saúde. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru produzido na Chácara Estância Lacerda. Foram analisadas duas amostras do leite cru e comparadas com o padrão da legislação vigente. Foram realizados exames microbiológicos de pesquisa *Salmonella* e NMP de Coliformes fecais e totais. Também foram realizadas análises físico-químicas: gordura, densidade, acidez, crioscopia, extrato seco, segundo a metodologia recomendada por SILVIA (1997). Os resultados mostraram que uma amostra está fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente quanto à contagem de coliformes. Já nas análises físico-químicas as duas amostras estavam de acordo nos padrões da legislação vigente. É de extrema importância a assepsia e boas práticas durante o processo de ordenha, garantindo assim a obtenção de um produto com qualidade higiênico-sanitária satisfatória e que não implique em risco para a saúde. Conclui-se que a assepsia durante o processo de ordenha é essencial para prevenir a contaminação do leite.

Palavras-chave: leite cru; *Salmonella*, Coliformes fecais, análise físico-química.

ABSTRACT

Milk is an essential product especially in the first months of life. It is necessary that the product has good quality to prevent diseases that can cause harm to public health. Through microbiological and physical-chemical properties can be identified if the milk has conditions of use. It is of paramount importance to sterile and good practices during the milking process, thus ensuring the attainment of a quality product and sanitary than incurring health risks. The aim of this study was to evaluate the microbiological and physical-chemical raw milk produced at Resort Lacerda. We analyzed two samples of raw milk and compared with the standard of law. Microbiological examinations were carried out research and Salmonella MPN of fecal coliforms. Were analyzed for physico-chemical fat, density, acidity, freezing point, solids, according to the procedure recommended by SILVIA (1997). The results showed that a sample is outside the parameters established by law as the coliform count. Already in the physical-chemical analysis the two samples were in agreement on the standards of law. It is extremely important to asepsis and practice during the milking process, thus ensuring the achievement of a product with satisfactory sanitary quality and that does not involve a risk to health. We conclude that the asepsis during the milking process is essential to prevent contamination of milk.

Keywords: raw milk, Salmonella, fecal coliforms, physical-chemical analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	_ Bacteria movel, com morfologia gram-negativo <i>Salmonella</i> .	19
Figura 2	– Bacteria encontrada como bastonetes gram-positivos, não esporulados, <i>listeria monocytogenes</i>	20
Figura 3	– Bacteria gram-negativo, em forma de coco bacilos, <i>bruselose</i>	21
Figura 4	– Lavar os tetos, para reduzir bacterias que colonizam o Teto.....	26
Figura 5	- Utilizar papel toalha, reduzindo as infecções.....	27
Figura 6	– Verificar o aspecto do leite, impedindo a proliferação de germes.....	27
Figura 7	– Colocar as teteiras.....	27
Figura 8	– Ajustar as teteiras, evitando qualquer sujeira, que possa acumular na boca da teteira.....	27
Figura 9	– Resultados de colorações do teste de cloretos.....	31
Figura 10	– Inoculação do EC.....	41
Figura 11	- Incubação do tetracionato e selenito-cistina.....	41
Figura 12	– Inoculação do agar bismuto sulfito e agar xilose lisina desoxicolato.....	42
Figura 13	– Incubação do agar lisina ferro e agar triplice açúcar ferro....	43
Figura 14	– Incubação do anti-soro.....	43
Figura 15	– Incubação de urease.....	44
Figura 16	– Incubação do dulcitol.....	44
Figura 17	- Incubação de indol.....	45
Figura 18	- incubação de malonato.....	45

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	QUALIDADE DO LEITE.....	14
3.	DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO LEITE.....	17
3.1.	<i>SALMONELLA.....</i>	18
3.2.	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES.....</i>	19
3.3.	<i>BRUCELOSE.....</i>	20
4.	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE CONTROLE.....	22
4.1.	DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ NO LEITE.....	22
4.2.	DETERMINAÇÃO DE DENSIDADE.....	22
4.3.	DETERMINAÇÃO DE CRISOSCOPIA.....	22
4.4.	DETERMINAÇÃO DE GORDURA NO LEITE.....	23
4.5.	DETERMINAÇÃO DE LACTOSE.....	24
4.6.	PROTEÍNAS.....	24
5.	PASTEURIZAÇÃO DO LEITE.....	25
6.	OS PRINCÍPIOS DE BOAS PRÁTICAS DURANTE A ORDENHA.....	26
7.	OS ASPECTOS DA LEGISLAÇÃO.....	28
8.	O ESTUDO DO LEITE NO ENSINO MÉDIO	30
9.	METODOLOGIA.....	33
9.1.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
9.1.1.	Materiais.....	33
9.1.1.1.	<i>Amostras.....</i>	33
9.1.1.2.	<i>Equipamentos.....</i>	33
9.1.1.3.	<i>Reagentes e meio de cultivo.....</i>	34
9.1.2.	Métodos.....	34
9.1.2.1.	<i>Procedimentos microbiológicos.....</i>	34
9.1.2.1.1.	<i>Teste confirmativo para coliformes totais e fecais.....</i>	34

9.1.2.1.2	Teste confirmativo para salmonella	35
9.1.2.1.2.1.	Enriquecimento seletivo.....	35
9.1.2.1.2.2.	Plaqueamento diferencial.....	35
9.1.2.1.2.3	Confirmação preliminar das colônias típicas de salmonella.....	36
9.1.2.1.2.4.	Testes sorológicos e bioquímicos para confirmação definitiva	36
9.1.2.2.	Procedimentos físico-químicos.....	38
9.1.2.2.1.	Determinação de acidez.....	38
9.1.2.2.2.	Determinação de gordura.....	38
9.1.2.2.3.	Determinação de densidade.....	39
9.1.2.2.4.	Determinação de extrato seco total.....	39
9.1.2.2.5.	Índice crioscópico.....	39
10.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
11.	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1-INTRODUÇÃO

Atualmente são realizadas várias pesquisas sobre a qualidade dos alimentos, pois os consumidores em geral exigem consumir produtos de boa qualidade. Um dos alimentos essenciais é o leite com importância nutricional quanto funcional. Torna-se necessário o uso de alguns métodos para avaliar a adulteração deste produto, assim permitindo assegurar e controlar eventuais fraudes. (ORDONEZ, 2005).

O leite é uma emulsão de cor branca, exposto ao sol, adquire gostos estranhos e desagradáveis. É um alimento indispensável aos mamíferos, nos primeiros meses de vida, enquanto não podem digerir e assimilar outras substâncias. (BEHMER, 1977). Do ponto de vista físico-químico o leite é uma mistura homogênea de grande número de substância, das quais algumas se encontram em emulsão (gordura), outras em suspensão (caseína e alguns sais) e o restante em soluções (lactose, proteínas do soro, sais). (ORDONEZ, 2005)

O leite conserva-se melhor em baixa temperatura, pois nesta, estaciona o desenvolvimento de germes causadores de sua fermentação, o leite fervido conserva-se melhor que o leite cru, a qual a fervura destrói os germes existentes. O leite deve ser obtido em ordenha higiênica, produzido por vacas sãs, resfriado imediatamente após a ordenha, e entregue ao consumidor no curto prazo. Os cuidados na obtenção higiênica do leite devem começar na operação da ordenha, à qual deve ser dedicado com maior cuidado para tornar o leite em boa qualidade (BEHMER, 1977).

Para a prevenção da contaminação devem ser lavadas diariamente as vacas, antes da ordenha, e no momento desta, deve ter o úbere lavado com água na temperatura entre 36 e 37°C e enxuto com pano branco de preferência, também o ordenhador deve estar de roupas limpas, mãos e antebraços lavados com sabão, unhas curtas para obter leite de boa qualidade (BEHMER, 1977).

Os fatores de contaminação do leite estão nas células epiteliais da glândula

mamária dentro dos alvéolos, nesta etapa de produção o leite pode ser contaminado por microrganismos principalmente bactérias. A partir do interior da glândula mamária, a pele do úbere e tetos e da superfície interna, equipamento de ordenha e o tanque (FONSECA, 2000).

