

ALINE DA SILVA VIRGOLINO

INCIDÊNCIA DO *Bacillus cereus* NO LEITE UHT

ALINE DA SILVA VIRGOLINO

INCIDÊNCIA DE *Bacillus cereus* NO LEITE UHT

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

Orientador: Elaine Amorim Soares Menegon
Área de Concentração: Química de Alimentos

Assis
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

VIRGOLINO, Aline da Silva

Incidência de *Bacillus cereus* no leite UHT / Aline da Silva Virgolino. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2011.

60p.

Orientador: Elaine Amorim Soares Menegon.

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

1. Leite UHT. 2. *Bacillus cereus*.

CDD: 660
Biblioteca da FEMA

INCIDÊNCIA DE *Bacillus cereus* NO LEITE UHT

ALINE DA SILVA VIRGOLINO

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:

Orientador: Elaine Amorim Soares Menegon

Analisador: Rosângela Aguilár da Silva

Assis
2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que
sempre estiveram ao meu lado e me amaram
sem exigir nada em troca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar a oportunidade de vida e me guiar pelos caminhos que nela passei e por me dar força para superar mais esta jornada.

Aos meus pais Elza e Osvaldo e ao meu irmão Danilo, pessoas que tanto amo.

Ao meu namorado Alexandro, uma pessoa muito especial em minha vida, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos me apoiando, ajudando e incentivando.

À Prof^a. Ms. Elaine Amorim Soares Menegon, pela orientação e pelo constante estímulo transmitido durante o trabalho.

As amigas que conquistei principalmente a Aline Clarinda Correa e Letícia Carvalho Araújo que além de conquistar através do curso sempre estiveram ao meu lado e que fazem parte da minha vida e a todos que colaboraram direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais volta ao seu tamanho
original.”

Albert Einstein

RESUMO

Este trabalho descreve a incidência de *Bacillus cereus* no leite UHT utilizando duas metodologias: o teste de incubação para detectar a presença de micro-organismos segundo a Resolução 12 do Ministério da Saúde e a enumeração de *Bacillus cereus* conforme IN 62 de 26/08/2003 da Secretaria de Defesa Agropecuária. Estes dois procedimentos visam verificar a eficiência do processo do leite UHT. A determinação foi realizada em cinco marcas diferentes de leite consumido na cidade de Assis. Foram coletadas duas amostras de cada marca do mesmo lote, uma foi realizado leitura do pH antes da incubação e a outra foi para incubação durante sete dias a 37 °C. Após incubação foi feito leitura de pH e o leite foi plaqueado conforme metodologia em duplicata. Os resultados obtidos nas duas metodologias indicaram a ausência de micro-organismos. No ensino médio a aplicação da determinação de conservantes e reconstituintes do leite é mais viável, devido ser simples com soluções, reagentes e vidrarias de fácil acesso e por obter resultados rápidos para um período normal de aula.

Palavras-chave: Leite UHT, *Bacillus cerus*.

ABSTRACT

This work describes the incidence of *Bacillus cereus* in UHT milk using two methods: incubation of the test to detect the presence of micro-organisms in accordance with Resolution 12 of the Ministry of Health and enumeration of *Bacillus cereus* as of 26/08/2003 62 of IN Secretariat of Agricultural Protection. These two procedures are intended to verify the efficiency of the process of UHT milk. The determination was performed in five different brands of milk consumed in the city of Assisi. We collected two samples of each brand of the same batch, a pH reading was performed before incubation and the other was to incubate for seven days at 37 °C. After incubation pH reading was done and the milk was plated in duplicate according to the methodology. The results obtained from both methods indicated the absence of micro-organisms. In high school the application of restorative and determination of preservatives in milk is more feasible, due to be simple solutions, reagents and glassware for easy access and quick results for a normal class period.

Keywords: UHT milk, *Bacillus cerus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Composição do leite.....	17
Figura 2	– Micela de Caseína.....	19
Figura 3	– Estrutura Química do ácido linoleico.....	20
Figura 4	– Estrutura Química do ácido butírico.....	20
Figura 5	– Estrutura Química da lactose e sua hidrólise.....	21
Figura 6	– Estrutura Química da vitamina A.....	22
Figura 7	– Estrutura Química da vitamina B1.....	22
Figura 8	– Estrutura Química da vitamina B2.....	23
Figura 9	– Estrutura Química da vitamina B4.....	23
Figura 10	– Estrutura Química da vitamina B6.....	23
Figura 11	– Estrutura Química da vitamina B12.....	24
Figura 12	– Estrutura Química da vitamina C.....	24
Figura 13	– Estrutura Química da vitamina D.....	24
Figura 14	– Estrutura Química da vitamina E.....	25
Figura 15	– Estrutura Química da vitamina K.....	25
Figura 16	– Fluxograma das operações unitárias associadas ao benefício do leite.....	34
Figura 17	– Tipos de bactérias.....	38
Figura 18	– PHmetro.....	40
Figura 19	– Estufa.....	40
Figura 20	– Caixas de leite após incubação.....	50
Figura 21	– Fluxo laminar TROX série 1341.....	51
Figura 22A	– Amostra antes do período de armazenamento em estufa.....	51

Figura 22B – Amostra após período de armazenamento em estufa..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Quantidade de aminoácidos essenciais presentes no leite.....	18
Tabela 2	- Porcentagem de elementos minerais no leite.....	26
Tabela 3	- Composição do leite humano.....	28
Tabela 4	- Composição do leite bovino.....	29
Tabela 5	- Requisitos para o leite segundo a legislação.....	35
Tabela 6	- Tabela relação do pH do leite antes e depois período de incubação de 7 dias a 37 °C.....	50

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	LEITE.....	17
2.2	NUTRIENTES DO LEITE	18
2.2.1	Proteínas.....	18
2.2.2	Gorduras.....	19
2.2.3	Carboidratos.....	20
2.2.4	Vitaminas	21
2.2.5	Sais Minerais.....	25
2.3	IMPORTÂNCIAS ECONÔMICAS.....	26
2.4	IMPORTÂNCIA NAS FASES DA VIDA.....	27
2.4.1	Crianças até 6 meses de idade.....	27
2.4.2	Crianças após 6 meses de idade.....	28
2.4.3	Adolescentes.....	29
2.4.4	Adultos.....	30
2.4.5	Mulheres pós menopausa.....	30
2.4.6	Idosos.....	30
2.5	TIPOS DE LEITE	30
2.5.1	Leite Pasteurizado.....	31
2.5.1.1	Leite tipo A.....	31
2.5.1.2	Leite tipo B.....	32
2.5.1.3	Leite tipo C.....	32
2.5.2	Leite UHT.....	32
2.5.3	Leite Esterilizado.....	33
2.6	LEITE UHT (UAT).....	33
2.7	MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DO LEITE.....	37
2.8	INCIDÊNCIA DE <i>Bacillus cereus</i> NO LEITE.....	40
2.8.1	Contaminação Pelo Ambiente, Animal e Ordenha.....	41

2.8.2	Contaminação Durante Processo de Pasteurização, Armazenagem e Transporte.....	41
2.8.3	Contaminação pelo <i>Bacillus cereus</i>	42
2.8.4	Controle e Medidas para Evitar o <i>Bacillus cereus</i>	42
3.	APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO.....	43
3.1	RECONSTITUINTES E CONSERVANTES EM LEITE.....	44
3.2	PARTE EXPERIMENTAL.....	44
3.2.1	Cloretos.....	44
3.2.1.1	Fundamento.....	44
3.2.1.2	Soluções e Reagentes.....	45
3.2.1.3	Vidrarias e Utensílios.....	45
3.2.1.4	Procedimento.....	45
3.2.1.5	Resultado.....	45
3.2.2	Hipocloritos.....	45
3.2.2.1	Fundamento.....	45
3.2.2.2	Soluções e Reagentes.....	46
3.2.2.3	Vidrarias e Utensílios.....	46
3.2.2.4	Procedimento.....	46
3.2.2.5	Resultado.....	46
4.	METODOLOGIA.....	47
4.1	MATERIAIS.....	47
4.1.1	Amostras.....	47
4.1.2	Equipamentos.....	47
4.1.3	Soluções e Reagentes.....	47
4.2	MÉTODOS.....	48
4.2.1	Amostragem.....	48
4.2.2	Determinação de <i>Bacillus cereus</i>.....	48
4.2.2.1	Plaquetamento.....	48
4.2.3	Incubação para Teste de Esterilidade.....	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
6.	CONCLUSÃO.....	53

7.	REFERÊNCIAS	54
-----------	--------------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

O leite é utilizado pelo homem desde a antiguidade como alimento (FERRAZ, MACHADO; 2001). Contêm diversos nutrientes e proteína de alta qualidade que auxilia na preservação de músculos e construção de tecidos; as vitaminas protegem os olhos, combate anemia, etc. É um alimento essencial em todas as fases da vida (LAY-ANG, 2010). Rico em cálcio o que auxilia na prevenção da osteoporose (ABLV, 2008).

Além dos diversos benefícios dos nutrientes existentes no leite também tem em sua gordura, ácido linoléico, ácido butírico que também são muito benéficos para a saúde (MEIRELES; ALVES, 2009).

Tendo grande importância como alimento o leite também tem sua importância com relevante papel social, inclusive na geração de empregos. Está entre os seis produtos mais importantes na agropecuária brasileira, tendo perspectiva de contínuo crescimento nos próximos anos (VILELA, 2003).

O leite é composto por 87% de água, 3,5% de proteínas, com o mínimo de 3% de gordura, 4% de lactose, é rico em sais minerais e vitaminas, tendo pH entre 6,5 a 6,8 (MASSAGER, 2007).

Existem diversos tipos de leite no Brasil, os pasteurizados que são denominados por A, B ou C; os leites longa vida ou UHT que são aquecidos com temperaturas maiores que os pasteurizados, que são os integrais, semi desnatados, desnatados; o leite em pó que é obtido através da desidratação, entre outros (CAMPOS, 2003).

O leite longa vida ou UHT, a sigla UHT significa Ultra High temperature (Temperatura Ultra Alta), é obtido através de um processo térmico que aquece o leite em alta temperatura seguido por um brusco arrefecimento até 20 °C, visando a eliminação de micro-organismos e aumento da vida de prateleira (ALVES, 2010, BRITO; *et al.*,2007).

O consumo de leite UHT aumentou consideravelmente durante a última década (MASSAGER, 2007).

O processo do leite longa vida acaba afetando algumas vitaminas, porém diversos alimentos quando aquecidos perdem suas propriedades originais, o que não deixa de ser eficientes (ANGELIS, 1995).

A pasteurização no Brasil é obrigatória para todos os tipos de leite e seus derivados devem ser produzidos a partir do leite pasteurizado (PORTO, 2007).

A qualidade do leite depende muito da matéria-prima que pode ser verificada pela constituição físico-química do leite, densidade, acidez, análises de tendência de coagulação, testes para avaliar atividade de bactérias etc (VIEIRA; *et al.*,2005).

Alguns *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus* causam alterações no sabor e aroma do leite. O *Bacillus cereus* é um bacilo gram-positivo, aeróbico, formador de esporos e é muito encontrado em leite. Sua contagem mínima para causar enfermidade é entre 10^5 e 10^7 células/g. (MORAES, 2010) Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* podem resistir ao processo longa vida (PORTO, 2007).

