

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS  
CAMPUS PONTA GROSSA

CRISTIANE DE FÁTIMA DA LUZ  
LACI MARIA SCHAFHAUSER  
VALDINEIA GONÇALVES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE AMOSTRAS  
DE LEITE UHT**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2018

CRISTIANE DE FÁTIMA DA LUZ  
LACI MARIA SCHAFHAUSER  
VALDINEIA GONÇALVES DE SOUZA

## AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE AMOSTRAS DE LEITE UHT

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Departamento Acadêmico de Alimentos - DAALM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. M.sc Simone Bowles

PONTA GROSSA

2018



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE AMOSTRAS DE LEITE UHT**

por

**CRISTIANE DE FÁTIMA DA LUZ  
LACI MARIA SCHAFHAUSER  
VALDINEIA GONÇALVES**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 13 de dezembro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. As candidatas foram arguidas pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

**Simone Bowles**  
Prof<sup>a</sup>. Orientadora

---

**Safi Amaro Monteiro**  
Membro titular

---

**Luis Alberto Chavez Ayala**  
Membro titular

## RESUMO

O presente estudo tem como objetivo analisar as condições físico-químicas e microbiológicas de amostras de leites UHT. Nos meses de agosto e setembro de 2018, foram coletadas amostras de leite UHT (integral) correspondentes a três marcas diferentes, totalizando nove amostras, sendo as condições avaliadas através dos métodos físicos químicos, °Brix, determinação de acidez por titulação, teor de proteína por formol, estabilidade ao etanol, quanto à avaliação microbiológica a análise de contagem bacteriana. As análises foram realizadas em triplicata, com a finalidade de avaliar diversos aspectos da qualidade em diferentes marcas de leite UHT ofertadas no mercado varejista. Os resultados das análises apontam que todas as amostras estão dentro dos padrões, com exceção do teor de gordura em que uma das marcas apresentou valor inferior ao estabelecido pela legislação.

Palavras- chaves: Qualidade, Leite, Adulteração.

## **ABSTRACT**

The present study aims to analyze the physical-chemical and microbiological conditions of UHT milk samples. In the months of August and September of 2018, samples of UHT (whole milk) were collected corresponding to three different brands, totaling nine samples, being the conditions evaluated through chemical physical methods, °Brix, determination of acidity by titration, protein content by formaldehyde, ethanol stability, microbiological evaluation and bacterial counting. The analyzes were carried out in triplicate, in order to evaluate several aspects of quality in different UHT milk brands offered in the retail market. The results of the analyzes indicate that all species are within the standards, except for the content that one of the brands presented a lower value than the one established by the legislation.

Key words: Quality, Milk, adulteration.

## SUMÁRIO

<b>1 - Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Revisão literária .....	3
1.2 Fluxograma do processo de leite UHT .....	5
<b>2 - Objetivo</b> .....	<b>6</b>
2.1 Objetivo específico .....	6
<b>3 - Materiais e métodos</b> .....	<b>6</b>
3.1 Materiais.....	6
3.2 Reagentes.....	7
3.3 Equipamentos .....	7
3.4 Coleta e preparo das amostras .....	8
<b>4 – Análises físico-químicas</b> .....	<b>8</b>
4.1 Determinação °Brix pelo método refratométrico de bancada .....	8
4.2 Determinação acidez titulável pelo método titulométrico .....	9
4.3 Determinação de proteínas por formol.....	9
4.4 Determinação da resistência ao álcool .....	10
4.5 Determinação do teor de gordura pelo método do butirômetro de Gerber.....	10
4.6 Determinação de densidade pelo termolactodensímetro .....	10
<b>5 - Avaliação microbiológica</b> .....	<b>10</b>
5.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	11
5.2 Preparo das amostras líquidas.....	12
5.3 Isolamento do <i>Bacillus cereus</i> .....	12
5.4 <i>Clostridium sp.</i> .....	13
5.5 Preparo das amostras e duas diluições .....	13
<b>6 – Resultados e discussões</b> .....	<b>14</b>
<b>7 – Conclusão</b> .....	<b>19</b>
<b>8 - Referências</b> .....	<b>20</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Dez anos após seu lançamento na Europa, o leite longa vida ou ultrapasteurizado chegava ao mercado brasileiro de leite fluido de consumo. A utilização da nova tecnologia UHT (*Ultra High Temperature*) por empresas brasileiras, a partir de 1972, se fez num tempo relativamente curto se comparado ao que levou o leite pasteurizado para fazer o mesmo percurso, no início do século XX (MEIRELES, 2001). No Brasil, o agronegócio do leite exerce uma grande relevância no suprimento de alimentos e no papel social, especialmente na criação de empregos, renda e tributos para o país.