Desta forma a contaminação microbiana do leite sofre vários impactos com a saúde da glândula mamária, tais como, a falta de higiene de ordenha, o ambiente onde as vacas ficam alojadas, os procedimentos de limpeza dos equipamentos, água utilizada, temperatura e o armazenamento são de extrema importância, pois, através destes fatores os microrganismos podem se multiplicar (FONSECA, 2000).

O leite contém microrganismos no momento da ordenha, mas pode ser contaminado durante seu manuseio e processamento, e é um excelente meio nutritivo para o crescimento de bactérias. Sendo assim, é de extrema importância realizar análises microbiológicas do leite, podendo obter-se resultados úteis para análise quanto a presença de bactérias patogênicas, indicando a contaminação proveniente: da vaca, do tambor, dos equipamentos e outros (PELCZAR; REID&; CHAN, 1981).

Dos fatos mencionados acima este trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do leite produzido na Chácara Estância Lacerda, localizada na cidade de Paraguaçu Paulista, comparando os resultados microbiológicos e físico-químicos com os padrões da legislação nacional vigente.

2- QUALIDADE DO LEITE

Nas fazendas leiteiras brasileiras, a qualidade microbiológica é o fator de qualidade mais crítico para a obtenção do leite de alta qualidade, pois os principais microrganismos envolvidos com a contaminação do leite são as bactérias, visto que os vírus, fungos e leveduras também são importantes como agentes causadores de mastites. Um fator extremamente importante como causador de mastites são as falhas de assepsia durante o processo de ordenha como contaminação das mãos de ordenhador, problemas com ordenharias mecânicas, vasilhames contaminados e contaminação ambiental. Os agentes causadores de contaminações são divididos em dois principais grupos: os microrganismos patogênicos e os deteriorantes. (FONSECA, 2000 e PEIXOTO,1985)

Os microrganismos patogênicos são aqueles que podem causar doenças de infecção ou intoxicação, mas que não estão relacionados a deterioração do leite, como *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Brucella abortus*, já os microrganismos deteriorantes causam alterações organolépticas no leite, mas não estão relacionadas a doenças. (FONSECA, 2000)

A mastite é uma alteração da glândula mamária no leite e divide-se em dois tipos: a clínica e a subclínica. A mastite clínica manifesta-se tais como edema, aumento de temperatura, endurecimento, dor nas glândulas mamárias e alteração no leite formando pus. Já a mastite subclínica é caracterizada por alteração na composição do leite e diminuição de proteína, principalmente a caseína, e a gordura do leite, sendo assim a mastite subclínica é responsável por 90% a 95% das doenças, além de causar muitos prejuízos como diminuição do leite aos proprietários das fazendas. (FONSECA, 2000 e PRATA, 2001)

Existe outra divisão conceitual, que se refere ao tipo de agente causador patogênico, que pode ser mastite contagiosa ou ambiental. A mastite contagiosa é transmitida durante a ordenha, pois os principais veículos de contaminação são as mãos do

ordenhador, pano para secagem de tetos, principalmente quando se utiliza para várias vacas, os equipamentos de ordenha quando ficam expostos em locais inadequado e depois utilizados nos tetos das vacas e até mesmo os insetos. As bactérias causadoras de mastite são *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*. (FONSECA, 2000)

Staphylococcus aureus: De característica subclínica, confere infecção de longa duração e com baixa taxa de cura. É um microrganismo encontrado no canal do teto e pele do teto, ocorre à transmissão pelas mãos do ordenhador e quando se usa mesmo pano para secagem dos tetos, este microrganismo se aloja na glândula mamária. Sua presença em novilhas é muito preocupante, pois é altamente contagioso, causando sérios danos no tecido da glândula mamaria (FONSECA, 2000 e HOBBS, 1998).

Streptococcus agalactiae: De característica mais subclínica do que clínica, confere infecção leve, causa edema e endurecimento da glândula mamaria, mas quando o diagnóstico é feito rapidamente, este quadro não leva a morte. É um microrganismo encontrado no interior das glândulas mamarias, ocorre a transmissão pelas mãos do ordenhador e quando bezerros criados juntos recebem leite com mastite. Esse microrganismo se aloja na glândula mamaria e tratos intestinais dando-se a origem a infecção, que pode ser eliminada em número de colônias no leite interferindo a qualidade, além de ocasionar quadros graves de septicemia, pneumonia e meningite (FONSECA, 2000 E CUNNINGHAM, 2008).

Já a mastite ambiental é causada por agente que vive no habitat das vacas, como em locais de esterco, urina e barro, ocorrem as infecções, durante o período entre as ordenhas, é necessário um controle rígido de manejo e higiene na ordenha. Existem dois grupos de bactérias causadoras de mastite ambiental: coliformes e *Streptococcus*, que aparecem por falta de higiene do ambiente, onde ocorre infecção

Nos tetos das vacas. É preciso utilizar técnicas de melhoria de higiene como um manejo adequado na ordenha, a prevenção é a palavra chave (FONSECA, 2000).

O exterior do úbere, principalmente a pele dos tetos, é um local que pode abrigar grande quantidade de microrganismos, as bactérias alojadas podem ser adquiridas

de forma direta com o solo, no momento em que elas estão deitadas, ocorre à contaminação da pele dos tetos e úbere. Também, os equipamentos de ordenhador como mangueiras e tanques alojam uma variedade de microrganismo que se multiplicam. Nesta superfície dificulta remover a sobra de leite deixando a limpeza incompleta, sendo os principais fatores críticos que causam contaminação bacteriana do leite (FONSECA, 2000 e WHITTEMORE, 1979).

A temperatura e o tempo de armazenamento do leite contribuem para o crescimento de bactérias, é necessário um resfriamento rápido e uso de tanques de expansão contendo superfície de contato com o leite, agitando e permitindo baixa temperatura. Também a água é de extrema importância para limpeza e desinfecção, pois se a água utilizada não for potável ela poderá contribuir para transmissão de doenças e causar a diminuição de vida útil dos equipamentos (FONSECA, 2000 e BEHMER, 1977).

3- DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO LEITE

O leite é um meio ideal para o desenvolvimento de muitos microrganismos patogênicos, ainda pode conter organismo provenientes da vaca, tais como: *Mycobacterium bovis*, espécies de brucella, a *Listeria monocytogenes* e a *coxiella burnetti* citamos também os organismos produtores de esporos, como exemplo o *Bacillus anthracis*, que penetram no leite a partir de vacas infectadas ou do solo. (BLACK, 1990)

O leite possui substâncias antibacterianas, incluindo a lisozima, aglutininas, leucócitos e lactenina. A lactenina está presente no leite humano que ajudam a prevenção de infecções entéricas em recém-nascidos. (BLACK, 1990)

Portanto, verifica-se que a prevenção da deterioração e transmissão de doença em alimentos e no leite esta relacionada à higiene em sua manipulação, refrigeração cuidadosa, processamento adequado e armazenamento. (BLACK, 1990)

Alguns microrganismos penetram no Leite antes que ele seja consumido, entre eles podemos citar:

- *Escherichia coli* – empregado como indicador de contaminação fecal, ou seja, falta de higiene-sanitária. A doença é causada por bactérias vivas nos alimentos crus emarinhos seu habitat é exclusivo no trato intestinal dos animais e no homem. Os sintomas são: diarreia, vômito e dor, com duração de pelo menos de 01 a 05 dias. (HOBBS, 1998)
- Gado doente pode transmitir para o leite o *Mycobacterium bovis* e espécies de *Brucella*. (BLACK, 1990)
- *Staphylococcus aureus* – é causador de toxinfecção de origem alimentar, com sintomas de vômitos agudos, dores no abdômen, diarreia e febre. Os sintomas

duram geralmente 24 horas, é raramente fatal. Deve haver cuidados de higiene pessoal. (HOBBS, 1998)

- *Streptococcus lactis*- são espécies de *Lactobacillus*, quando o leite azeda é porque os micróbios liberam ácidos lácticos e o pH diminui para valores inferiores, desta forma as proteínas do leite coagulam, deixando o leite azedo; isto não significa que o leite está estragado para o consumo humano, mas o sabor fica alterado. (BLACK, 1990)

Para eliminar as bactérias é preciso aplicar um tratamento térmico no leite, não muito baixa, pois elas podem ser indesejadas e alta poderá causar desnaturação das proteínas, interferindo na qualidade do leite, modificando o pH, causando escurecimento e perda do valor nutricional. (PELECZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

3.1- *Salmonella*

Agente etiológico – é uma bactéria móvel, com morfologia de bacilo Gram negativo (HOBBS, 1998).