Quanto maior a precariedade na higienização da cadeia produtiva do leite a incidência de *Bacillus cereus* é maior. Para reduzir o alto índice de *Bacillus* é necessário a redução nas temperaturas adequadas após o tratamento térmico, utilização de matéria-prima de qualidade, ajuste do pH, e a correta realização dos procedimentos industriais (WATANUKI; GALLO, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência de *Bacillus cereus* no leite UHT consumido na cidade de Assis-SP

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE

O consumo de leite é utilizado desde a antiguidade e possui uma taxa constante de crescimento bem como seus derivados (FERRAZ; MACHADO, 2001).

Após constatar os benefícios deste alimento, além do consumo por crianças, ocorreu o aumento do consumo por adultos (FERRAZ; MACHADO, 2001).

O leite tem função de nutrir e é secretado pelos mamíferos, assim, é importante fonte para a ingestão e para a saúde nas diferentes fases da vida (LAY-ANG, 2010). Contém os nutrientes adequados aos indivíduos como, proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas, sais minerais e fibras (Figura 1) (ABLV, 2008).

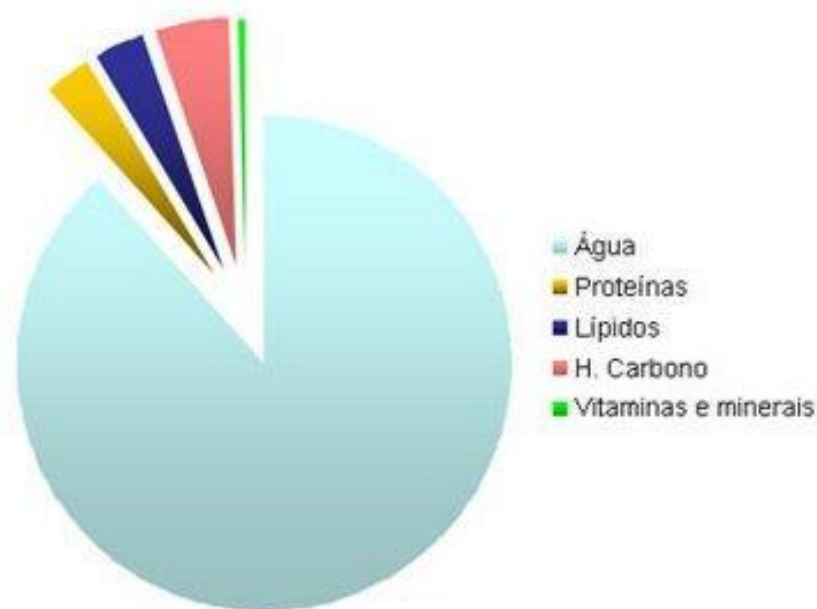


Figura 1. Composição do leite. (In: <http://cr-saude.blogspot.com>)

2.2 NUTRIENTES DO LEITE

2.2.1 Proteínas

A proteína do leite, a caseína tem teor alto de aminoácidos essenciais, tem importância no crescimento e manutenção do corpo humano. São encontrados dezoito tipos de aminoácidos no leite (ABLV, 2008), inclusive aqueles que o organismo não consegue sintetizar, ou seja, os aminoácidos essenciais (DAYRELL, 2011). Proteínas atuam no sistema imunológico e participam de quase todos os processos biológicos, sendo fundamental na ingestão (ABLV, 2008).

A tabela 1 mostra a quantidade de aminoácidos essenciais presentes no leite.

Aminoácidos essenciais	Necessidade do Adulto (mg/dia)	mg de aminoácidos/100g de leite
Fenilalanina	2200	140-228
Histidina	-	59-110
Isoleucina	1400	167-240
Leucina	1200	312-490
Lisina	1600	184-338
Metionina	2200	70-140
Treonina	1000	136-176
Triptofano	500	43-70
Valina	1600	171-278

Tabela 1. Quantidade de aminoácidos essenciais presentes no leite.
(In: <http://pt.scribd.com/doc/51836010/12>)

Na Figura 2 é apresentada uma micela de caseína, a principal proteína do leite.

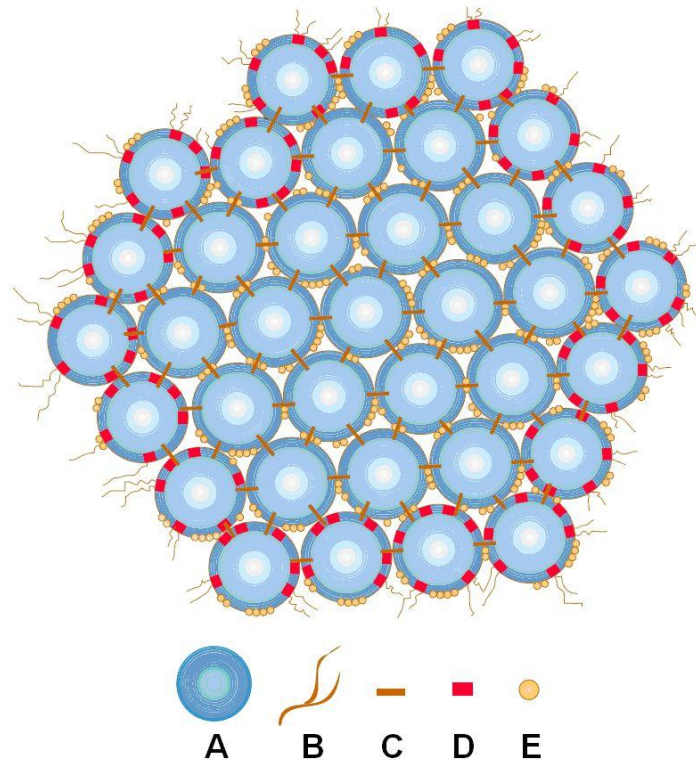


Figura 2. Micela de Caseína (A: sub micela, B: cadeias proteicas, C: fosfato de cálcio, D: kappa casein, E: grupos fosfato). (In: www.food-info.net)

2.2.2 Gorduras

As gorduras do leite são fonte de energia e possui ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis. A gordura do leite dos bovinos contém dois ácidos graxos importantes na saúde humana com efeitos benéficos os quais são ácidos linoleicos conjugados (Figura 3) e o ácido butírico (Figura 4) (MEIRELES; ALVES, 2009).

O ácido linoléico conjugado (cis-9, trans-11ácido linoléico-C18:2, CLA) é uma mistura de isômeros posicionais e geométricos, associado as atividades anticarcinogênica, antiartrogênica. Já o ácido butírico (C4:0) é exclusivo do leite dos animais ruminantes, induz diferenciação e inibe diversas linhagens de células cancerígenas (MEIRELES; ALVES, 2009).

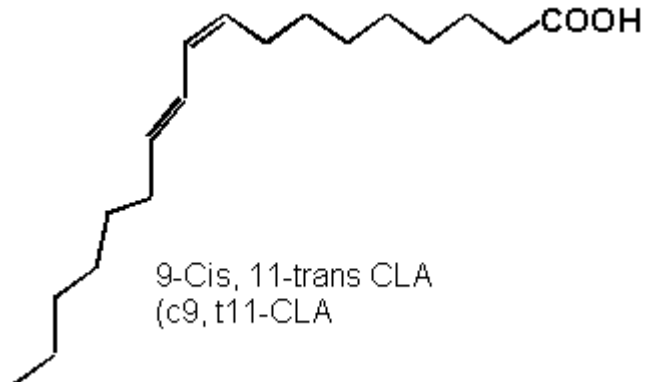


Figura 3. Ácido linoleico.
(In: <http://www.scielo.org>)

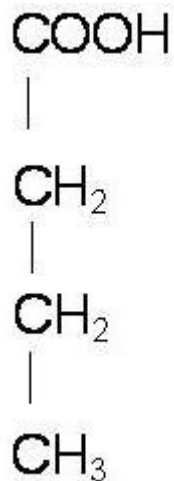


Figura 4. Ácido butírico. (In: <http://www.lookfordiagnosis>)

2.2.3 Carboidratos

O carboidrato do leite é a lactose, que é um dissacarídeo ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$). A quebra através da hidrólise gera a galactose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (SERPA, 2010).

A lactose representa cerca de 2 a 8% da parte sólida do leite, com a quebra deste carboidrato em monossacarídeos ocorre o melhor aproveitamento pelo organismo. (KAUFMAN, 2005) A lactose também previne doenças bem como auxilia na queima de gorduras e ajuda a fornecer energia para as células (SERPA, 2010).

A Figura 5 mostra a quebra da lactose em galactose e glicose. Pertence a série de dissacarídeos ligados em β , porque somente é hidrolisada por β -galactose (BOBBIO & BOBBIO. P50).

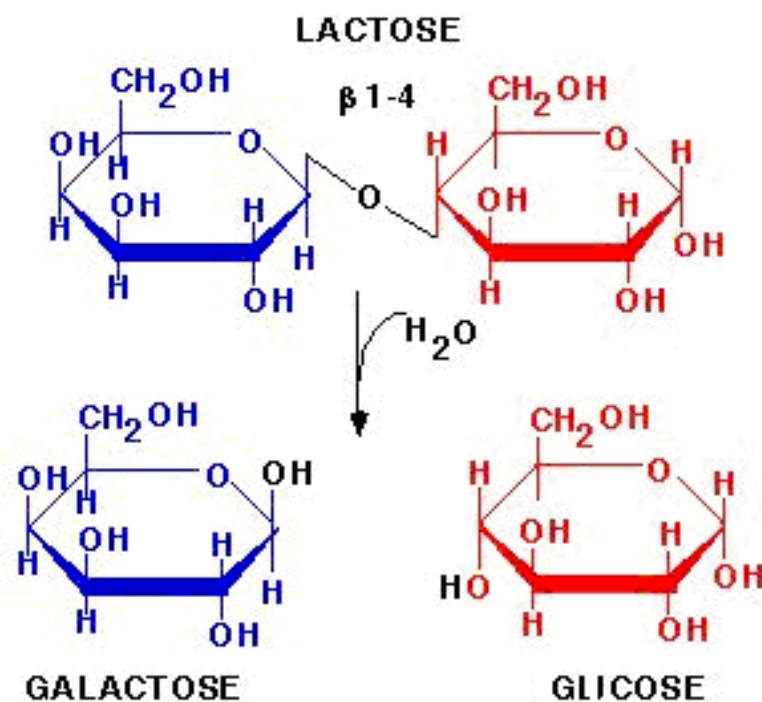


Figura 5. Lactose e sua hidrólise. (In: <http://gastropedinutri.blogspot.com>)

2.2.4 Vitaminas

Estão presentes no leite diversos tipos de vitaminas que são necessários ao organismo. No leite encontram-se as vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, e as hidrossolúveis B1, B2, B4, B6, B12 e C (GUERREIRO, 2007).