Nos últimos 25 anos, a indústria de laticínios melhorou as tecnologias utilizadas na conservação do leite e seus derivados (GOFF & GRIFFEITHS, 2006). Na sociedade atual, o tratamento do leite para sua melhor preservação e por maior período de tempo causa algumas preocupações com relação ao conteúdo de nutrientes deste alimento. A pasteurização e o aquecimento do leite podem causar perdas de algumas vitaminas (HAUG ET AL.;2007).

O leite UHT é esterilizado em temperatura que variam entre 135 e 150°C por 1 a 5 segundos, envasado assepticamente. O processo de fervura pode eliminar possíveis microrganismos patogênicos existentes no leite e, quando seguido de refrigeração, pode garantir a qualidade microbiológica do produto. Porém, esse processo não elimina possíveis contaminantes químicos e ou físicos e, no caso de adulteração do leite, também não garante a qualidade do produto (PACHECO; ANTUNES, 2009). O controle da qualidade físico-química e microbiológica do leite UHT que chega até o consumidor é de extrema importância para a avaliação do seu valor nutricional, detectar possíveis fraudes, evitar o consumo de leite de qualidade inferior e evitar danos à saúde pública. Além da importância econômica, o leite é um alimento de grande valor nutritivo principalmente pela presença de cálcio, essencial para a formação dos tecidos (FERREIRA, 2007). Em termos de vitaminas e minerais o leite é especificamente rico nas vitaminas B2, A, D, E, biotina e fósforo. Aproximadamente 70% do cálcio alimentar da dieta humana é proveniente do leite e seus produtos lácteos, principalmente queijos (PACHECO, ANTUNES, 2009).

Segundo dados da associação brasileira de indústrias de leite longa vida (ABLV) diz que a produção de leite UHT representa 78% total do leite fluido no Brasil. A contaminação por microrganismos pode ser minimizada a partir da adoção de medidas simples nos estabelecimentos de ordenha e processamento como antissepsia dos tetos por meio de banhos de imersão com desinfetantes adequados para reduzir infecções como, por exemplo, a mastite ou processo inflamatório da glândula mamária que resulta na diminuição da produção e alterações na composição do leite. Esses processos normalmente são resultado da ação de agentes infecciosos, como vírus, principalmente, a fungos, microplasmas e, principalmente, bactérias (PEDRINI; MARGATHO, 2003).

A presença e o crescimento de bactérias no leite afetam a sua qualidade. Os componentes químicos do leite podem ser degradados por meio da atividade metabólica bacteriana e das enzimas secretadas pelas bactérias. Produtos destas reações de degradação podem ter efeitos indesejáveis sobre a textura, sabor e aroma do leite (HAYES BOOR, 2001). Quanto aos padrões de qualidade, um passo importante foi a implementação do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade de Leite (PNMQL), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), com objetivo de promover a melhoria da qualidade do leite e seus derivados, garantir a saúde da população e aumentar a competitividade dos produtos lácteos em novos mercados (PACHECO; ANTUNES, 2009).

A qualidade tem efeito direto na vida útil do leite UHT (GILLIS et frequentemente em desacordo com os padrões microbiológicos (NERO et al., 2005; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; ARCURI et al., 2006) e físico-químicos brasileiros (LORENZETTI et al., 2006; MENDONÇA, 2001; MARTINS et al., 2008). Estudos sobre a qualidade do leite UHT indicam que alguns esporos podem sobreviver ao tratamento térmico apesar do processo destruir todas as células bacterianas vegetativas (ROSENTHAL,1991). Sendo assim, o leite UHT nem sempre é um produto livre de contaminações, podendo, portanto, sofrer deterioração. A baixa qualidade microbiológica do leite, além de ser um problema de saúde pública altera tanto as características sensoriais quanto a vida útil dos produtos lácteos (FRANCO; LANDGRAF,1996).



Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1997), o leite UHT deve atender as seguintes características sensoriais: aspecto líquido, cor branca, odor e sabor característicos, sem sabores nem odores estranhos e as seguintes características físico-químico para o leite integral: no mínimo 3% de gordura, acidez entre 14 e 18 ° Dornic, estabilidade ao álcool de 72% e, no mínimo 8,2% de desengordurado.

### **1.1. Revisão literária**

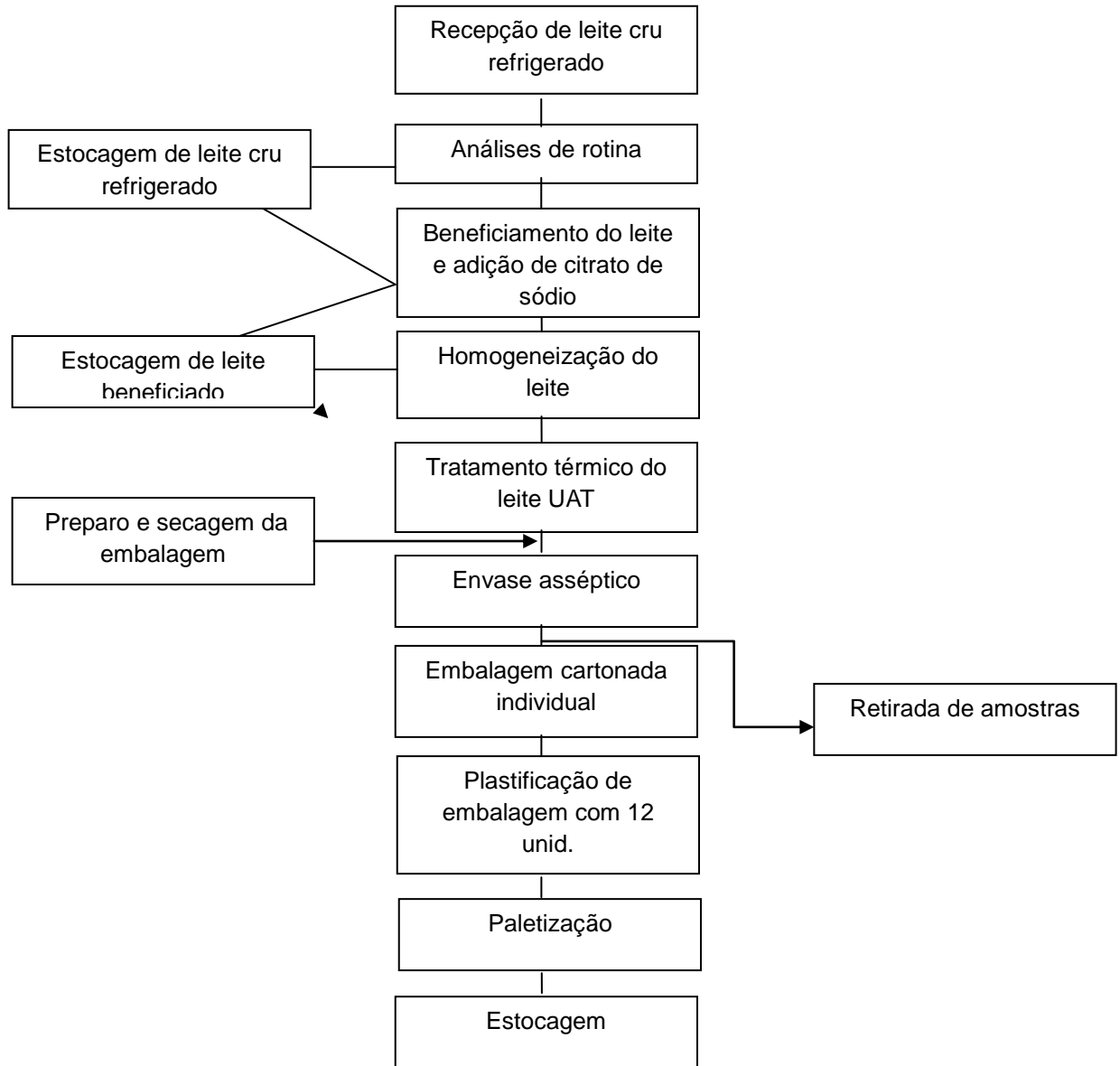
A categoria do leite cru refrigerado é a que está relacionada à maioria dos produtores de leite. A produção de leite de qualidade beneficia os produtores à medida que se reduz a existência de doenças, resultando em maior produção de leite e menores custos. Além disso, uma tendência cada vez mais clara é a valorização do produto de qualidade pelos laticínios, assim ganha o produtor, ganha o laticínio e, certamente, ganha o consumidor, com produtos de alta qualidade. A implementação da Instrução Normativa nº. 51 abrirá as portas de novos mercados para o leite brasileiro, garantindo a sustentabilidade da produção de leite pelos próximos anos. Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002). Ou seja, o leite de outros animais, que não sejam bovinos, deve ter sua denominação especificada no rótulo da embalagem do produto. Mas, pode-se dizer que, de forma geral, os leites de vaca e de búfala são preferidos pelo consumo direto aos de cabra e de ovelha, sendo estes dois últimos consumidos mais de forma indireta, como queijos (EBING et al., 2005). Do ponto de vista biológico Pereda et al. (2005), classificam o leite como o produto da secreção das glândulas mamárias de fêmeas mamíferas, cuja função natural é a alimentação dos filhotes. Quanto ao aspecto físico-químico González (2001) define o leite como sendo uma emulsão de glóbulos de gordura e uma suspensão de micelas de caseína (caseína, cálcio e fósforo) em uma fase aquosa, que contém solubilizadas moléculas de lactose, proteínas do soro do leite e alguns minerais, sendo os leucócitos a parte da fase suspendida. O leite também pode ser descrito