Descrição da doença – é causador de toxinfecção alimentar, sendo que as pessoas geralmente têm febre, cólicas abdominais, diarreias, dor de cabeça e vômito, normalmente os sintomas duram de 04 a 07 dias e a maioria das pessoas se recuperam sem tratamentos de antibióticos, apenas crianças, gestantes e idosos podem ter maiores comprometimentos com a doença causando a morte (HOBBS, 1998).

Frequentemente encontra-se agentes patogênicos em toxinfecção de origem alimentar mesmo em países desenvolvidos, principalmente em produtos de laticínios onde são detectados a *Salmonella*. Seu habitat natural é o solo, ar água,

animais, seres humanos e equipamento (HOBBS, 1998).

A *Salmonella* entérica, subespécie entérica, sorotipo *enteritidis* (*S. enteritidis*) é um enteropatógeno classificado no gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Existem atualmente 2324 sorotipos de *Salmonella* dos quais 1367 pertencem à subespécie entérica (HOBBS, 1998).

A enfermidade é transmitida pelos equipamentos e ferramentas, higiene pessoal e consumo de alimentos crus ou mal cozidos. Geralmente são alimentos de origem animal, sendo a carne de frango e principalmente ovos, os mais susceptíveis (HOBBS, 1998).

Os sintomas iniciais da doença surgem 12 a 36 horas após a ingestão de alimento contaminado. Pode haver complicações crônicas da doença, como por exemplo, o surgimento de artrite duas semanas após a ingestão de leite contaminado (HOBBS, 1998).



Figura 1 - Bactéria móvel, com morfologia de bacilo gram-negativo, *salmonella*. (HOBBS, 1998).

3.2- *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes causa uma enfermidade infecciosa aguda ou subaguda, febril e exclusivamente nervoso, causada por zoonose (quando a doença da vaca passa para o ser humano). Morfologicamente, são bastonetes gram-positivos não

esporulados. As fontes de infecção podem ser alimentos, água, poeira, e são encontrados nos mamíferos e aves, bem como no solo, pastagem, água e silagem. (CORRÊA 1992)

A doença se manifesta em animais que se alimentam com silagem, os animais eliminam o germe pelas fezes, admite-se que a infecção ocorra por via oral, o germe penetra no organismo pela corrente circulatória, atinge o cérebro e o aparelho genital. (GUERREIRO, 1984)

As vacas afetadas por esta doença podem eliminar o germe pelo leite, contribuindo para a contaminação ao homem. A *Listeria monocytogenes* pode provocar aborto nos últimos meses de gestação. O germe é sensível aos antibióticos, entre os quais, a ampicilina e a tetraciclina são os mais comum. As crianças recém-nascidas e os adultos acima de 50 anos de idade são os mais afetados, pode provocar a meningite e septicemia. (GUERREIRO, 1984)

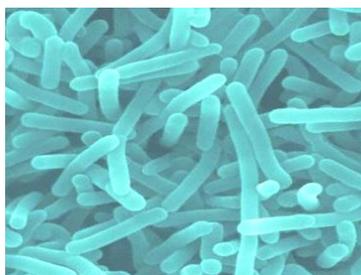


Figura 2 - Bactéria encontrada como bastonetes gram-positivos não esporulados, *Listeria monocytogenes*. (GUERREIRO, 1984).

3.3- BRUCELOSE

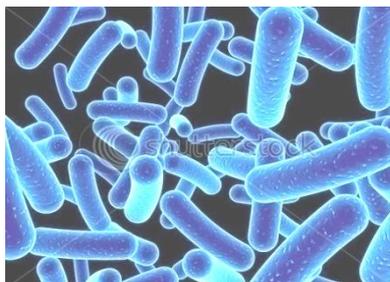
Caracterizado por bactérias gram-negativas, em forma de coco bacilos. É uma doença contagiosa ao homem, causada por problemas sanitários. As principais manifestações ocorrem em bovinos, suínos, caprinos e ovinos principalmente em

fêmeas, causando expulsão prematura do feto. (GUERREIRO, 1984)

As brucelas nos animais causam uma enfermidade que exige tratamento adequado para controlar, é preciso manter boa higiene, bom manejo dos animais e a vacinação. No Brasil o controle da brucelose bovina é feito principalmente na vacinação entre 4 a 8 meses, e no controle de trânsito de animais. Quando a infecção é comprovada através do teste sorológico o controle melhor obtido é feito pelo sacrifício total dos animais. (CORRÊA, 1992)

A doença é transmitida facilmente dos animais ao homem, pela ingestão (produtos alimentícios não tratados como leite cru), contato (quando entram em contato com animais infectados como abortos, urina, fezes e carcaças, neste caso os germes podem entrar pela pele), inalação (ocorrem com material seco de origem animal como poeira, transporte de animais e laboratórios), inoculação acidental (principalmente pelos veterinários e o pessoal do laboratório no local onde manipulam as bactérias), durante a elaboração da vacina. (GUERREIRO, 1984)

A brucelose humana na fase aguda, manifesta com febre, alguns pacientes sofrem acesso de curta duração, já em outras a febre é mais freqüente, podendo ocorrer lesões nas articulações ósseas, vísceras e nervosas, na fase crônica, a doença pode prolongar por vários anos. Para o tratamento da brucelose humana é necessário total repouso assim como boa alimentação e com uso de antibiótico adequado, no homem a febre é acompanhada de suores noturnos, dores articulares, musculares ou abdominais. (OTTO, 1984).



**Figura 3 - Bactérias gram-negativas, em forma de coco bacilos, *brucelose*.
(GUERREIRO, 1984)**

4- PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE CONTROLE

4.1- DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ NO LEITE

Desde o momento que o leite é retirado da vaca já apresenta germes causadores de fermentação da acidez no leite. A acidez normal compreende entre 16 a 20º Dornic, que corresponde a 1,60 a 2,00g de ácido láctico por litro. Os principais fatores que influenciam na acidez, são o tempo (à medida que o leite vai envelhecendo), falta de higiene e a temperatura no momento da manipulação do leite. A acidez tende a aumentar, a medida que os germes fermentadores de lácticos vão se multiplicando no leite. (BEHMER, 1977)

4.2- DETERMINAÇÃO DE DENSIDADE

A determinação da densidade é feita em função do Princípio de Arquimedes: “todo corpo mergulhado em um fluido recebe um empuxo vertical, de baixo para cima, igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo”.

Assim, a imersão do densímetro de massa constante no líquido provocará deslocamento de uma quantidade deste, que será, em massa, igual ao densímetro utilizado, e, em volume, proporcional à densidade da amostra. Esse deslocamento fará o líquido alcançar um valor na escala, graduada em graus densitométricos (SILVIA, 1995).

4.3- DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE CRIOSCÓPICO

A crioscopia do leite corresponde à medição do ponto de congelamento ou da depressão do ponto de congelamento do leite em relação ao da água. A composição normal do leite gera um valor aproximado de $-0,531^{\circ}\text{C}$ ($-0,550^{\circ}\text{H}$) para o ponto crioscópico. Esse valor depende de uma série de fatores relacionados ao animal, ao leite, ao ambiente, ao processamento e às técnicas crioscópicas, ocasionando dificuldades para o estabelecimento de padrões crioscópicos. (SILVA, 1995).