A vitamina A (Figura 6) tem função de crescimento, visão e integridade da pele. Vitamina B1 (Figura 7) auxilia a musculatura e protege o sistema nervoso. Vitamina B2 (Figura 8) protege os olhos e a pele, auxilia na digestão de carboidratos e proteínas. A vitamina B4 (figura 9) participa na respiração celular, síntese das proteínas. Vitamina B6 (Figura 10) auxilia no metabolismo de proteínas e carboidratos. Vitamina B12 (Figura 11) auxilia o bom funcionamento das células da medula óssea, do sistema nervoso e do trato intestinal. Vitamina C (Figura 12) auxilia cicatrizações, importante para a formação de colágeno e ossos e melhora a absorção do ferro. Vitamina D (Figura 13) age como hormônio na regulação do cálcio nos ossos. Vitamina E (Figura 14) é um antioxidante que previne o desenvolvimento de câncer e envelhecimento precoce das células. E por ultimo a vitamina K (Figura 15) atua na coagulação do sangue (MARTINS, 2010).

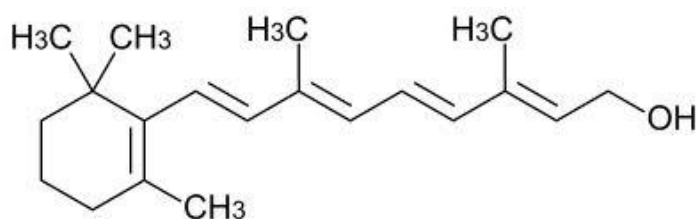


Figura 6. Vitamina A. (In: <http://www.entrenalinea.com.br>)



Figura 7. Vitamina B. (In: <http://www.infoescola.com>)

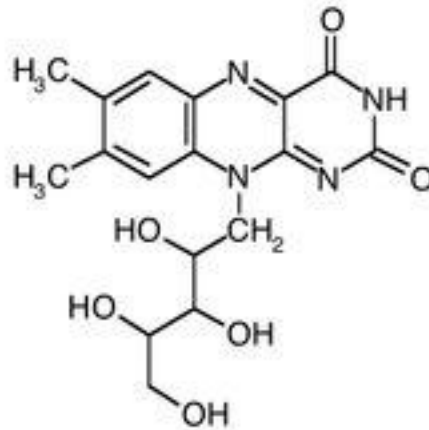


Figura 8. Vitamina B2. (In: <http://www.infoescola.com>)

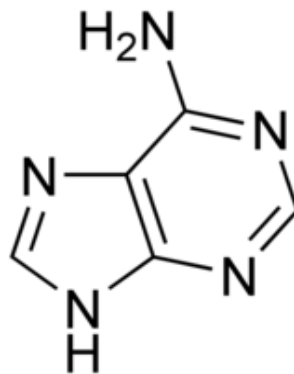


Figura 9. Vitamina B4. (In: <http://www.portalsaofrancisco.com.br>)

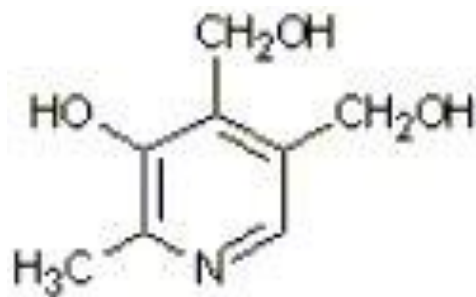


Figura 10. Vitamina B6. (In: <http://www.infoescola.com>)

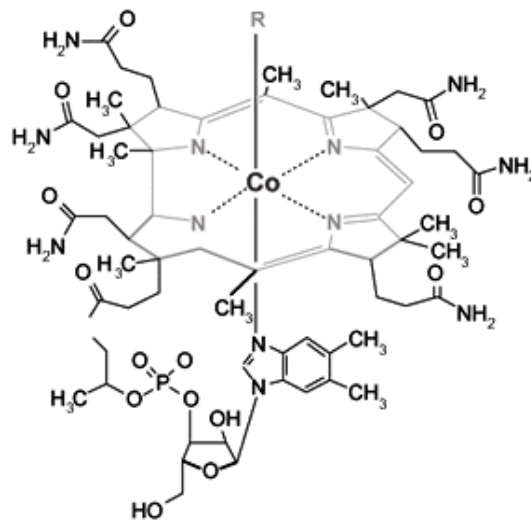


Figura 11. Vitamina B12. (In: <http://www.scielo.br>)

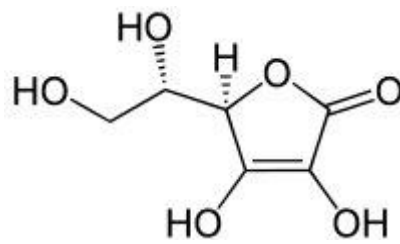


Figura 12. Vitamina C. (In: <http://www.infoescola.com>)

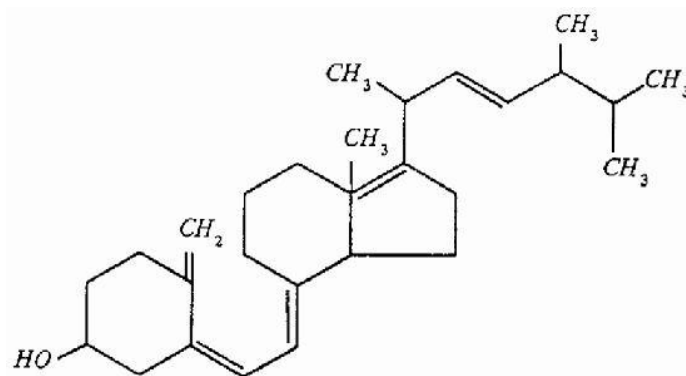


Figura 13. Vitamina D. (In: <http://www.infoescola.com>)

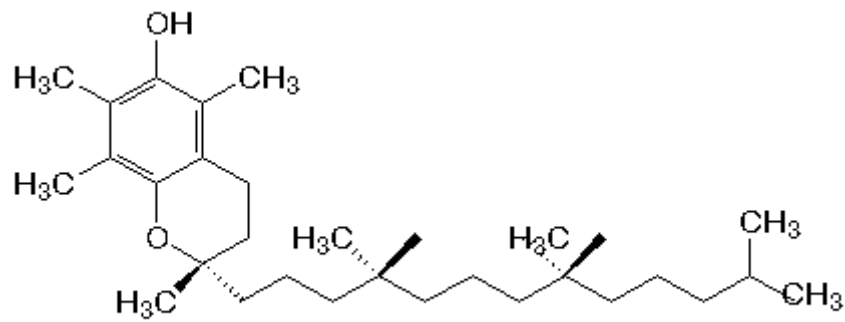


Figura 14. Vitamina E. (In: <http://www.infoescola.com>)

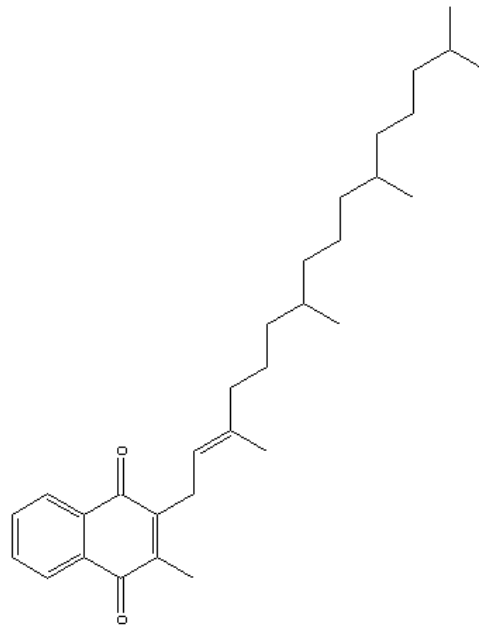


Figura 15. Vitamina K.
(In: <http://dc305.4shared.com/doc/s71Bz7gU/preview.html>)

2.2.5 Sais Minerais

Os sais minerais não são sintetizados pelo organismo, havendo a necessidade do seu consumo (STELLA, 2003). Mesmo não fornecendo energia tem funções importantes no organismo (OLIVEIRA, 2010).

Os sais minerais são divididos em macro minerais ou micro minerais. Os macros minerais são cálcio (Ca), enxofre (S), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K) e sódio (Na). Os micro minerais são cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), flúor (F), iodo (I), manganês (Mn), molibdênio (Mo), selênio (Se) e zinco (Zn). Existem também sais minerais considerados tóxicos (STELLA, 2003).

O leite tem importantes sais minerais. Nele encontra-se principalmente citratos, fosfatos, cálcio, carbonato de sódio, potássio e magnésio (LEITE, 2011).

O principal constituinte da massa óssea é o cálcio e o leite é rico em cálcio, sendo um grande aliado na prevenção da osteoporose (ABLV, 2008).

A Tabela 2 mostra a quantidade dos minerais presentes no leite.

Elemento	%
Cálcio	0,13
Fósforo	0,1
Potássio	0,15
Magnésio	0,012
Cloro	0,1
Sódio	0,05
Cobre	2E-05
Ferro	5E-05
Enxofre	0,03

Tabela 2. Porcentagem de elementos minerais no leite.
(In: <http://pt.scribd.com/doc/51836010/12>)

2.3 IMPORTÂNCIAS ECONÔMICAS

O Brasil ocupa a quinta posição mundial como produtor de leite, sendo que o crescimento anual de 4%, responde a um volume de 66% do leite produzido nos países que compõem o MERCOSUL (VILELA, 2003).

O leite está entre os seis mais importantes produtos da agropecuária brasileira, tem importante papel no suprimento de alimento e importância social com a geração de

emprego e renda para a população. Fica a frente do café e do arroz que são produtos tradicionais da agropecuária. Seu valor bruto de produção é superado apenas pelo valor da produção de carne bovina (VILELA, 2003).

O leite beneficiou abertura de novas fronteiras, avanço da tecnologia para melhorar sua eficiência e qualidade, além do melhoramento genético, alimentício e saúde dos animais. A expectativa para os próximos anos é o contínuo crescimento (VILELA, 2003).

O Brasil obteve um crescimento na produção de leite nas últimas décadas. O volume de leite produzido chegou à média de 29 mil litros de leite produzido em 2009, com previsão de aumento (EMBRAPA, 2011).

O estado de São Paulo é o sexto na produção de leite brasileiro, (EMBRAPA, 2011) e o maior consumidor de leite do Brasil, com 27,2% de consumo domiciliar (ROSOLEN, 2010).

2.4 IMPORTÂNCIAS NAS FASES DA VIDA

2.4.1 Crianças até os 6 meses de idade

Até os 6 meses de vida a criança deve ser alimentada apenas com o leite materno (GARNI; ALVES, 2008), pois este tem proporções de nutrientes adequados para o bebê, possui proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas, minerais e diversas substâncias protetoras. O leite materno garante o desenvolvimento e crescimento perfeito da criança, além de ser um alimento que possui defesa contra doenças infecciosas (BRANCO, 2007).

A Tabela 3 mostra a composição do leite humano.

Composição	Leite Humano
Gorduras Total (g/100 mL)	4,2
Ácidos graxos de até 8 carbonos (%)	-
Ácidos graxos poliinsaturados (%)	14
Proteínas (g/100 mL) Total	1,1
Caseína	0,3
α -lactoalbumina	0,3
Lactoferrina	0,2
Ig A	0,1
Ig G	0,001
Lisozima	0,05
Albumina sérica	0,05
β -lactoglobulina	-
Carboidratos (g/100 mL) lactose	7
Oligossacarídeos	0,5
Minerais (g/100 mL)	
cálcio	0,03
fósforo	0,014
sódio	0,015
potássio	0,055

Tabela 3. Composição do leite humano. (In: <http://www.scielo.br>)

2.4.2 Crianças após 6 meses de idade

Após os 6 meses a criança pode receber o leite de vaca que contém os nutrientes necessários para o desenvolvimento (SARNI; ALVES, 2008), além de ser rico em cálcio, nutriente essencial para a formação de dentes e ossos (COLLIS, 2011).