como um líquido uniforme, mas turvo, quando observado sob um microscópio com pequeno aumento (5x). Numa ampliação de 500x, glóbulos de gordura podem ser vistos. Enquanto em uma maior ampliação (50.000x), as micelas de caseína podem ser visualizadas (GOFF, 2009). Em relação aos atributos que o consumidor considera para escolha do tipo de leite que consome, o leite UHT (UAT) tem larga preferência (70%) devido à conveniência de sua embalagem e por ser menos perecível (SANTOS,2003). O tipo de leite, se UHT (UAT), A, B ou C, é a primeira característica observada (35%). O segundo critério é o teor de gordura, se integral, desnatado ou semi-desnatado. A marca do leite é o terceiro critério considerado para o consumo (13%) e o preço representa 12% das opções de compra (CASTRO ET al., 2006).

A aquisição de leite UHT submerge elevados custos de produção e, por este motivo, relevam-se os grandes volumes de matéria-prima trabalhados neste tipo de processo. As etapas de fabricação tendem, sobretudo, garantir a qualidade microbiológica do produto e possibilitar um maior período de armazenamento do mesmo, sem a necessidade de refrigeração.

## **1.2. Fluxograma**

A seguir, o fluxograma do processo de fabricação do leite UHT e a descrição do mesmo serão apresentados.



Fluxograma do processo de leite UHT

Fonte: autor

## **2. OBJETIVO**

As maiores preocupações quanto à qualidade físico-química do leite estão associadas ao estado de conservação, à eficiência do seu tratamento térmico e integridade físico-química, principalmente aquela relacionada à adição ou remoção de substâncias químicas próprias ou estranhas à sua composição (POLEGATO; RUDGE, 2003). A importância dos microrganismos do leite revela que o conhecimento sobre seu índice de contaminação microbiana pode ser usado na avaliação de sua qualidade intrínseca. As bactérias do leite podem causar alterações químicas, tais como a degradação de gorduras, de proteínas ou de carboidratos podendo tornar o produto impróprio para o consumo (ANVISA, 2001; BRASIL 2002).

### **2.1. Objetivo específico**

Devido à importância do adequado beneficiamento do leite na saúde da população, este estudo tem como objetivo analisar as condições físico-químicas e microbiológicas de amostras de leite UHT.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Materiais:**

- 1) Frascos estéreis de 250 ml;
- 2) Pipetas graduadas e micropipetas;
- 3) Placas de petri;
- 4) Alça de Drigalski;
- 5) Tubos de ensaio;

- 6) Tesoura e colher estéreis;
- 7) Algodão;
- 8) Erlenmeyer de 125 ml e vidraria similar;
- 9) Bureta.