A determinação de fraude no leite por adição de água é a aplicação mais usual da crioscopia em laticínios, em razão da diminuição do valor nutricional, do aumento dos custos de transporte e da energia empregada no processamento, da queda de rendimento na fabricação de derivados e da contribuição para contaminação microbiana. A estimativa da fraude por adição de água deve levar em consideração o ponto de congelamento normal para o leite, particularmente em função da época do ano, do clima, da raça, da alimentação do gado e da região geográfica. (SILVA, 1995).

A crioscopia também é útil em programas de gerenciamento de qualidade do processamento do leite e derivados. (SILVA, 1995).

4.4- DETERMINAÇÃO DE GORDURA NO LEITE

O tipo de gordura predominante no leite de vaca — triglicerídeos — representa 97% a 99% dos lipídeos totais. O restante consiste de fosfolipídeos e esteróis, especialmente o colesterol. Os ácidos graxos predominantes no leite são os saturados, que formam de 60% a 70% dos triglicerídeos. Já os insaturados correspondem de 25% a 30%. Dois ácidos graxos (voláteis) de cadeia curta, o butírico e o capríco, são os responsáveis pelo aroma característico do leite. (PRATA, 2001)

4.5- DETERMINAÇÃO DE LACTOSE

É o açúcar característico do leite, considerado o único, sendo responsável pelo sabor adocicado, embora haja outros carboidratos em pequenas quantidades (PRATA, 2001).

4.6-PROTEÍNAS

As proteínas são os nutrientes mais importantes do leite e compõem uma parte essencial de nossa dieta, pode-se dizer também que são moléculas gigantes constituídas de unidades menores chamadas aminoácidos. As principais proteínas do leite são a caseína, a B-lactoglobulina e x-lactoalbumina. Os tipos de caseínas são: (fosfoproteínas) representam 80% das proteínas do leite, o restante é constituído pela B-lactoglobulina e x-lactoalbumina com 16% e 4% do total das proteínas. (PRATA, 2010).

5- PASTEURIZAÇÃO DO LEITE

O termo pasteurização significa processo de aquecimento de cada partícula do leite.

Comercialmente são utilizados dois métodos de pasteurização, o método de manutenção a baixa temperatura que expõe 62,6 °C (145° F), durante 30 minutos e o método de alta temperatura que expõe 71,7 °C (161 °F), durante 15 minutos. (PELECZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

Ambos os métodos devem ser adequados e aprovados pela autoridade sanitária, é

Necessário após a pasteurização prevenir para não contaminar novamente o leite, pois, o leite deve ser armazenado a baixa temperatura para retardar o crescimento dos microrganismos (germes) que sobrevivem à pasteurização. O leite deve ser pasteurizado mesmo que seja obtido com todos os preceitos de higiene e manutenção, quando se aplica um processo térmico rígido, ocorre à redução a população microbiana, destruindo os germes patogênicos, contribuindo para melhora qualidade de manutenção do leite. (PELECZAR; CHAN; KRIEG, 1996)

O método esterilização UHT (ultra alta temperatura), é um processo de aquecimento do leite para matar os esporos bacterianos, consiste no aquecimento a 138°C por 2 segundos. É o ponto mais importante para garantir a obtenção de um processo de esterilização comercial. Este leite pode ser armazenado sem refrigeração e tem uma vida útil de seis meses a um ano. (PRATA, 1998).

6- OS PRINCÍPIOS DE BOAS PRATICAS DURANTE A ORDENHA

O manejo de ordenha é uma das estratégias mais importante para garantir a qualidade do leite produzido nas fazendas, principalmente nas épocas de chuvas, também o modo de conduzir os animais para a ordenha, é de extrema importância, pois os animais devem ser conduzidos de forma tranquila, sem atropelos e agressões, pois o estresse prejudica a ejeção do leite no momento da ordenha. (FONSECA, 2000 e WHITTEMORE, 1979)

A ordenha é a parte central da atividade podendo aperfeiçoar a capacidade de produção, sendo assim é necessário evitar oportunidades de contaminação dos tetos por parte do microrganismo, vários fatores podem influenciar: como as mãos e antebraços dos ordenhadores que devem ser lavados com água e sabão, além da desinfecção das teteiras. (FONSECA, 2000 e PRATA, 2001)

É necessário que seja iniciado os procedimentos de ordenha com a limpeza dos tetos, para garantir que os germes não cresçam no canal dos tetos e possam entrar no úbere. Sendo assim é de extrema importância retirar os primeiros jatos de leite em uma caneca de fundo preto, com o objetivo de analisar a mastite clínica e estimular a descida do leite. Os primeiros jatos constituem uma maior contaminação microbiana. (FONSECA, 2000 e BEHMER, 1977).

Os princípios de boas práticas durante a ordenha são:



Figura 4 - Lavar os tetos, para reduzindo bactérias que colonizam o teto.

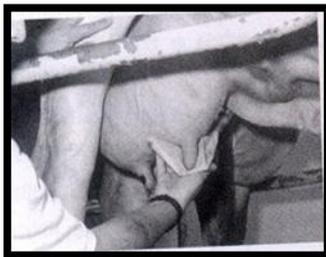


Figura 5 - Utilizar papel toalha, reduzindo as infecções.



Figura 6 - Verificar o aspecto do leite, impedindo a proliferação de germes.

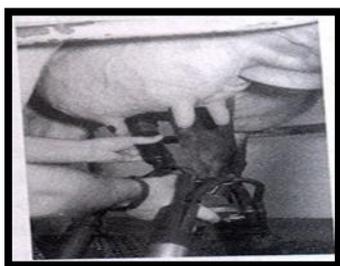


Figura 7 - Colocar as teteiras.

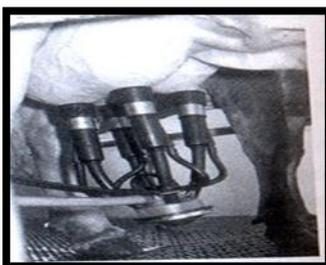


Figura 8 - Ajustar as teteiras, evitando qualquer sujeira, que possa acumular na boca da teteiras.

7- OS ASPECTOS DA LEGISLAÇÃO

Segundo o artigo 475 de RIISPOA (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal), denomina-se o “Leite, sem qualquer outra especificação, o produto normal, fresco, integral, oriundo da ordenha completa e ininterrupta de vacas sadias”, apresentando as seguintes características de acordo com a tabela 1:

Parâmetro	V.M.P
Acidez Dornic	15 a 20 °D
gordura (mínimo)	3,0 %
densidade a 15°	1,028 a 1,033 g/L
extrato seco total (mínimo)	11,5 %
extrato seco desengordurado (mínimo)	8,5 %
Índice crioscópico (mínimo)	- 0,55°H

Tabela 1 - Físico-Química do Leite e Derivado – Métodos Analíticos (In: SILVA, 1995).

A tabela 2 mostra o padrão microbiológico sanitários para leite tipo C conforme instrução normativa nº51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento:

Parâmetro	Integral	Método de análise
Coliforme total NMP/mL	$N > 5$; $c > 2$; $m > 2$; $M > 4$	S.DA / MA, 1993
Coliforme fecal NMP/mL	$n > 5$; $c > 1$; $m > 1$; $M > 2$	S.DA / MA, 1993
<i>Salmonella</i> 25mL	$n > 5$; $c > 0$; $m > \text{ausência}$	S.DA / MA, 1993

Tabela 2 – Conforme a Instrução normativa Nº51 de 18 de setembro de 2002

n: é o resultado de unidades da amostra representativa a serem coletadas e analisadas individualmente.

c: é o número aceitável de unidades da amostra representativa que pode apresentar resultado entre os valores “m” e “M”.

m: é o limite inferior (mínimo) aceitável. É o valor que separa qualidade satisfatória de qualidade marginal do produto. Valores abaixo do limite “m” são desejáveis.

M: é o limite superior (Máximo) aceitável. Valores abaixo de “M” não são aceitos.