É recomendado diariamente a ingestão de 3 a 4 copos de leite para suprir as necessidades desta fase (BRANCO, 2007).

A Tabela 4 mostra a composição nutricional do leite bovino.

Composição	Leite Bovino
Gorduras	
Total (g/100 mL)	3,8
Ácidos graxos de até 8 carbonos (%)	6
Ácidos graxos poliinsaturados (%)	3
Proteínas (g/100 mL)	
Total	3,3
Caseína	2,5
α -lactoalbumina	0,1
Lactoferrina	-
Ig A	0,003
Ig G	0,06
Lisozima	-
Albumina sérica	0,03
β -lactoglobulina	0,3
Carboidratos (g/100 mL)	
lactose	4,8
Oligossacarídeos	0,005
Minerais (g/100 mL)	
cálcio	0,125
fósforo	0,093
sódio	0,047
potássio	0,155

Tabela 4. Composição do leite bovino. (In: <http://www.scielo.br>)

2.4.3 Adolescentes

Nesta fase é necessária uma ingestão de cálcio maior, já que neste período o crescimento é muito rápido (BRANCO, 2007), além da prevenção da osteoporose na fase adulta (GRIGOLETTO, 2011).

É recomendado diariamente a ingestão de 4 a 5 copos de leite para suprir as necessidades desta fase (BRANCO, 2007).

2.4.4 Adultos

A formação da massa óssea chega ao ponto máximo nesta fase. (BRANCO, 2007) A ingestão de cálcio deve ser continua para prevenir e ou diminuir a possibilidade do desenvolvimento da osteoporose (COLLIS, 2011).

É recomendado diariamente a ingestão de 4 copos de leite para suprir as necessidades desta fase (BRANCO, 2007).

2.4.5 Mulheres pós menopausa

A estrutura óssea nessa fase é mais frágil, pois o cálcio sai facilmente do osso, tendo maior possibilidade de desenvolver a osteoporose. É recomendado diariamente 5 copos de leite para as mulheres que não fazem reposição hormonal e 4 copos de leite para as mulheres que fazem a reposição hormonal (BRANCO, 2007).

2.4.6 Idosos

Nesta fase os idosos com mais de 65 anos de idade precisam de uma elevada dose de cálcio. É recomendado o consumo diário de 6 copos de leite desnatado ou com baixo teor de lactose, pois o leite normal pode causar incômodos gastrintestinais (COLLIS, 2011).

2.5 TIPOS DE LEITE

No Brasil é obrigatório o processo de pasteurização do leite, bem como todos os seus derivados devem ser fabricados a partir do leite pasteurizado (PORTO, 2007).

O processo de pasteurização recebeu este nome em homenagem ao seu criador Louis Pasteur, e consiste no aquecimento para a eliminação de micro-organismos patogênicos (ARROIO, 2006).

A qualidade do leite é muito importante para os produtores e a indústria dependendo de diversos fatores que podem variar desde a alimentação do animal até a sua obtenção. Por isso são realizados diversos testes no leite para verificar sua qualidade antes e depois de seu tratamento térmico (VIEIRA; *et al.*, 2005).

Nos processos térmicos obtém-se leite pasteurizado, leite longa vida e o leite esterilizado que não tem uso comercial no Brasil (PORTO, 2007).

2.5.1 Leite Pasteurizado

O processo térmico para o leite pasteurizado pode ser feito por dois processos, o lento e o rápido. A pasteurização lenta consiste no aquecimento de 62-63 °C mantendo por 30-35 minutos e com brusco resfriamento posterior. A pasteurização rápida ou HTST-Hight temperature short time (tempo curto com alta temperatura) consiste em aquecer o leite a 72 °C mantendo por 15 segundos em equipamentos com trocador de calor de placas e depois com choque térmico (MARQUES, 2006).

A pasteurização mais utilizada hoje em dia é a HTST, pois a tradicional ou lenta além de ser um processo descontínuo é demorada, com alto consumo de energia e tem redução de 95% das bactérias; já o processo rápido ou HTST é contínuo, com eficiência de 99,5% na redução das bactérias e ideal para grande volume de leite (PORTO, 2007).

2.5.1.1 Leite tipo A

Um tipo de leite de excelente qualidade, onde não há o contato manual nas fases do processo, além de não poder ser transportado cru, o que acarreta a necessidade de pasteurização e envase no local da ordenha. A ordenha é mecânica e o leite vai diretamente para a pasteurização através de tubos, em seguida homogeneização e

envase. A quantidade de bactérias mesófilas totais permitidas para este tipo de leite é de 500/mL (LEWINSK, 2009).

2.5.1.2 Leite tipo B

De boa qualidade, a ordenha pode ser feita manual ou mecanizada. A pasteurização é feita fora do local da ordenha, em laticínios. O leite após a ordenha deve ser refrigerado com temperatura igual ou inferior a 4 °C por até 48 horas, e seu transporte é feito em tanques. A quantidade de bactérias mesófilas totais permitidas para este tipo de leite é de 40.000/mL (LEWINSK, 2009).

2.5.1.3 Leite tipo C

Um leite de baixa qualidade, pois não é refrigerado até a entrega no laticínio. É transportado em temperatura ambiente e pode ser entregue até as 10h do dia de sua ordenha para somente depois ser processado, fazendo com que se eleve o número de bactérias. A quantidade de bactérias mesófilas totais permitidas para este tipo de leite é de 100.000/mL (LEWINSK, 2009).

2.5.2 Leite UHT

O leite UHT é aquele onde o leite homogeneizado é submetido a uma temperatura entre 130 e 150 °C durante 2 a 4 segundos em fluxo contínuo e depois é resfriado a temperatura inferior a 32 °C com envase asséptico em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (ALVES, 2010).

2.5.3 Leite Esterilizado

O leite esterilizado é obtido utilizando-se temperatura de 120 °C por 10 minutos. Este processo elimina todas as formas de micro-organismos, inclusive os esporulados, porém esse processo carameliza o leite e o torna escuro. No Brasil este tipo de leite não tem uso comercial (PORTO, 2007).

2.6. LEITE UHT (UAT)

O leite UHT nada mais é que o leite processado em Ultra High Temperature (Ultra Alta Temperatura, UAT) ou é denominado também como leite longa vida por possuir longa vida de prateleira após seu processo térmico (ALVES, 2010, BRITO; *et al.*, 2007).

A Figura 16 mostra o fluxograma das operações unitárias do leite.

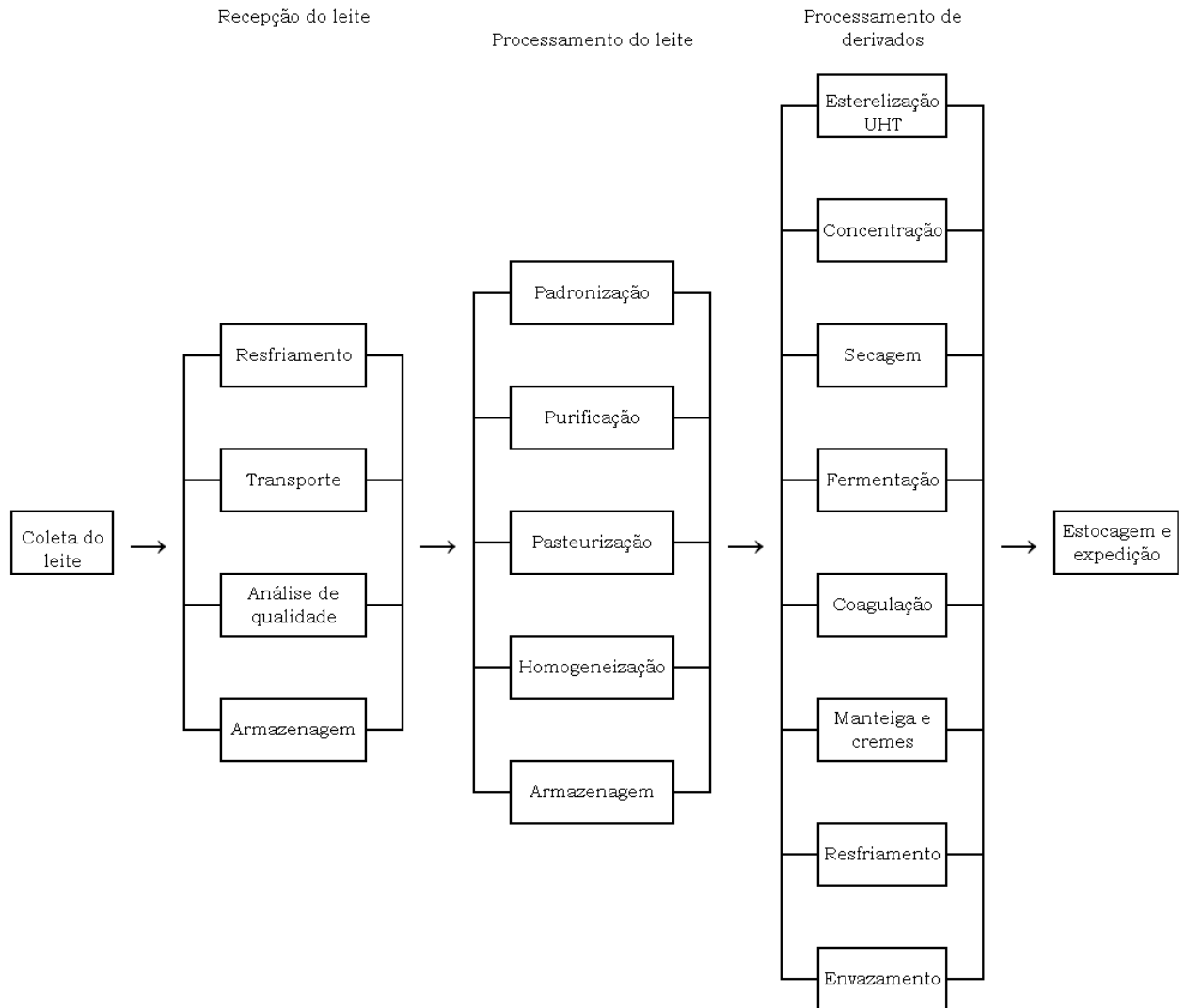


Figura 16. Fluxograma das operações unitárias associadas ao benefício do leite. (In: UFES – Universidade federal do Espírito Santo, boletim técnico - PIE – UFES: 02207)

Segundo a portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997 o leite UHT é o leite homogeneizado que durante 2 a 4 segundos se submeteu a uma temperatura alta entre 130 °C a 150 °C, em um processo contínuo e resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C, e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. Ainda segundo esta portaria o leite UHT pode ser classificado em integral, semi-desnatado ou parcialmente desnatado e desnatado (ABLV, 2008).