### **3.2. Reagentes:**

- 1) Álcool 72%;
- 2) Agar Manitol gema de ovo Polimixina (MYP);
- 3) Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS);
- 4) Água peptonada 0,1%
- 5) Solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 N;
- 6) Solução alcoólica de fenolftaleína (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>) a 1 % (m/v);
- 7) Oxalato de sódio 28%;
- 8) Formaldeído;
- 9) Ácido sulfúrico concentrado (densidade 1,820 – 1,830)

### **3.3. Equipamentos:**

- 1) Refratômetro com escala de grau Brix com divisões de no mínimo 0,2;
- 2) Termolactodensímetro.

### **3.4. Coleta e Preparo das Amostras:**

Nos meses de agosto e setembro de 2018, foram coletas em supermercados da cidade de Ponta Grossa-PR, três amostras de leite UHT integral que correspondem a três marcas diferentes que totalizam nove amostras, logo após a aquisição as mesmas foram encaminhadas para os laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa. Foram analisados para fins consideráveis o critério de seleção e integridade física das embalagens bem como a hermeticidade, dados como, validade, lote e data de fabricação e deu-se início as análises.

As amostras foram analisadas em triplicata, sendo identificadas e codificadas com as letras A, B, C. Na sequência homogeneizada por inversão para execução das determinações analíticas.

## **4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

Os parâmetros de referências foram comparados com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal para análises físico-químicas. Os resultados obtidos foram associados à portaria Princípios Gerais para Estabelecimentos de Critérios e padrões Microbiológicos para Alimentos.

### **4.1. Determinação °Brix pelo método refratométrico de bancada**

Brix (símbolo °Bx) é uma escala numérica que mede a quantidade de sólidos solúveis em uma solução de sacarose. A escala Brix é utilizada na indústria de alimentos para medir a quantidade aproximada de açúcares em sucos de fruta,

vinhos e na indústria de açúcar. Uma vez que em soluções açucaradas o soluto em maior concentração é o açúcar (carboidratos), o Brix aproxima a concentração de açúcar na amostra. Entretanto, como este não é um método específico, o Brix também pode determinar outros tipos de sólidos que possam estar solúveis (EMBRAPA, 2006).

Os parâmetros de referências foram comparados com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal para análises físico-químicas. Os resultados obtidos foram associados à portaria Princípios Gerais para Estabelecimentos de Critérios e padrões Microbiológicos para Alimentos.

#### **4.2. Determinação acidez titulável pelo método titulométrico**

A determinação da acidez do leite é uma das medidas mais usadas no controle higiênico sanitário da matéria-prima pela indústria leiteira. O teste é usado para classificar o leite e também como um guia para controle da manufatura de produtos como o queijo. A acidez do leite é medida pelo método da acidez titulável, cujo fundamento consiste na titulação de determinado volume de leite por uma solução alcalina de concentração conhecida, utilizando, como indicador, a fenolftaleína. Apesar do resultado da acidez titulável ser expresso em % em ácido láctico, não é somente a presença dele que determina a acidez; outros componentes do leite também interferem nesta característica como, por exemplo, citratos, fosfatos e proteínas.

#### **4.3. Determinação do teor de proteínas por formol**

Uma das alternativas para ensaio da proteína é o método por Formol que é mais rápido e prático apesar de ser menos rigoroso. A determinação de proteínas pelo método de Formol foi constituída de quatro fases. Previamente, foi realizada a digestão ácida da amostra para a liberação dos aminoácidos e posterior quantificação destes pela reação de suas cadeias laterais com o formol (LUTZ, 1985). Na sequência, para a determinação propriamente dita foi utilizada a metodologia de CECHI (1999).

#### **4.4. Determinação da resistência ao álcool**

A estabilidade do leite frente ao álcool é um teste rápido empregado nas plataformas de recepção da indústria leiteira como indicador de acidez e da estabilidade térmica do leite.

O aumento na acidez do leite, causada pelo crescimento de bactérias e produção de ácido láctico, produzirá um resultado positivo no teste como a coagulação do leite quando misturado com uma solução alcoólica.

O método consiste na adição de álcool em concentração padrão (72<sup>o</sup>) e observação da formação de aglutinação, para interpretação do resultado.

#### **4.5. Determinação do teor de gordura pelo método do butirômetro de Gerber**

Este método baseia-se na quebra da emulsão do leite com ácido sulfúrico concentrado (densidade 1,820 – 1,830) e na utilização de uma substância desmulsificante, o álcool amílico. O ácido sulfúrico decompõe as proteínas e a lactose do leite aumentando a densidade da fase aquosa. A gordura é liberada e sua separação acontece pela ação do álcool amílico e pela centrifugação na centrífuga de Gerber. O resultado é obtido por leitura direta na haste graduada do butirômetro.