8- O ESTUDO DO LEITE NO ENSINO MÉDIO

Ensinar nos dias atuais, requer o interesse dos alunos com maior freqüência de aprendizagem. É necessário reter a atenção dos alunos através de meios de comunicação com temas relacionados ao cotidiano para motivar o processo de ensino-aprendizagem, um dos temas a ser trabalhados é a alimentação. Utilizando como tema o leite, um alimento amplamente consumido, é possível explorar conceitos relacionados à química e ao meio vivencial dos alunos, exercitando idéias sobre constituição e propriedades dos materiais, misturas e transformação. (PASTEUR, 1997)

A investigação da qualidade do leite como ferramenta de estímulo no aprendizado de conceitos físico-químicos é de fundamental importância, pois os alimentos ingeridos devem estar aptos para o consumo humano. (PASTEUR, 1997)

Portanto o leite pode ser adulterado por diversos motivos, os testes físico-químicos são úteis para detectar possíveis desvios na composição do leite causado pelo mau processamento e armazenamento. (SILVA, 1995)

Dentre os diversos motivos de adulterações pode-se destacar o teste de cloretos, que indica a contaminação do leite por hipoclorito. A adição de hipoclorito tem a finalidade de mascarar a má qualidade do leite. (SILVIA, 1995)

Teste para identificar substância estranha ao leite - Teste de cloretos

Fundamenta-se na reação do nitrato de prata com os íons cloretos em presença de cromato de potássio como indicador.

- Material

Vidrarias: Tubo de ensaio, pipeta graduada.

Reagentes: Solução de nitrato de prata (AgNO_3) 0,1N, solução de cromato de potássio (K_2CrO_4) 5% m/v.

- Procedimento

Colocar 10mL de leite ao tubo de ensaio. Adicionar 0,5mL de cromato de potássio 5% e 4,5mL de nitrato de prata 0,1N. Misturar cuidadosamente.

- Resultados

Coloração levemente marrom a tons alaranjados: reação negativa, leite normal.

Coloração amarela: reação positiva e indica suspeita de presença de cloreto.

Observação: O resultado positivo de coloração amarela indica a presença de cloretos em quantidades superiores à faixa normal (0,08 a 0,1 %).

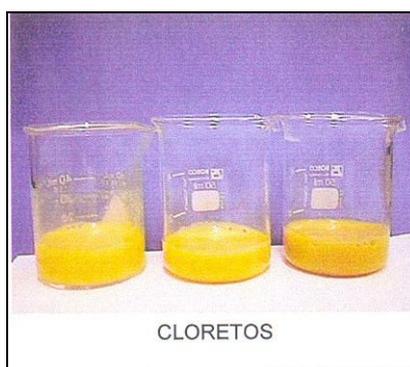


Figura 9– Resultados de colorações do teste de cloretos.

Após a aula prática pode-se avaliar o material didático apresentado visando aprendizagem simples e a participação dos alunos. Os conceitos químicos de mistura e reação química são abordados de forma a fazer sentido na vida cotidiana do aluno. (PASTEUR, 1997)

As aulas podem ser realizadas em duas aulas práticas, sendo uma explorando as características físico-químicas do leite e outra abordando os testes de presença de substâncias estranhas.

O professor de química pode preparar aulas práticas sobre o leite e discutir a função de cada substância estranha no leite e suas características de alteração como:

- Aspectos como área e forma de atuação dos organismos de monitoramento da qualidade e da legislação pertinente;
- Extrapolações para outros produtos, métodos e conceitos químicos envolvidos.

Desta forma os alunos terão mais informações sobre a qualidade do leite que faz

parte de sua principal alimentação, além de visar o ensino-aprendizado para seu conhecimento levando para toda família.

9- METODOLOGIA

9.1- MATERIAIS E MÉTODOS

9.1.1.- Materiais

9.1.1.1 – Amostras

Foram coletadas duas amostras de Leite cru na Chácara Estância Lacerda, localizada na SP 421, no Município de Paraguaçu, Paulista – SP, de propriedade de Juversino Corrêa de Lacerda e Tereza de Campos Lacerda, e encaminhadas para análise no CEPECI.

- ▶ As amostras utilizadas no presente estudo foram de leite bovino cru, leite de ordenha manual da cidade de Paraguaçu Paulista - SP.
- ▶ As amostras de leite cru foram coletadas em recipiente isotérmico contendo gelo picado e transportado imediatamente, para o laboratório, a fim de proceder às análises.

9.1.1.2 – Equipamentos

- Balança analítica (HR – 200 Max 210g d=0,1mg)
- Banho-maria (Tecnal, modelo 054)

- Fluxo laminar (TroxTechnik, série 1341)
- Autoclavevertical (Phoenix, modelo AV75, nº 7302)
- Agitador magnético (TM- 005 Técnal)
- Estufa bacteriológica regulada à 37°C (Marconi, modelo 032)
- Estufa bacteriológica regulada à 32°C (Fanem, modelo 502)
- Crioscópio (Dreno, modelo m.90/BR)
- Centrífuga de Gerber (Fanem, modelo 202)
- Butirômetro (Dr:N. Gerber, milkLait 65°C)
- Estufa de secagem e esterilização(Fanem, modelo 315 SE)
- Termo-lacto-densímetro (Incotern)

9.1.1.3 – Reagentes e Meios de cultivo

- Verde brilhante (acumedia e lote101, 558)
- Tetracionato (acumedia e lote000048691)
- Selenito-cistina (acumedia e lote 101, 674)
- Agar xilose lisina desoxicicolato (acumedia e lote101, 562)
- Agar bismuto sulfito (acumedia e lote 101, 955)
- Caldo E.C. (acumedia e lote 0302-100)
- Solução de Verde Brilhante 1% (acumedia e lote101,558)

Os reagentes utilizados nos testes físico-químicos foram de grau analítico: hidróxido

de sódio, fenolftaleína, ácido sulfúrico, álcool amílico, éter etílico, mistura refrigerante (2 kg de gelo moído, 300g cloreto de sódio e 1mL de água destilada), cloreto de sódio 6.859g/L a 20°C (-0,422°H) e cloreto de sódio 10.155g/L a 20°C (-0,621°H).

9.1.2. Métodos

9.1.2.1- Procedimentos microbiológicos

9.1.2.1.1-Teste confirmativo para coliformes totais e fecais

Foram efetuadas as seguintes diluições a partir da amostra: 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Foi pipetado a partir das amostras, alíquotas de 1 mL de cada diluição para uma série de três tubos de caldo verde brilhante e foram incubados a 37°C. Após 48 horas de incubação, observou-se os tubos em que houve a presença do desprendimento de gás nos tubos de durhan do caldo de verde brilhante (tubo com fermentação de lactose positivo).

De cada tubo positivo, foi transferida uma alçada de inóculo para um tubo de Caldo EC, previamente identificados, com incubação em temperatura seletiva de 44,5°C por 24 horas em banho-maria. Após o tempo de incubação foi verificado se houve desprendimento do gás nos tubos de durhan de EC. (resultado positivo para coliformes fecais).

Os resultados foram calculados a partir dos tubos positivos em tabela de NMP (número mais prováveis) apropriada.

9.1.2.1.2-Teste confirmativo para Salmonella

9.1.2.1.2.1- Enriquecimento seletivo

Foi retirada alíquota de 225 mL da amostra de leite bovino cru, adicionada 4,5mL de caldo verde brilhante em um erlenmeyer, e incubado a 37°C. Após 24 horas de incubação, alíquotas de 1 mL do erlenmeyer foi transferidas para 10 mL dos caldos seletivos tetrionato e selenito-cistina, com incubação a 37°C por 24 horas em banho-maria, respectivamente.

9.1.2.1.2.2- Plaqueamento diferencial

Após o período de incubação dos caldos seletivos, foram feitas estrias, com o auxílio de alça níquel-cromo nos meios seletivos ágar bismuto sulfito (BS) e ágar xilose lisina desoxicilato (XLD), cujas placas foram inoculadas invertidas a 37°C por 24 horas.