As características de cada tipo de leite estão descritas na Tabela 5:

REQUISITOS	LEITE INTEGRAL	LEITE SEMI OU PARCIALMENTE DESNATADO	LEITE DESNATADO
Matéria Gorda % (m / v)	Mínimo 3,0	0,6 á 2,9	Máximo de 0,5
Acidez g ac. Láctico/100mL	0,14 á 0,18	0,14 á 0,18	0,14 á 0,18
Estabilidade ao Etanol 68% (v / v)	Estável	Estável	Estável
Extrato Seco Desengordurado % (m / m)	Mínimo 8,2	Mínimo 8,3	Mínimo 8,4
Fonte: Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997			

Tabela 5. Requisitos para o leite segundo a legislação.

Os processos desde o início até seu envasamento consistem na ordenha, resfriamento, transporte, termização, desnatagem, normalização, homogeneização, ultra pasteurização, arrefecimento pós ultra pasteurização e envase. Os processos se iniciam com a ordenha na fazenda, que é a retirada da matéria-prima, nesta etapa é muito importante que tenha uma intensa higienização. Após a ordenha o leite deve ser arrefecido de 6 a 8 °C dependendo de seu tempo de recolha. O transporte deve ser feito em latões ou carros cisternas, que deve estar em temperatura abaixo de 10 °C. Na termização ocorre o aquecimento por um permutador de placas durante 15 segundos a 65 °C visando destruir a maior parte da carga microbiana. A desnatagem é feita duas vezes, na primeira ocorre a retirada das impurezas através de uma centrifuga, na segunda volta para a centrifuga e separa leite da nata. Na normalização o leite volta a ser misturado com a nata nas proporções de acordo com cada tipo de leite. A homogeneização distribui a gordura para que não haja formação de nata, melhorando a estabilidade e a consistência do leite (BRITO; *et al.*, 2007).

O processo de ultra pasteurização é o mais importante no processo de obtenção do leite, pois, elimina os micro-organismos que sobreviveram até esta etapa e aumenta a vida de prateleira para 4 a 5 meses em média. Neste processo é o choque térmico que destrói as bactérias (BRITO; *et al.*, 2007).

O processo UHT elimina todas as bactérias de forma vegetativas, mas algumas formas esporuladas sobrevivem ao processo térmico (PORTO, 2007).

Os gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são as bactérias esporuladas mais resistentes ao calor, sendo o *Bacillus cereus* uma das mais importantes na indústria de alimento, com a capacidade de produzir toxinas que causam toxinfecções alimentares (MARTINS; *et al.*, 2005).

Segundo a portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997 o leite UHT só pode conter como aditivos e coadjuvantes o citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio e trifosfato de sódio com quantidade não superior a 0,1 g/ 100mL separados ou em combinação. A função de pequena quantidade de citrato adicionada além da sua concentração natural no leite, é de estabilizar as proteínas do leite (ABLV, 2008).

O aditivo é um ingrediente que tem a finalidade de modificar as características físicas, químicas, biológicas durante a fabricação, processamento, etc. que são adicionados intencionalmente sem o propósito de nutrir o alimento (ANVISA, 2001).

Após processamento térmico o leite perde algumas de suas propriedades que faz com que possam ser adicionados alguns tipos de aditivos permitidos pela legislação. (MANTELLA, 2008)

O envase é feito em embalagem especial. A embalagem do leite longa vida é o Tetra Brik Asseptic ou o Tetra Pak que contém diversas camadas. As duas camadas internas são de polietileno que por ser inerte evita o contato com as demais camadas. A 3ª camada é feita de alumínio que evita a passagem de luz, oxigênio e micro-organismo. A 4ª camada é feita de polietileno fazendo a adesão do alumínio com a 5ª camada que é de papel. Esta embalagem é totalmente reciclável. Devido o leite ser de origem animal cabe ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento esta fiscalização (ABLV, 2008).

O envase é feito através de uma sobre pressão do ar estéril que é limitado pelo tubo da embalagem o que garante a assepsia do processo (BRITO; *et al.*, 2007).

O leite UHT tem dois tipos de processamento no mercado, o sistema direto e o sistema indireto (BARROS; *et al.*, 2007).

No processo direto, o leite á aproximadamente 4 °C é bombeado do tanque para o pré aquecimento de 75 °C a 85 °C no trocador de placas, com pressão de 4 bar. A pressão se eleva direcionando o leite para a válvula de injeção de vapor, onde a temperatura é elevada de 138 °C para 143 °C (a pressão de 4 bar evita a fervura do leite) e mantido por 5 segundos no retardador tubular. Logo após ocorre o resfriamento rapidamente em câmara de expansão com vácuo parcial mantida a bomba. O leite é resfriado a 20 °C em aparelho de placa ou tubular seguido para envase asséptico (BARROS; PANETTA, 2006).

No processo indireto o leite bombeado do tanque de armazenamento segue para o tanque de equilíbrio, seguindo para a seção de regeneração do trocador de calor a placa, onde acontece uma contracorrente do leite que está entrando para o processamento com o leite que está saindo do processamento, isso faz com que o leite que está entrando se aqueça a 75 °C e o que está saindo se resfrie. Após o pré aquecimento é homogeneizado com pressões de 180 a 200 bar, onde continua em direção á seção de aquecimento do trocador de placas, sendo aquecidos de 137 °C a 138 °C, passando por 4 segundos pelo retardador tubular. A conclusão do processo é dada pelo resfriamento regenerativo em 2 etapas: contra água fria do circuito de água quente e contra o produto que está entrando frio. O produto que sai do regenerador frio segue diretamente para o envase asséptico. Após o término é realizado a CIP (cleaned in place), uma limpeza que dura entre 70 e 90 minutos (BARROS; PANETTA, 2006).

2.7 MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES DO LEITE

Micro-organismos são seres vivos muito pequenos que não podem ser vistos a olho nu. Os micro-organismos são os vírus, bactérias, protozoários, muitas algas e fungos

microscópicos. Vivem no solo, na água, no ar, no interior de outros organismos em diversos climas (INDRIUNAS, 2007).

A Figura 17 demonstra os tipos de bactérias.

As bactérias são unicelulares, procariontes, reprodução assexuada e se apresentam em diversas formas: bastão (bacilos), esféricas ou arredondadas (cocos) e curvadas ou em forma de saca rolha (espirilos) (INDRIUNAS, 2007).

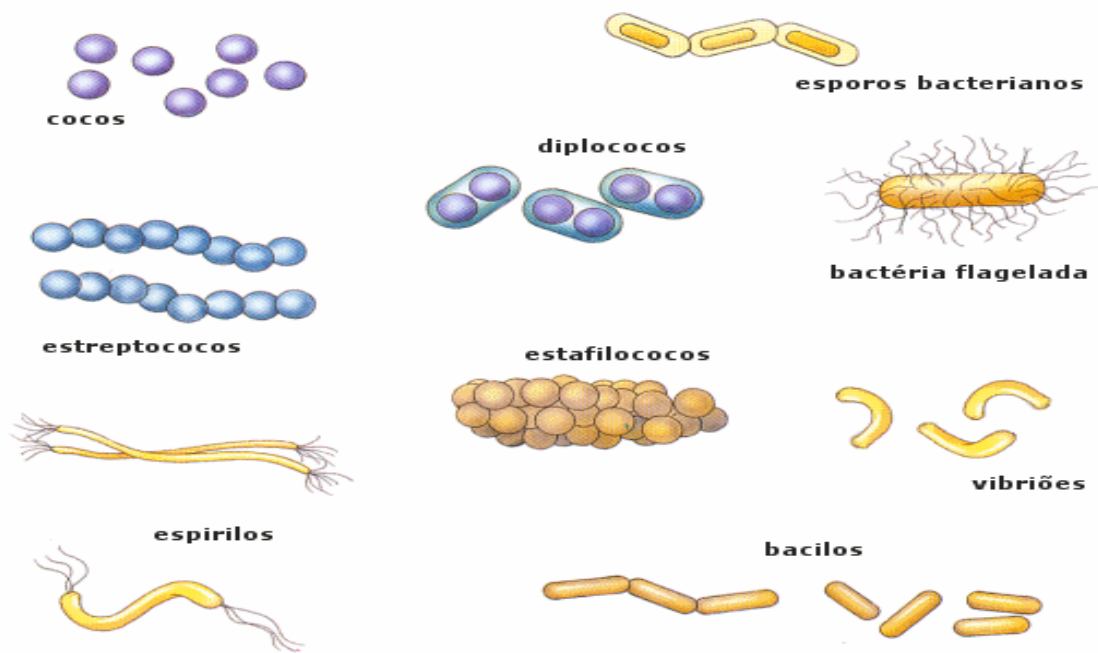


Figura 17. Tipos de bactérias. (In: <http://www.grupoescolar.com>)

Para a indústria alimentícia é necessário atentar para dois grupos de micro-organismos: os deteriorantes e os patogênicos. Os micro-organismos deteriorantes são aqueles que modificam as características físico-químicas dos alimentos e os “estragam”, impossibilitando o consumo; já os patogênicos não deterioram os alimentos, mas são responsáveis por transmitir doenças – DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos) (FERREIRA, 2008).

Os micro-organismos associados ao leite são gram-positivos: os cocos *S. aureus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* e os *Bacillos cereus* e

Clostridium, já os gram-negativos são os *Pseudomonas*, *Alicigenes*, *Flavobacterium* e *Enterobactérias* (PORTO, 1998).

O micro-organismo *S. aureus* provém das vacas mastíticas e podem se reproduzir e produzir toxinas durante a estocagem do leite. O *Micrococcus* libera aminoácidos facilitando as lácticas, os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* causam gosto amargo não provocando acidificação, o *Clostridium* produz ácido butírico e altera o leite, é encontrado no trato intestinal do homem e animais, forragens, etc (PORTO, 1998).

As enterobactérias são encontradas em material fecal, solo, vegetais, água, etc., algumas cepas com cápsulas produzem grande viscosidade no leite, os *Micrococcus* são encontrados no solo, água e pele de homens e animais. Os *Streptococcus* fermentam a glicose e se encontram na garganta, boca, intestino, trato respiratório, fezes, sangue, úbere de vacas com mastites, onde infecta o leite através de lesões na úbere podendo dar sabor de malte. Os *Leuconostocs* são heterofermentativos e produzem limo. O *Bacillus* provém de solos, ar, água, forragens, etc., produzem fosfolipase D, coagulando o leite dando aspecto cremoso (LEITE, 2011).

O *Bacillus cereus* é uma bactéria gram-positiva, flagelado, mesófilo, aeróbica, produtor de esporos termais e sua multiplicação ocorre com pH entre 4,3 a 9,3 e temperatura entre 10 a 48 °C (COSTA, 2009).

O *Bacillus cereus* por ser resistentes a altas temperaturas, pode estar presente no leite e pode causar intoxicação alimentar. Essa bactéria pode causar dois tipos de doença alimentar, a síndrome diarréica e a síndrome emética. No primeiro tem sintomas como náuseas, vômitos e cólicas abdominais, a segunda os sintomas são diarréia moderadas ou intensas e as cólicas abdominais. O grupo de risco é composto pelos idosos, grávidas, crianças e imunodeprimidos (MADIHA, 2011; ALMEIDA; *et al.*, 2010/2011).

Na síndrome diarréica a toxina é produzida no intestino delgado com período de incubação de 8h a 16h e os sintomas são náuseas, diarréias profunda e dores abdominais com duração dos sintomas de 12h a 24h (ALMEIDA; *et al.*, 2010/2011).