#### **4.6. Determinação da densidade pelo método do termolactodensímetro**

Determinada através de termolactodensímetro com correção de temperatura a 15<sup>o</sup>, cujo princípio é o do empuxo (PENNA et al., 2001).

A densidade tem importância tecnológica, quando se pretende calcular o peso do leite requerido, quando se investiga uma possível adulteração no leite e na hora de normalizar automaticamente o teor de gordura (SPRESER, 1991).

### **5. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

As análises microbiológicas foram realizadas conforme recomendado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do leite UHT, estabelecido pela Portaria 146 do Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 1996). A



contagem de mesófilos aeróbios foi realizada por semeadura em ágar padrão para contagem, seguida de incubação a 36°C por 48h, segundo a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2003) e os resultados expressos em UFC/mL. Para a análise das amostras de leite fluido UHT, antes da retirada da unidade analítica, as embalagens foram devidamente descontaminadas, ou seja, inicialmente lavadas com água e detergente, secas com papel descartável, e limpas com etanol a 70%. Após, foi realizada a homogeneização do conteúdo (invertendo-se 25 vezes) e abertas com instrumental esterilizado, na bancada limpa e higienizada entre bico de Bunsen acesos. Foi retirada uma alíquota de 25 ml que depois foi transferida para um frasco contendo 225 ml de água peptonada 0,1% previamente esterilizada e homogeneizada por simples agitação, sendo posteriormente efetuadas as diluições seriadas até  $10^{-3}$ . Para a contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas, 1,0mL de cada diluição foi semeado em triplicata diretamente em placas de Petri esterilizadas, pela técnica pour plate, contendo ágar para contagem padrão (PCA - Difco®) de acordo com a Instrução Normativa SDA 62. As placas foram incubadas a 32-35°C por 24-48 horas (BRASIL, 1993).

Como o leite UHT (UAT) é estocado a temperaturas mais elevadas por longos períodos de tempo, a presença dessas enzimas termoestáveis é particularmente prejudicial à qualidade desse tipo de leite (BRITO; BRITO,2001).No estudo realizado por Vidal Martins et al. (2005) com leite UHT (UAT) estocado por 120 dias houve um aumento da proteólise no decorrer do armazenamento relacionada com a quebra da caseína pela ação das proteases bacterianas, originárias principalmente das bactérias psicrótróficas presentes no leite cru.

Em leite estocado a proteólise é a maior reação de deterioração, aliada à lipólise e à oxidação, limitando a vida de prateleira do produto (PEREDA et al., 2008). Os microrganismos proteolíticos degradam as proteínas produzindo peptídeos e aminoácidos (TRONCO, 2008).

### **5.1. *Bacillus cereus***

É amplamente distribuído na natureza sendo o solo seu reservatório natural, assim podendo contaminar facilmente os alimentos como nos cereais, nas superfícies da carne bovina, suína e de frango devido à contaminação do solo,

afetando também os laticínios como queijos e sorvetes, sendo comum encontrar esporos no leite em pó.

O *Bacillus cereus* apresenta-se sob a forma de bastonete Gram positivo, medindo entre 1,0 e 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento. Seu esporo é elipsoidal ou cilíndrico e centro-terminal (VARNAM e EVANS, 1991). Sua temperatura ótima de desenvolvimento está entre 30 e 37°C, sendo o tempo de geração, nesta faixa, de 18 a 27 minutos (DROMIGNY et al., 1994). Drobniowski (1993) relata que cepas psicrófilas e termófilas podem se desenvolver em temperaturas tão baixas quanto 3°C ou tão altas quanto 75°C, respectivamente. A 77°C o tempo de geração de algumas cepas de *Bacillus cereus* chega a ser de até 8 a 10 horas (DUFRENNE et al., 1994; LANGEVELD e UPERUS, 1993),

## **5.2. Preparo das amostras líquidas**

Antes da retirada da unidade analítica, as embalagens foram devidamente descontaminadas, ou seja, inicialmente lavadas com água e detergente, secas com papel descartável e limpas com etanol a 70%. Após a descontaminação das embalagens e homogeneização do conteúdo (invertendo-se 8 vezes), as mesmas foram abertas com instrumental esterilizado e então retirou-se a unidade analítica para análise.