Após o tempo de incubação verificou-se a presença de colônias típicas de *Salmonella* nas placas. No BS as colônias típicas *Salmonella* são marrons ou pretas com ou sem brilho metálico e no ágar XLD, as colônias são transparentes, cor de rosa escura, com ou sem centro preto.

9.1.2.1.2.3- Confirmação preliminar das colônias típicas de salmonella

Colônias suspeitas nas placas foram transferidas com o auxílio de alça níquel-cromo para meios preparados em tubos de ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI) e Agar lisina ferro (LIA), cujos os tubos foram inoculadas a 37°C por 24 horas.

Após o tempo de incubação verificou-se a presença de colônias típicas de *Salmonella* nos tubos.

Reação típica de *Salmonella* em Ágar Tríplice Açúcar Ferro TSI: rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do ágar). Reação atípica em TSI, que não deve ser descartada se as demais

reações em Ágar Lisina Ferro (LIA) se apresentarem típicas: rampa e fundo ácidos (amarelos) com ou sem produção de H₂S.

Reação típica de *Salmonella* em Ágar Lisina Ferro (LIA): fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H₂S (escurecimento do meio). Reação atípica em ágar Lisina Ferro (LIA), que não deve ser descartada se as demais reações em ágar Tríplice Açúcar Ferro TSI se apresentarem típicas: fundo amarelado com rampa alcalina, com ou sem produção de H₂S.

9.1.2.1.2.4- Testes sorológicos e bioquímicos para confirmação definitiva

Após o período de incubação dos mesmos, foram realizados os seguintes testes a partir das colônias puras do tubo de ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI).

(a) Teste sorológico somático polivalente: foi transferida uma alçada para cada um dos quadrados demarcados, e adicionado uma gota de solução salina fisiológica estéril a cada um dos quadrados e emulsionado bem a Cultura. Também sobre um dos quadrados adicionou-se uma gota de anti-soro polivalente *Salmonella* e emulsionado bem. Segurando a lâmina contra um fundo preto bem iluminado, foram feitos delicados movimentos de inclinação e rotação da lâmina, para movimentar a emulsão. Observando-se ocorre aglutinação no quadrado com o anti-soro. Comparou-se com a aparência da emulsão no quadrado com salina (controle negativo), para não confundir a aparência turva da emulsão com a reação de aglutinação. Eventualmente pode ocorrer aglutinação em ambos os quadrados (reação inespecífica), provavelmente causada por cepas rugosas e auto-aglutináveis.

(b) Teste da urease: foi transferida uma alça níquel-cromo do tubo de ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI), para um tubo com Caldo Uréia de Christensen, com inculação a 35°C/24 horas. Observou a viragem alcalina do indicador, com alteração da cor do meio de pêssego para cor de rosa escuro (teste positivo), ou permanência do meio na cor original (teste negativo). A maioria das cepas de *Salmonella* são urease

negativas.

(c) Teste de fermentação do dulcitol: foi transferida uma alça níquel-cromo do tubo de ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI), para um tubo com Caldo Vermelho de Fenol suplementado com 0,5% de dulcitol, com Inoculação a 35°C/48 horas. Observou a viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio de avermelhada para amarela (teste positivo). Viragem alcalina do indicador (de avermelhado para rosa) ou não alteração da cor do meio indica teste negativo. A maioria das cepas de *Salmonella* fermenta o dulcitol.

(d) Teste de indol: foi transmitida uma alçada uma alça níquel-cromo do tubo de ágar tríplice-açúcar-ferro (TSI), para tubos com Caldo Triptona, com inoculação a 35°C/24h. Observou se há desenvolvimento de um anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura (teste positivo), ou se o anel permanece amarelado, cor do reagente de Kovacs (teste negativo). Desenvolvimento de vários tons entre vermelho e rosa indica teste indeterminado. As cepas de *Salmonella* são indol-negativas.

(e) Teste do malonato: foi transferido uma alçada cromo do tubo do caldo malonato modificado (inoculado com a cultura em Caldo Triptona) a 35°C/48 horas. Observou a viragem alcalina do indicador, alterando a cor do meio de verde para azul (teste positivo) ou permanência da cor verde do meio inalterada (teste negativo). Eventualmente pode ocorrer viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio para amarelo, devido à fermentação da glucose presente (teste negativo). A maioria das cepas de *Salmonella* são malonato-negativas.

9.1.2.2 Procedimentos físico-químicos

9.1.2.2.1 -Determinação de acidez

Foi transferido para um erlenmeyer de 125 mL de leite, com auxílio de pipeta volumétrica, 10ml de leite; adicionou-se 3 gotas de fenolftaleína e titulou-se com uma solução hidróxido de sódio 0,111mol/L. O resultado de cada 0,1 mL corresponde a 1º D e cada 1º D corresponde a 0,01% de acidez expressa como ácido láctico.

9.1.2.2.2 -Determinação de gordura

Foi transferido para um butirômetro de Gerber, 10 mL de ácido sulfúrico (1:4). Adicionou-se cuidadosamente 11 mL de leite com auxílio de uma pipeta volumétrica e 1 mL de álcool amílico. Limpou-se o gargalo com papel absorvente e vedou-se. Enrolou-se em toalha e agitou-se rigorosamente. Centrifugou-se em Centrífuga de Gerberde 4 a 5 minutos. Deixou-se em banho-maria (65-66°C) por 2 a 3 minutos. Após esse período, fez-se a leitura da quantidade de gordura no próprio butirômetro.

9.1.2.2.3 Determinação de densidade

Foi transferido para uma proveta, evitando formação de espuma, 225 mL de leite, introduziu-se cuidadosamente o termolactodensímetro. Após a estabilização, anotou-se a temperatura e a densidade.

9.1.2.2.4 - Determinação de extrato seco total

Foi colocado, em uma cápsula de alumínio, areia purificada em um bastão de vidro na borda de um recipiente. Dessecou-se em estufa a 105°C por 1hora e esfriou-se

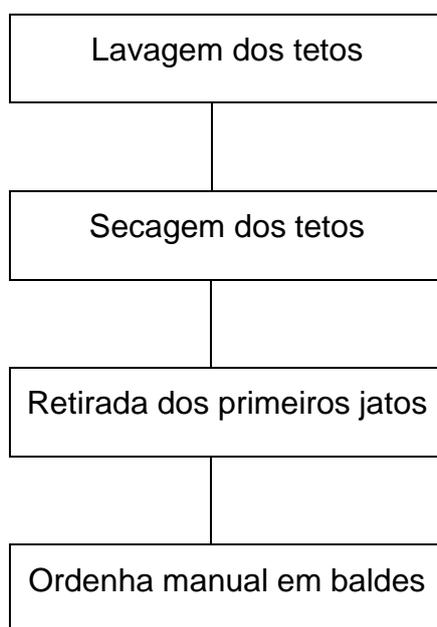
em dessecador. Pesou-se o recipiente em balança analítica, e anotou-se o peso. Pesou-se na balança analítica, aproximadamente 5 g da amostra, com auxílio de uma pipeta graduada ou espátula, direto no recipiente. Dessecou-se em estufa a 105°C por 3 horas e esfriou-se em dessecador. Pesou-se e anotou-se o peso. Retornou-se a estufa mais 30 minutos, esfriou-se em dessecador. Pesou-se e anotou-se o peso. Repetiu-se os dois últimos procedimentos até que a diferença as duas pesagem consecutivas foi menor que 0,1 mg e anotou-se o valor menor.

9.1.2.2.5 – Índice crioscópio

Foi montado o crioscópio, ajustado e mantida a mistura refrigerante entre - 5 e -8°C. Procedeu-se a calibração do aparelho, transferindo-se a solução padrão -0,422°H e - 0,621°H para o tubo de vidro até cobrir o bulbo do termômetro de Beckman (aproximadamente 70 mL) e fazendo a leitura no aparelho. Após a calibração, fez-se a leitura direta da amostra do leite em quintuplicata.

10- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fluxograma abaixo mostra como é feita a ordenha manual na Chácara Estância Lacerda.