Na síndrome emética a toxina é pré formada no alimento com período de incubação de 30 min a 6h e os sintomas são náuseas e vômitos com duração de 6h a 24h (ALMEIDA; *et al.*, 2010/2011).

O mecanismo da toxina pré-formada emética é desconhecido. A enterotoxina HBL (enterotoxina hemolítica) causa secreção de fluidos intestinais, com mecanismo de formação de poros e ativação de enzimas adenilato ciclase (MEDIHA, 2011).

A contagem mínima de *Bacillus cereus* para causar enfermidade está entre 10^5 e 10^7 células/g (MORAES, 2010).

2.8 INCIDÊNCIAS DO *Bacillus cereus* NO LEITE

Devido a sua composição nutricional o leite oferece excelentes condições para a proliferação de micro-organismos (SALUSTIANO, 2007).

O leite UHT (UAT) é obtido a partir de temperaturas superiores a 130 °C. O processo de ultra pasteurização elimina bactérias de formas vegetativas, porém algumas formas esporuladas podem sobreviver ao processo (PORTO, 2007).

Os micro-organismos mesófilos e psicotróficos são os principais relacionados com a alteração do leite. O gênero *Bacillus* é termodurico e resiste ao tratamento de pasteurização (SALUSTIANO, 2007).

A contaminação do leite pode ocorrer em qualquer etapa de seu processo, desde o tratamento do animal (ZARCHENCO, 2000).

O *Bacillus cereus* é um desses micro-organismos que está diretamente relacionado com o leite, pois é mesófilo, formador de esporos, gram-positivo, aeróbico (COSTA, 2009).

O *Bacillus cereus* na indústria de laticínios é uma das maiores preocupações, pois podem causar alterações sensoriais e intoxicação alimentar (WATANUKI; GALLO, 2008).

Devido à resistência ao tratamento térmico o *Bacillus cereus* está presente no leite, sem contar na contaminação após o tratamento. As toxinas fabricadas por essa bactéria são classificadas em quatro grupos: hemossilinas (cereolisina e hemolisina II), enterotoxinas, toxina emética e a fosfolipase C (fosfatidilinositol hidrolase, fosfatidilcolina hidrolase e esfingomielinase) (LAGO; *et al.*, 2007).

A contaminação provém do animal e ordenha, durante seu processamento, armazenamento e transporte (VENTURINI; *et al.*,2007).

2.8.1 Contaminação pelo Ambiente, Animal e Ordenha

Durante o processo a grande maioria das fazendas leiteiras utiliza água sem tratamento algum, onde podem estar contaminadas por micro-organismos, onde quando utilizada na lavagem dos equipamentos para ordenha transmite o micro-organismo para o equipamento enviando-o ao processo. O solo é outra fonte de micro-organismo psicotróficos, onde o animal fica em contato (FONSECA; SANTOS, 2000).

São poucas as bactérias que se encontram nas tetas e úberes do animal, porém a vaca possui defesas contra esses micro-organismos. Quando ocorrem infecções na úbere o leite será contaminado, muitas vezes a contaminação pode ocorrer pela pele ou tetas de animais saudáveis. Os insetos são fontes ricas de infecções, o piso deve ser bem higienizado, pois também é uma fonte de micro-organismo (EBING; RUTGERS, 2006).

Independente da ordenha ser manual ou mecanizada, o leite entra em contato com baldes, tubulações que podem estar contaminados por micro-organismos. (FONSECA; SANTOS, 2000). Outra fonte de contaminação são as mãos do ordenhador (SILVA; *et al.*, 2011).

2.8.2 Contaminação Durante Processo de Pasteurização, Armazenagem e Transporte

Após a ordenha é necessário o tratamento o quanto antes para reduzir a proliferação dos micro-organismos, as bactérias psicrófila tem melhor crescimento na faixa de 0 a 10 °C, as mesófilas entre 20 a 40 °C e as termófilas entre 45 a 55 °C. A temperatura do leite na ordenha é ideal para as bactérias mesófilas, existem mais duas categorias, as psicotróficas e as termoduricas, onde a psicotrófica resiste a temperaturas baixas e as termoduricas a altas temperaturas. A medida adotada

após ordenha é a refrigeração imediata, a ineficiência ou refrigeração inadequada pode fazer com que ocorra o crescimento de micro-organismos (FONSECA; SANTOS, 2010).

Após a pasteurização a contaminação pode provir da deficiente limpeza de equipamentos para envase (FONSECA; SANTOS, 2010).

2.8.3 Contaminações pelo *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* por ser uma bactéria mesófila pode crescer no leite após a ordenha se não tiver um resfriamento eficiente e imediato. Esta bactéria é termodúricas e os esporos podem resistir ao processo longa vida, necessitando que tenha uma armazenagem adequada também para que não ocorra seu crescimento (PORTO, 2007).

2.8.4 Controle e Medidas para Evitar o Crescimento do *Bacillus cereus*

Para que não ocorra o crescimento do *B. cereus* é necessária a higiene do rebanho, das instalações que engloba o curral de espera dos animais, da sala de ordenha, sala de leite e sanitário, o equipamento da ordenha deve ser higienizado antes e depois, os equipamentos de refrigeração devem ser compatíveis com a frequência e o volume de leite produzido, o transporte realizado em temperatura adequada e os funcionários seguirem normas de higiene (TURCO; *et al.*, 2008).

3. APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO

A química faz parte da humanidade em todos os sentidos, no dia-a-dia, o qual torna necessário o entendimento deste universo tão extenso que faz parte do cotidiano e o transforma em uma educação que motiva o ensino (LUCA, 2007).

Segundo o Prof^o. Jorge Ricardo da UFPA as aulas praticas contribuem para a aprendizagem desde que sejam bem elaboradas e que os projetos desenvolvidos façam com que o aluno trabalhe a “mente e a mão”, fazendo com que realizem a prática e estimule o raciocínio (MACHADO, 2007).

No entanto o ensino de química ainda não é uma realidade próxima ao aluno (LUCA, 2007).

É necessário que o aluno entenda e veja a utilidade que o rodeia em sua vida, fazendo com que compreenda materiais, fenômenos, as substâncias que compõem o ar, a água, os tecidos, alimentos, etc. Em diversas formas é possível utilizar o cotidiano em sala de aula para o ensino, tornando a química mais interessante, com contextos práticos e discussões mais completas (LUCA, 2007).

A alimentação é um tema que pode ser estudado de formas diferentes em diversos anos do ensino e entre os alimentos está o leite (KINALSKI; ZANON, 1997).

O leite é rico em informações que podem ser aplicadas no ensino com aulas práticas. Devido sua composição ser muito rica, facilitando sua utilização na aprendizagem fazendo com que o aluno interaja com sua realidade e com um alimento muito presente na vida da maioria dos seres humanos.

Dentre os diversos estudos que podem ser feitos no leite, a fraude neste alimento é um dos assuntos que permite ao aluno além de verificar se o alimento foi fraudado, permite desenvolver conceitos químicos relacionados a seus constituintes.

Então, a atividade prática além de ensinar a química, ensina também o aluno desenvolver senso crítico e responsabilidade.

3.1 RECONSTITUINTES E CONSERVANTES EM LEITE

Os conservantes têm a finalidade de impedir ou retardar as alterações causadas por enzimas ou micro-organismos. No leite é adicionado para aumentar a vida útil de prateleira, uma condição considerada fraudulenta (G100, 2007).

O leite não precisa da adição de nenhum conservante, pois a ultra pasteurização, o envase asséptico, o processamento e a remoção do ar no envase nas embalagens Tetra Brik Asséptic garantem seu prazo de validade (LEITE, 2007).

Os reconstituintes são empregados no leite para mascarar a adição de água ou de soro de queijo no leite (G100, 2007).

Os cloretos servem ilicitamente como reconstituintes do leite fraudado com água, ou o seu teor de cloreto de sódio está aumentado devido a infecções na úbere ou durante a produção do colostro no animal (LEITE, 2011).

Os hipocloritos têm atividade biocida contra os micro-organismos e são considerados conservantes. O hipoclorito de sódio é utilizado como esterilizantes de superfície. A contaminação no leite pode ocorrer por fraude ou pelo problema de resíduos do processo de limpeza (Embrapa, 2008).

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Cloretos

3.2.1.1 Fundamento

Reação de nitrato de prata com cloretos e como indicador o cromato de potássio.

Quando o teor de cloretos é normal o nitrato de prata reage com o indicador produzindo coloração marrom e quando o teor de cloretos é elevado o consumo de prata é maior com intensidade menor de coloração.

3.2.1.2 Soluções e Reagentes

- nitrato de prata 10% (m/v) S.R.
- cromato de potássio 5% (m/v) S.R.

3.2.1.3 Vidrarias e Utensílios

- tubo de ensaio.
- pipeta graduada de 1 mL.
- suporte para tubos de ensaio.

3.2.1.4 Procedimento

- Em tubo de ensaio misturar, partes iguais (1mL) de leite, de nitrato de prata 10% (m/v) S.R. e de cromato de potássio 5% (m/v) S.R. e agitar.

3.2.1.5 Resultado

- coloração amarela indica presença de cloretos.
- coloração marrom indica que não há presença de cloretos.

3.2.2 Hipocloritos

3.2.2.1 Fundamento

A adição de iodeto de potássio ao leite em presença de hipocloritos desenvolve coloração alaranjada devido à liberação de iodo.

3.2.2.2 Soluções e Reagentes

- iodeto de potássio 10% (m/v) S.R.

3.2.2.3 Vidrarias e Utensílios

- tubo de ensaio.
- pipeta graduada de 1 mL.
- suporte para tubos de ensaio.

3.2.2.4 Procedimento

- Em tubo de ensaio misturar, partes iguais (1 mL) de leite e iodeto de potássio 10% (m/v) S.R. e agitar.

3.2.2.5 Resultado

- coloração alaranjada indica presença de hipocloritos.
- sem alteração na coloração indica que não há presença de hipocloritos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Amostras

Foram adquiridas no comércio de Assis cinco amostras de marcas diferentes de leite UHT integral.

4.1.2 Equipamentos

Capela de fluxo laminar TROX série 1341r

Autoclave Phoenix modelo vertical

Estufa bacteriológica Marconi modelo MA 032

Estufa de esterilização Fanem modelo 315 SE

Estufa de cultura Fanem modelo 502C

Balança analítica Marte modelo AY220

Microscópio eletrônico Carl Zeiss série 48759

PHmetro Marconi modelo MA-522

4.1.3 Soluções e Reagentes

Agar MYP Himedia lote 38278

Solução tampão pH 4 e 7

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Amostragem

Foi realizada coleta de amostras de 5 marcas diferentes, sendo 2 caixas de cada marca do mesmo lote.

4.2.2 Determinação de *Bacillus cereus*

O teste de incubação foi realizado segundo orientação da Resolução 12 do Ministério da Saúde. A enumeração de *Bacillus cereus* foi feita conforme IN 62 de 26/08/2003 da Secretária de Defesa Agropecuária que oficializa os métodos analíticos para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.