## **5.3. Isolamento do *Bacillus cereus***

Para a tentativa de isolamento de cepas de *Bacillus cereus* foi necessário, inicialmente, submeter as amostras a um enriquecimento seletivo. Para tal, 10 mililitros de cada amostra foram transferidos para um frasco estéril tipo erlenmeyer contendo 90 mililitros de caldo soja triptona (TSB) adicionado de polimixina B na proporção de 20µg por mililitro (STADHOUDERS, 1992b). O conjunto foi incubado a 30°C por 24 horas e, após o período, foi feito o plaqueamento seletivo.

Para o plaqueamento seletivo, uma alíquota de 0,1 mililitro da cultura de enriquecimento seletivo foi semeada em placas de Petri contendo ágar manitol gema de ovo- polimixina B (MYP), segundo recomenda Mossel et al. (1967). As placas foram incubadas a 30°C por 18- 40 horas e, ao final do período, foram observados os tipos de colônias presentes. Quando houver desenvolvimento microbiano, seriam

consideradas como sugestivas das espécies do grupo do *Bacillus cereus* as colônias esbranquiçadas, de aspecto rugoso e seco, medindo entre três e seis milímetros de diâmetro, rodeadas por um halo esbranquiçado formado pela ação da lecitinase e que não fermentaram o manitol (coloração rósea ao redor da colônia), como descreveram MOSSEL et al. (1967), RAIMUNDO E ROBBS (1988), STADHOUDERS, (1992b), te GIFFEL et al. (1995) Van NETTEN e KRAMER (1992) e WONG et al. (1988).

#### **5.4. *Clostridium sp***

*Clostridium sp.* por serem também formadores de esporos podem persistir nos alimentos devido a possuírem alta resistência às condições ambientais, alimentos que derivam de bovinos e aves têm sido os principais causadores de DTAs por *C. perfringens*, sendo a maioria ocorrida em locais como hospitais, escolas e restaurantes.

#### **5.5. Preparo das amostras e suas diluições**

Para a análise, 25 ml da amostra foram homogeneizados em 225 ml de água tamponada esterilizada. A partir desta diluição inicial a 10<sup>-1</sup>, foram preparadas uma série de diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente.

Para a contagem de *Clostridium sp.*, as diluições foram feitas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após esse procedimento, 0,1mL das diluições foram feitas em triplicata, plaqueamento direto em superfície contendo ágar infusão de cérebro e coração (BHI). Estas placas foram incubadas em condições de anaerobiose utilizando jarras de anaerobiose a temperatura de 35-37°C por 24-48 horas (APHA, 1992). Em todas as amostras analisadas, não foi observada presença de *Clostridium sp.*

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para representar os resultados das análises realizadas seguem expostos na tabela 2 a seguir.

**Tabela 2. Concentração dos parâmetros físico-químicos das amostras analisadas.**

PARÂMETRO	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Referência
PROTEÍNA (g%)	3,0	2,9	3,5	Mín. 2.9 g%
ACIDEZ TITULÁVEL (°D)	0,14	0,15	0,17	0,14 a 0,18 °D
BRIX <sup>0</sup>	10	12	11	Não há
ESTABILIDADE EM ÁLCOOL 72%	Estável	Estável	Estável	Estável
GORDURA (g%)	2,8	3,0	3,3	Mín.3.0g%
DENSIDADE (g/mL)	1,0268	1,0311	1,0316	1,028 a 1,034 (g/mL)

Os resultados das determinações analíticas físico-químicos do leite UHT integral correspondentes às diferentes marcas avaliadas estão descritos na tabela 1, onde se observa que as variações verificadas nos valores experimentais dos parâmetros proteína, acidez titulável, estabilidade, estão em conformidade com os valores de referência definidos pelo regulamento técnico de identidade e Qualidade do Leite UHT e regulamento técnico de identidade e Qualidade do Leite Cru e refrigerado. No tocante ao teor de gordura, a amostra A apresentou valor inferior ao estabelecido, bem como o valor desta amostra para a densidade. As amostras B e C estão em acordo com a legislação, nestes parâmetros.