É necessário um controle rigoroso de assepsia das mãos do ordenhador, lavagem dos tetos das vacas e nos baldes, para eliminar quaisquer bactérias provenientes do leite no momento da ordenha.

10.1. Análises microbiológicas

A figura abaixo mostram os resultados das análises microbiológicas de coliformes totais e fecais realizados nas amostras.

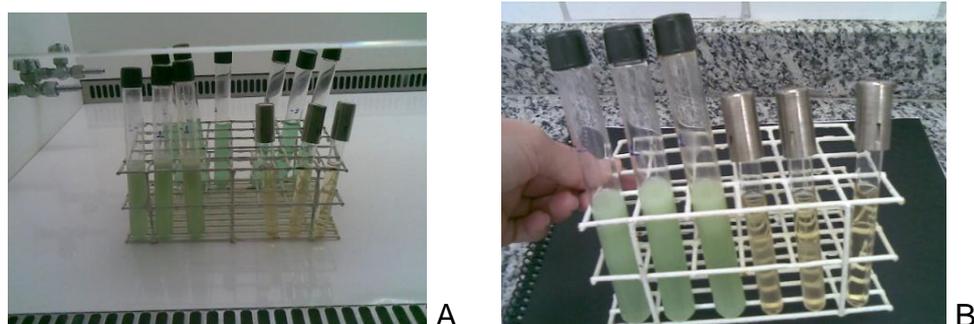


Figura 10 – (A)Análise de coliforme totais e fecais amostra; (B) análise de coliforme totais e fecais amostra 2.

Na figura 10a observa-se que houve desprendimento de gás nos tubos de durhan (reação positiva) em três tubos de Verde brilhante na diluição 10^{-1} e em três tubos da diluição 10^{-2} .

A partir dos tubos positivos de verde brilhante, foram inoculam no caldo de EC. Observa-se na figura que três tubos de EC da diluição 10^{-1} positivaram.

Na figura 10b houve desprendimento de gás em 3 tubos de verde brilhante da diluição 10^{-1} . Na analise de EC não houve tubos positivos.

As figuras 11a e 11b mostram uma etapa da análise de *Salmonella*, a inoculação em caldos seletivos: tetrionato (branco) e selenito-cistina (vermelho).

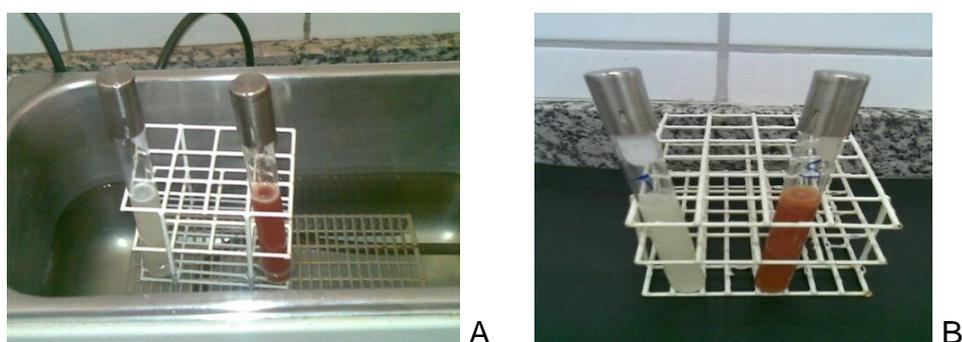


Figura 11 – (A)Inoculação da etapa de enriquecimento selenito para *Samonella* da amostra 1; (B) -Inoculação da etapa de enriquecimento selenito para *Samonella* da amostra 2.

As figuras 12a e 12b mostram o plaqueamento diferencial para *Salmonella* em ágar xilose lisina desoxicicolato (XLD) e ágar bismuto sulfito (BS).

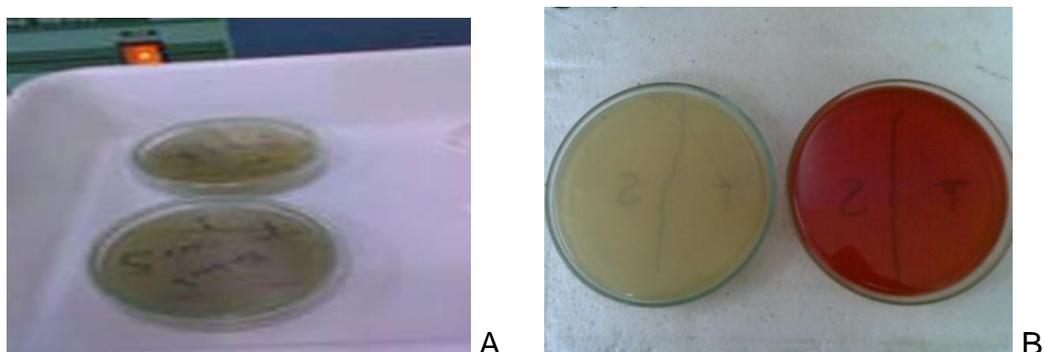


Figura 12- (A)- Placas de ágar xilose lisina desoxicicolato (XLD) e ágar bismuto sulfito (BS) amostra de leite 1; (B) - Placas de ágar xilose lisina desoxicicolato (XLD) e ágar bismuto sulfito (BS) amostra de leite 2.

Na figura 12a que mostra a análise da amostra 1 houve colônias pretas com brilho metálico no ágar bismuto sulfito (BS) típicas de *Salmonella*.

Na figura 12b que mostra a análise da amostra 2 não houve colônias típicas de *Salmonella* nas placas de placas de ágar bismuto sulfito (BS) e ágar xilose lisina desoxicicolato (XLD).

A figura 13 mostra a inoculação da amostra 1 de leite no tubo TSI (direita) e LIA (esquerda).

Houve produção de H_2S e reação ácida com escurecimento do ágar nos tubos de TSI. Essa reação é típica para *Salmonella*, mas não deve ser descartada, pois no tubo de LIA ocorreu reação típicas de *Salmonella*: sem mudança de cor e produção de H_2S .



Figura 13–Inoculação no Ágar Lisina Ferro (LIA) e Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) amostra 1.

Como ocorreu reação positiva no tubo de LIA, a amostra 1 foi submetida nos testes bioquímicos e sorológico. A figura 14 mostra a prova sorológica do antígeno o para *Salmonella*.

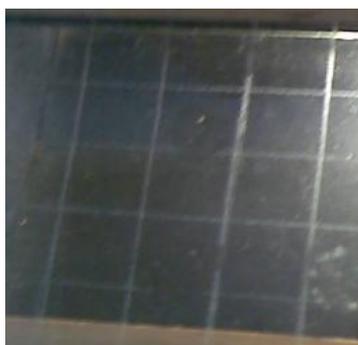


Figura 14–Teste sorológico

A figura 14 mostra que no teste sorológico houve aparência turva da emulsão com reação de aglutinação, causada por cepas rugosas e auto aglutináveis. O teste reação típica de *Salmonella*.

Com o sorologia típica de *Salmonella*, foi necessário proceder aos testes bioquímicos. A partir da cultura no tubo de TSI, a amostra foi submetida as análises de urease, dulcitol, indol e malonato.

A figura 15 mostra a incubação do tubo de uréase. O teste apresentou viragem do indicador, com alteração da cor do meio pêssego para a cor rosa escuro (teste positivo). A maioria das cepas de *Salmonella* são urease negativa.



Figura15–Incubação de urease

A figura 16 mostra a incubação do tubo de dulcitol. O teste apresentou viragem do indicador, com alteração de avermelhado para rosa escuro (teste negativo). A maioria das cepas de *Salmonella* fermentam a lactose.



Figura 16–Incubação de dulcitol

A figura 17 mostra a incubação do tubo de indol. O teste apresentou um anel Vermelho-violeta na superfície do meio de cultura (teste positivo). As cepas de *Salmonella* são indol-negativas.