4.2.2.1 Plaqueamento

Preparou-se o meio de cultura Agar MYP conforme instruções do fabricante e autoclavou-se por 15 minutos a 121 °C. Após autoclavagem, o meio foi resfriado até temperatura aproximada de 55 °C e adicionou-se solução de gema de ovo e Polymyxin B. Todo o procedimento para preparação do meio e do plaqueamento foi feito em fluxo laminar. No preparo da emulsão de gema de ovo o ovo é lavado, colocado em água fervendo até o início de fervura, retira-se e deixa por 10 minutos em álcool. Depois quebra o ovo separa a gema da clara, a gema e colocada em proveta onde é adicionada solução salina 0,9% na mesma proporção da gema e mistura. Adicionou-se a solução de Polimixina B. com a solução de gema de ovo e o meio Agar, misturando bem. O meio preparado foi adicionado à placas de petri estéreis e aguardou-se o meio solidificar.

Após a incubação de 7 dias A 37 °C realizou-se a leitura do pH de cada marca e após a leitura realizou-se o plaqueamento. O plaqueamento foi feito em duplicata pelo de espalhamento em superfície em 2 diluições.

Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas a 32 °C.

4.2.3 Incubação para Teste de Esterilidade

Uma caixa de leite de cada marca foi para a incubação em estufa por 7 dias em temperatura de 37 °C, conforme descrito na Resolução 12 do Ministério da Saúde, onde visa detectar a presença de qualquer tipo de micro-organismo através do estufamento da caixa de leite.

A outra caixa de leite da mesma marca e lote iguais foi aberta e realizada a leitura de pH. A Figura 18 mostra o pHmetro utilizado na leitura do pH do leite, a Figura 19 mostra a estufa que o leite ficou durante os 7 dias por 37 °C.



Figura 18. PHmetro.



Figura 19. Estufa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O resultado das análises mostrou que nenhuma das amostras sofreu estufamento da caixa, indicando ausência de micro-organismos. A Tabela 6 mostra os resultados de pH antes e após incubação das amostras por 7 dias a 37 °C.

Amostra	pH antes da incubação	pH depois da incubação
Batavo	6,74	6,65
Líder	6,79	6,62
Parmalat	6,69	6,64
Matilat	6,84	6,67
Jussara	6,86	6,59

Tabela 6. Tabela relação do pH do leite antes e depois período de incubação de 7 dias a 37 °C.

Conforme pode ser observado na Tabela 6, todos as amostras sofreram um pequeno decréscimo do pH. Essa pequena diminuição do pH não implicou na qualidade do leite, que pode ser evidenciada na falta de estufamento nas amostras de leite após incubação (Figura 20). E segundo o trabalho realizado pela Unicamp o pH suspeito é abaixo de 6,5 e todos os pHs das amostras do presente trabalho obtiveram pH maior que o considerado suspeito.



Figura 20. Caixas de leite após incubação.

A Figura 21 mostra o fluxo laminar utilizado durante o plaqueamento, a Figura 22A mostra o plaqueamento de amostra sem incubar e a figura 22B mostra o plaqueamento a mesma amostra após incubação.

O plaqueamento foi realizado conforme IN 62 de 26/08/2003 da Secretaria de Defesa Agropecuária. Após todo procedimento e incubação das amostras em estufa bacteriológica por 48h a 32 °C não ocorreu crescimento de *Bacillus cereus*. Isto indica que a ultra pasteurização, processo, envase foram eficientes nas marcas analisadas.

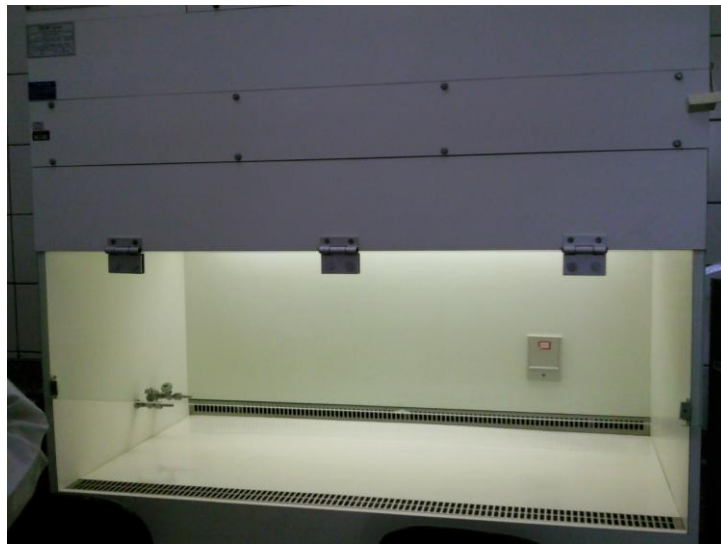


Figura 21. Fluxo laminar TROX série 1341.

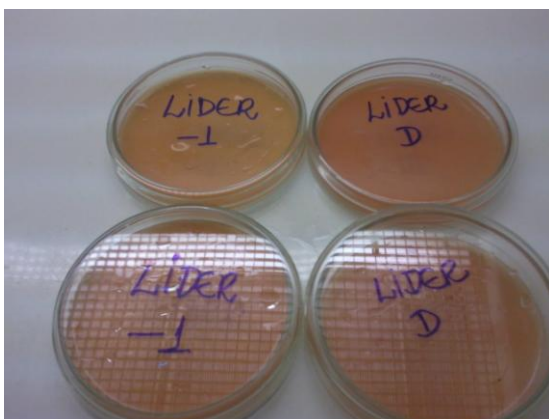


Figura 22 A. Amostra plaqueada antes da incubação

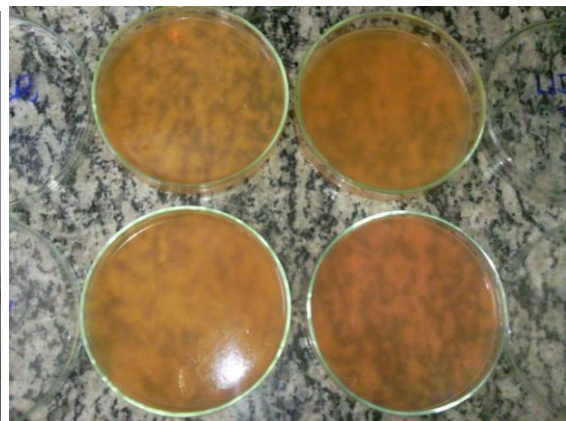


Figura 22B. Amostra plaqueada após incubação

Pacheco e Massaguer (2007) realizaram análise de 6500 embalagens de leite UHT de cinco plantas Brasileiras de processo UHT e não foi detectado *Bacillus cereus* em nenhuma amostra das cinco plantas processadoras e o pH somente em quatro das amostras resultaram em pH abaixo de 6,5, as demais marcas oscilaram entre 6,57 e 6,73.

O presente trabalho obteve resultados semelhantes deste estudo. Não houve ocorrência de *Bacillus cereus* nas amostras analisadas e o pH após incubação não esteve abaixo de 6,5 em nenhuma das amostras.

Lago, *et al.* (2007) realizaram análises em 120 amostras de diversos tipos de leite e obtiveram a presença de *Bacillus cereus* em quatro amostras de leite UHT.

Martins, *et al.* (2005) realizaram testes em 110 amostras de leite UHT de 11 marcas diferentes comercializadas em São José do Rio Preto-SP, e detectaram *Bacillus cereus* em 13 amostras.

GALLO e WATANUKI (2008) realizaram análises em 5 amostras de leite UAT que não apresentou incidência de *Bacillus cereus*, e após análises de pH em um período de 12 horas com análises durante horas diversas não houve variação de pH dentro deste período reforçando a ausência de *Bacillus cereus*.

Alguns autores encontraram *Bacillus cereus* em amostras de leite, este fato reforça a importância dessa pesquisa, pois o leite é indicado aos grupos mais suscetíveis à toxifencções por *Bacillus cereus*.

6. CONCLUSÃO

No teste de incubação para verificar a eficiência do processo UHT nenhuma das amostras apresentaram o estufamento da caixa após os 7 dias de incubação a 37 °C.

Na análise de *Bacillus cereus* segundo metodologia da Instrução Normativa n. 62 de 26/08/2003 da Secretária de Defesa Agropecuária por plaqueamento todas as amostras após as 48h em estufa bacteriológica apresentaram resultado negativo para *Bacillus cereus*.

O pH do leite após a incubação sofreu uma variação muito pequena, não apresentando alterações significativas.

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que o processamento dos lotes analisados das 5 marcas neste estudo, foi satisfatório.

7. REFERÊNCIAS

ABLV. **Leite na prevenção da osteoporose**. Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV). Disponível em: <<http://www.ablv.org.br>>. Acesso em: 25 jun. 2011.

ABLV. **Leite é fonte de proteínas**. Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV). Disponível em: <<http://www.ablv.org.br>>. Acesso em: 25 jun. 2011.

ABLV. **O leite: Alimento universal**. Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV). Disponível em: <<http://www.ablv.org.br>>. Acesso em 25: jun. 2011.

ABLV. **Portaria nº370, de 04 de janeiro de 1997**. Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV). Disponível em: <<http://www.ablv.org.br>>. Acesso em 25: jun. 2011.

ALMEIDA, Diana; ALMEIDA, Andréia; VENTURA, Diana. **Perigos Biológicos – *Bacillus cereus***. Escola Superior Agrária de Coimbra. Disponível em: <<http://www.esac.pt/noronha/IntSegAlim/1011/perigos/Bacillus%20cereus.pdf>>. Acesso em 31 mai. 2011.

ALVES, Líria. **Composição do leite UHT**. Equipe Brasil Escola. Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/curiosidades/composicao-leite-uht.htm>>. Acesso em: 15 fev. 2011.

ANGELIS, Rebeca Carlota de. Nutrição e leite longa vida. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 04 out. 1995. p. 2-6.

ANVISA. **FAQ – Sistema de Perguntas e Respostas (Aditivos Alimentares)**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/asp/usuario.asp?usercecoes=28&userassunto=40>>. Acesso em: 22 nov.2011.

ARROIO, Agnaldo. Louis Pasteur: Um cientista humanista. **Revista Eletrônica de Ciências** (Faculdade de Educação – USP), n. 31, fevereiro, 2006. Disponível em: <<http://cdcc.usp.br/ciencia/artigos/art>>. Acesso em: 27 jun. 2011.

BARROS, Vera Regina Monteiro; PANETTA, José Cezar. Esporulados mesófilos e a qualidade do leite UHT. In: MESQUITA, A.J., DURR, J.W., COELHO, K.O. (Org). **Perspectivas e Avanços da Qualidade do Leite no Brasil**. 1 ed. Goiânia: Talento, 2006, v 1, p. 261-272.

BOBBIO, Florinda Orsatti; BOBBIO, Paulo A. Introdução à Química de Alimentos. 3ª ed., São Paulo: Livraria Varela, 2003.

BRANCO, Revista Balde. **O leite nas diversas fases da vida**. Disponível em: <http://www.laticinio.net/inf_tecnicas.asp?cod=178>. Acesso em: 27 jun. 2011.

BRITO, Diogo; DIAS, Gonçalo; FERREIRA, Inês; SOUSA, Pedro; ESTEVES, Vitor. **Processamento de leite UHT**. Disponível em: <www.esac.pt/noronha/pga/0708/trabalhos>. Acesso em 28 abr. 2011.

BRITO, Maria Aparecida; BRITO, José Reinaldo; ARCURI, Edna; LANGE, Carla; SILVA, Márcio; SOUZA, Guilherme. **Busca avançada**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_182_2172003_9246.html>. Acesso em: 30 jun. 2011.