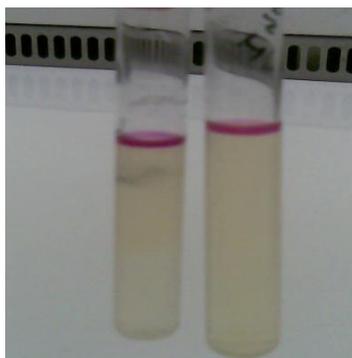


Figura17– Incubação de indol

A figura 18 mostra a incubação do tubo de malonato. O teste apresentou a viragem do indicador, com alteração da cor de meio verde para azul (teste positivo).



Figura 18–Incubação de malonato

Serão consideradas como *Salmonella* todas as colônias que apresentarem as seguintes características:

Teste	Padrão	1°Amostra
Teste sorológico somático polivalente	(+)	(+)
Teste de urease	(-)	(+)
Teste de fermentação do dulcitol	(+)	(-)
Teste de indol	(-)	(+)
Teste de malonato	(-)	(+)

Tabela 3–Resultados e padrão das análises sorológicas e bioquímicas para confirmação de *Salmonella*.

Observa-se na tabela 3 que as provas bioquímicas realizadas na amostra 1 de leite cru apresentaram resultados não típicos de *Salmonella*. Portanto o resultado final foi de ausência de *Salmonella* nesta amostra.

A tabela 4 mostra os resultados finais das amostras de leite analisadas.

Parâmetros analisados	Amostra 1	Amostra 2	Padrão para leite pasteurizado TIPO C
Coliforme Total	240 NMP/ mL	23 NMP/ mL	4
Coliforme Fecal	15 NMP/ mL	<3 NMP/ mL	2
<i>Salmonella</i>	ausência em 25 mL	ausência em 25 mL	ausência

Tabela 4 – Resultados das análises realizadas nas 2 amostras de leite cru.

Nos resultados obtidos nas amostras de leite bovino cru foi observado, conforme tabela 4, que nas primeiras amostras, o resultado coliformes totais foi de 240NMP/mL comparando com a segunda amostra o numero de coliforme totais foi de 23NMP/mL, portanto na segunda amostra houve um controle mais rigoroso de

higiene.

O mesmo aconteceu com o coliforme fecal na primeira amostra de leite bovino cru, obteve cerca de 15NMP/ mL, comparando com a segunda amostra o numero de coliforme fecal foi de <3NMP/ mL, portanto na segunda amostra houve um controle mais rigoroso de higiene.

Já nas análises de *Salmonella* na primeira amostra foi preciso fazer vários testes confirmativos e na segunda não foi preciso, pois nos primeiros testes foi observado um leite de boa qualidade, indicando que o controle foi mais rigoroso.

10.2. Análises físico-químicas

A tabela 5 mostra os resultados das análises físico-químicas realizadas nas 2 amostras de leite cru.

Parâmetros analisados	Amostra 1	Amostra 2	Padrão
Acidez Dornic	18°D	19°D	15 a 20 °D
gordura (mínimo)	3,0 %	3,9 %	3,0 %
densidade a 15°	1,029 g/L	1,030 g/L	1,028 a 1,033 g/L
extrato seco total (mínimo)	11,5 %	11,8	11,5 %
extrato seco desengordurado (mínimo)	8,5 %	8,7	8,5 %
Índice crioscópico (mínimo)	- 0,55°H	- 0,58°H	- 0,55°H

Tabela 5- Resultados das análises realizadas nas 2 amostras de leite cru.

A tabela 5 mostra os resultados obtidos nas análises físico-químicas das amostras de leite e o padrão legal vigente conforme o artigo 475 de RIISPOA (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal).

Ambas as amostras obtiveram resultados de acordo com o padrão. Pode-se observar que a amostra 1, obteve resultados de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado e índice crioscópico no limite mínimo do padrão.

Os trabalhos realizados avaliam a qualidade de leite pasteurizado, pois a comercialização direta do leite cru ao consumidor é proibida. Apesar da proibição, é sabido que esse comércio existe.

Segundo o CEPECI (Centro de Pesquisa em Ciências) foram realizados uma pesquisa de campo em oito bairros de Assis, a qual foram feitas análises de 14 amostra de leite, para avaliar a contagem de coliformes fecais, totais e brucelose.

Das 14 amostras analisadas 13 (71,4%) estavam fora dos padrões microbiológicos e nove foram feitas análise de brucelose, mas 2 (22,2%) estavam contaminadas com brucelose.

Segundo a legislação, o leite só está pronto para o consumo, após passar pelo processo de pasteurização.

Foi aplicado um questionário com perguntas específicas para a população, e simplesmente a maioria afirma consumir leite cru, pois é mais forte, prático, melhor e barato, entretanto a população esquecem que a qualidade do produto é mais importante.

Zocche, 2002 realizou um estudo, coletando 40 amostras de leite pasteurizados de diversos estabelecimentos comercial de Palotina-PR, comparando com os resultados do padrão da legislação nacional vigente, foram feitas análises microbiológicos e físico-químico, coletaram 16 amostras da marca X, 16 amostras da marca Y e 8 amostras da marca Z. Os resultados demonstraram-se dentro dos padrões de legislação, e constatou-se um bom resultado, relacionado com o alto superaquecimento durante o processo de pasteurização do leite. (ZOCHE, 2002)

11- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem tirar algumas conclusões relacionadas às condições microbiológicas do leite bovino cru, nas duas amostras não foram detectada a presença de *Salmonella*.

Na análise de coliforme totais foram detectados 240 NMP/ mL na primeira amostra já na segunda 23 NMP/ mL, nas análises de coliformes totais apresentaram na primeira amostra 15 NMP/ mL, já na segunda obteve-se <3 NMP/ mL.

Considera-se que é de extrema importância a assepsia durante o processo de ordenha para prevenir a contaminação das doenças.

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas foram condizentes com a legislação vigente.

REFERÊNCIAS

- BEHMER, Manuel Iecy Arruda. **Tecnologia do Leite**. 7. ed. São Paulo: Editora Nobel, 1977.
- BLACK, Jacquelyn.G.**Microbiologia Fundamentos e Perspectivas**. 4. ed. Tradução de Eiler Fritsch Toros, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1990.
- CORRÊA, Walter M; CORRÊA, Célia N.M. **Mamíferos Doméstico**. 2.ed. Botucatu: Editora Médica e Científica, 1992.
- CUNNINGHAN, James G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**.3.ed.Rio de Janeiro: EDITORA, Guanabara Koogan, 1985.
- FONSECA, Luis Fernando Laranja; SANTOS, Marcos Veiga dos Santos, **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Editora Lemos editorial, 2000.
- GUERREIRO, Milton G. **Bacteriologia Especial**. Porto Alegre: Editora Sulina,1984.
- HOBBS, Betty C. **Toxinfecção e Controle Higienico-Sanitáriode Alimentos**. 1. ed. Tradução de Silvia Panetta Nascimento, Marcelo Arruda Nascimento, São Paulo: Editora Valera, 1998.
- ORDONEZ, Juan A. **Tecnologia de alimentos**. Tradução de Fátima Murad, Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.
- OTTO, Bier. **Microbiologia e Imunologica**. 23.ed. São Paulo: Editora Melhoramento, 1984.
- PASTEUR, **Química nova na escola- Leite e Ensino de Química**.6.ed .São Paulo: Editor Nelson Orlando Beltran, 1997.
- PEIXOTO, Aristeu Mende. **Caracterização e Implementação de uma Política para o Leite**. Piracicaba: Editora FEALQ, 1985
- PELCZAR, Michael. J; CHAN, E.C.S; KRIEG, Noel. R. **Microbiologia Conceitos e Aplicações**. 2. ed. Tradução de Diane D. Edwards, São Paulo: Editora Makron Books, 1996.
- PELCZAR, Michael; REID, Roger; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. Tradução de Pereira, São Paulo: Editora Mcgraw-Hill do Brasil, 1981.
- PRATA, LUIS FRANCISCO, **Fundamentos de Ciência do Leite**. Jaboticabal: Editora FCAVJ/UNESP 2001.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C. **Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos - Manual Técnico nº 14**, Campinas: Editora ITAL, 1995.