CAMPOS, Shirley de. **Há vários tipos de leite no Brasil**. Disponível em: <www.drashirleydecampos.com.br>. Acesso em: 30 jun. 2011.

CDA. **Instrução Normativa nº. 62, de 26 de agosto de 2003**. Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=665>>. Acesso em 25 jul. 2011.

COLLIS, Tamirys. **Leite: O alimento essencial em todas as fases da vida**. Disponível em: <<http://cristinaarcangeli.com.br/saude-e-nutricao/leite-o-alimento-essencial-em-todas-as-fases-da-vida/>>. Acesso em: 29 jun. 2011.

COSTA, MSc. Roanaldo de Jesus. **Micro-organismos nos alimentos- bactérias patogênicas**. Portal da Educação. Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/8701/micro-organismos-nos-alimentos-bacterias-patogenicas>>. Acesso em 02 jul. 2011.

DAYRELL, Cristiane Martins Rocha. **Tipos de aminoácidos**. Disponível em: <www.scribd.com/doc/56136528/29/Tipos-de-Aminoacidos>. Acesso em: 24 mai. 2011.

EBING, Pauline; RUTGERS, Karin. A preparação de laticínios. **Manual Agrodok**, v.3, n.36, 2006, p.92.

EMBRAPA. **Compostos Clorados: Aspectos Gerais e sua Utilização como Agente Sanizante na Agricultura, Micropropagação e Pecuária**. Disponível em: <http://www.cpsa.embrapa.br:8080/public_electronica/downloads/SDC207.pdf>. Acesso em 09 out. 2011.

EMBRAPA. **Principais países produtores de leite do mundo-2009**. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>>. Acesso em 28 jul. 2011.

EMBRAPA. **Produção de leite, vacas ordenhadas e produtividade do animal no Brasil**. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>>. Acesso em 28 jul. 2011.

FERRAZ, Elizabeth; MACHADO, Flávia Mori. **A importância da qualidade do leite e seus derivados, seus benefícios e riscos para o consumidor**. Revista Balde Branco. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br>>. Acesso em: 24 mai. 2011.

FERREIRA, Helizete do Prado. **Micro-organismos versus inocuidade**. Nutrição em foco. Disponível em: <<http://www.nutricaoemfoco.com.br?pt-br/site.php?secao=auan-nefdebate&pub=1026>>. Acesso em 11 jul. 2011.

G100 (Associação Brasileira das Pequenas e Médias Cooperativas e Empresas de Laticínios). **Lácteos Seguros – Análises de Rotina do Leite na Indústria**. Disponível em <http://www.g100.org.br/download/Lacteos_SegurosIV.pdf>. Acesso em: 09 out. 2011.

GRIGOLETTO, Mariana Franceschini Falavina. **A importância do leite para as crianças**. Disponível em: <<http://oleite.com.br/LeiteSaudeNoticia.aspx?codigoNot=4493&A+IMPORTANCIA+D+O+LEITE+PARA+AS+CRIANCAS>>. Acesso em: 29 jun. 2011.

GUERREIRO, Sonia. **Eu adoro leite!** Disponível em: <<http://soniaquerreiro.blogspot.sapo.pt/77106.html>>. Acesso em: 28 jun. 2011.

INDRIUNAS, Alexandre. **Como funcionam os micro-organismos**. Disponível em: <<http://ciencia.hsw.uol.com.br/microorganismo.htm>>. Acesso em: 27 jun.2011.

KAUFMAN, Dra Dina. **O que é lactose?** Disponível em: <<http://dinakaufman.com/artigos/intolerancia-a-lactose>>. Acesso em 30 jun. 2011.

KINALSKI, Alvina Canal; ZANON, Lenir Basso. O leite como tema organizador de aprendizagem em química no ensino fundamental. **Revista Química Nova na Escola**. N.6, p.17-19, 1997.

LAGO, N.C.M Rezende; JR., O.D. Rossi; MARTINS, A.M.C. Vidal; AMARAL, L.A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, setembro, 2007, p.1563-1569.

LAY-LANG, Giorgia. **A importância do leite para a saúde**. Disponível em: <<http://www.sissaude.com.br/sis/inicial.php?case=2&idnot=7808>>. Acesso em: 29 jun. 2011.

LEITE, Ciência do. **Cloretos**. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/?action=4&t=60>>. Acesso em 09 out. 2011.

LEITE, Pratique Leite. **O leite Longa Vida, em seu Processamento, Recebe Algum Tipo de Conservante**. Disponível em: <<http://www.pratiqueleite.com.br/article.php?recid=5426>>. Acesso em 09 out. 2011.

LEITE, Vanessa Carneiro. **Microbiologia do leite**. Centro Universitário de Goiás. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/55193842/Atividade-microbiologia>>. Acesso em: 05 jul. 2011.

LEWINSKI, Iara Waitzberg. **Qual a diferença entre os leites do tipo A, B e C?** Disponível em: <<http://www.nutritotal.com.br/perguntas/?acao=bu&categoria=1&id=548>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

LUCA, Anelise Grunfeld de. **O ensino de química e algumas considerações**. Disponível em: <<http://www.periodicos.udesc.br/index.php/linhas/article/viewFile/1292/1103>>. Acesso em 17 out. 2011.

MACHADO, Jorge Ricardo Coutinho. **Considerações sobre o ensino de química.** Disponível em: <<http://www.ufpa.br/eduquim/consideracoes.htm>>. Acesso em 17 out. 2011.

MADIHA, Ikran. **Bacillus cereus.** Disponível em: <<http://www.humenhealt.com/>>. Acesso em 25 jun.2011.

MANTELLA, Samira. **Métodos de conservação de alimentos: uso do calor e do frio.** Disponível em: <<http://slidshare.net/samiravet/metodos-de-conservacao-de-alimentos-aula-1>>. Acesso em: 21 nov.2011.

MARQUES, Camila Garcia. **O que é a técnica de pasteurização.** Disponível em: <<http://www.nutritotal.com.br/perguntas/?acao=bu&categoria=25&id=386>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

MARTINS, Fernanda de Oliveira. **Tabela de vitaminas.** Disponível em: <www.altiaqui.com.br/saude/168-tabela-de-vitaminas>. Acesso em: 23 jun.2011.

MARTINS, A.M.C. Vidal; JR., O.D. Rossi; LAGO, N.C. Rezende. Micro-organismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, 2005, p.396-400.

MEIRELES, Almir José; ALVES, Daniela Rodrigues. **Guia alimentar para a população brasileira.**

MORAES, Prof^a. Dr^a. Caroline Costa. **Micro-organismos de interesse em alimentos.** Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA- Bagé. Disponível em: <cursos.unipampa.edu.br>. Acesso em: 15 mai. 2011.

MENEGON, Elaine Amorim Soares. **Pesquisa de Reconstituintes e Conservantes do Leite.** Fundação Educacional do Município de Assis. Disciplina: Lab IV – Química de Alimentos.

OLIVEIRA, Prof^a. Valéria de. **Por que ingerir sais minerais?** Disponível em: <<http://professoravaleriaagroindustria.blogspot.com/2010/10/por-que-ingerir-sais-minerais.html>>. Acesso em 30 jun. 2011.

PACHECO-SANCHES, Cristina de Paula; MASSAGER, Pilar Rodriguez de. Análises estatísticas. **Scientia Agrícola**, v.64, n.2, 2007, p.152-161.

PORTO, Ernani. **Microbiologia do leite**. Disponível em: <www.esalq.usp.br>. Acesso em: 25 jun. 2011.

PORTO, Ernani. **Pasteurização do leite**. Lan 1444. Disponível em: <www.esalq.usp.br>. Acesso em: 15 mai. 2011.

ROSOLEN, José Edson. **Mapa do leite no estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.leitebrasil.org.br/download/resumoexecutivo.pdf>>. Acesso em: 28 jul.2011.

SALUSTIANO, Valéria Costa. **Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após pasteurização do leite**. 2007. 75p. Tese (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

SANTOS, Prof. Dr. Marcos Veiga dos; FONSECA, Prof. Dr. Luis Fernando Laranja da. **Composição e propriedades físico-químicas do leite**. 2000. 13p. Curso Online – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Universidade de São Paulo), São Paulo, São Paulo. 2000.

SARNI, Roseli Oselka Saccardo; ALVES, Renata Pinotti. **Leite: saudável em todas as fases da vida**. Associação Brasileira da Indústria de Leite Longa Vida (ABLV). Disponível em: <www.ablv.org.br>. Acesso em: 25 jun. 2011.

SERPA, Veridiana. **Lactose**. Disponível em: <<http://30ealguns.com.br/2010/01/voce-sabe-o-que-e-lactose>>. Acesso em: 05 jul. 2011.

SILVA, Livia Cavaletti Corrêa da; BELOTI, Vanerli; TAMAMINI, Ronaldo; OVIDIO, Loredana d'; MATOS, Marcos Rodrigues de; ARRUDA, Ana Maria Camelo Travassos de; PIRES, Edleide Maria Freitas. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambuco. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.1, jan./mar., 2011, p. 267-276.

STELLA, Roberta. **A importância dos sais minerais para o organismo**. Disponível em: <<http://cyberdiet.terra.com.br/a-importancia-dos-sais-minerais-para-o-organismo-2-1-1-34.html>>. Acesso em 30 jun. 2011.

TURCO, Cristiane de Paula; COSTA, Guilherme Machado; PAIVA, Hélio Afonso Braga de; BARROSO, Marcelo Francini Girão; CÔNSOLI, Matheus Alberto; NOGUEIRA, Mauricio Palma; ROSSI, Ricardo Messias; SILVA, Rosana de Oliveira Pithan e; TORGGLER, Sérgio Pinheiro; NETO, Sigismundo Bialoskorski. **Planejamento e gestão estratégica do sistema agroindustrial do leite no estado de São Paulo**. 1. ed. São Paulo: SEBRAE, 2007.

VENTURINI, Katiane Silva; SARCINELLI, Miryelli Freire; SILVA, Luis César. Processamento do Leite. In: **BOLETIM TÉCNICO**. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Pró Reitoria de Extensão – Programa Institucional de Extensão, Espírito Santo, 2007, 7p.

VENTURINI, Katiane Silva; SARCINELLI, Miryelli Freire; SILVA, Luis César. Características do Leite. In: **BOLETIM TÉCNICO**. Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Pró Reitoria de Extensão – Programa Institucional de Extensão, Espírito Santo, 2007, 6p.

VIEIRA, Luiz Carlos; KANEYOSHI, Cristóvão Morelly; FREITAS, Hashiguti de. **Qualidade do leite**. Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em: <www.embrapa.br>. Acesso em: 23 jun. 2011.

VILELA, Duarte. **Leite: Sua importância econômica, social e nutricional**. Disponível em <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/5649>>. Acesso em: 26 jun. 2011.

WATANUKI, Milena Martinelli; GALLO, Cláudio Rosa. Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação dos esporos após tratamento térmico. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n.3, dezembro, 2008.

ZACARCHENCO, Patrícia Blumer. **Aperfeiçoamento da metodologia para contagem de *Bacillus sporothermodurans* e sua ocorrência em leite UAT/UHT**. 2000. 92p. Tese – Faculdade de Engenharia de Alimentos (Universidade Estadual de Campinas). São Paulo, Campinas, 2000.