A proteína do leite tem alto valor biológico, ou seja, é completa e de excelente qualidade com valor variando de e 3,3 a 3,5% (SGARBIERI, 2005). Neste estudo foram encontrados teores 2,9% e 3,5%, esses valores foram aproximados aos citados por Sousa et al. (2004), de 3,16 a 3,23g%. Estes valores encontram-se dentro do que a legislação estabelece para o produto em questão, de no mínimo 2,9g%. Estes valores indicam que o processo utilizado não causou a desnaturação

significativa destes componentes. Estes valores foram inferiores aos resultados determinados por LIMA et al. (2009) que variaram de 3,90 a 5,02 g por 100 ml.

Em relação à acidez titulável, os valores variaram de 0,14 a 0,17 g de ácido láctico/100 ml, indicando que as amostras avaliadas foram provenientes de leite UHT obtido em condições higiênico-sanitárias adequadas e mantido sob armazenamento apropriado.

A manutenção das condições higiênicas e de refrigeração e assim como o armazenamento são fundamentais para a qualidade do leite, sugerindo a inibição do processo de acidificação exógena proveniente do desdobramento da lactose em ácidos, ocasionando assim, o aumento de ácidos orgânicos, em especial o ácido láctico resultante da fermentação da lactose pelo metabolismo microbiano, pois os valores obtidos estão em conformidade com os padrões estabelecidos para o leite UHT. No trabalho de Lima e seus colaboradores (2009), pode-se verificar que os valores variaram de 0,186g a 0,205g por 100ml, valores estes que estão acima do limite da legislação, e acima dos valores encontrados no presente estudo, e indicam que pode ter ocorrido falta de higiene durante a produção, pois segundo Oliveira e Nunes (2003) acidez elevada no leite pode ser atribuída a acidificação da lactose provocada pela multiplicação de microrganismos.

Quanto ao teor de gordura das amostras, os valores médios encontrados, foram de 2,8, 3,0 e 3,3g%. As amostras B e C encontram-se dentro do esperado, de acordo com os limites exigidos pela legislação, de no mínimo 3,0g%. Estes valores, porém, são inferiores aos encontrados por Rosa e Garbin (2015), de 3,4g% em média, em amostras oriundas de Erechim-RS. Comparando com os valores encontrados no estudo das amostras de leite UHT comercializadas na cidade do Rio de Janeiro, em que a média encontrada para este parâmetro foi de 3,21g%, os valores encontram-se próximos (ROBIM et al, 2012). O teor de gordura da amostra A encontra-se abaixo do limite estabelecido, 2,8g%.

Quanto à determinação da densidade das amostras, B e C obtiveram valores de 1,0311 e 1,0316 respectivamente, valores estes que se encontram dentro do regulamento para este produto. A densidade da amostra A foi de 1,0268, e este valor é menor do que o valor mínimo para este tipo de produto. A densidade tem importância tecnológica, quando se pretende calcular o peso do leite requerido,

quando se investiga uma possível adulteração no leite e na hora de homogeneização e estabilização do teor de gordura (SPRESER, 1991), e de acordo com Luquet (1991), a densidade pode servir de base para uma detecção sumária e bastante rápida de fraude por adição de água. Segundo Polegato e Rudge (2003), valores de densidade abaixo de 1,028 pode indicar a adição de água e valores acima de 1,034 podem indicar adição de outras substâncias ao leite.

Nos valores de °Brix, foram encontrados 10, 12 e 11° respectivamente, para as amostras A, B e C. O °Brix representa o teor de sólidos solúveis totais, e no leite são representados pelos ácidos, sais, vitaminas, aminoácidos, algumas proteínas e açúcares, entretanto, a fração de açúcar é maior que a dos outros atributos, o que na prática, consideram-se sólidos solúveis totais como açúcar (BASTOS, 1999). Estes valores estão de acordo com os encontrados e reportados por Faedo e seus colaboradores (2013), que foi de 10,1°.

A determinação da estabilidade do leite ao álcool indica se o mesmo é resistente ao tratamento térmico a uma dada temperatura (SILVA, 2004). Os sais representam menos de 1% do leite, mas influenciam a estabilidade térmica do leite UHT (UAT) à coagulação pelo álcool (PRATA, 2001). A prova do álcool pode ser usada como um método rápido para estimar a estabilidade das proteínas do leite. E esta prova verifica a estabilidade da caseína, criando uma situação de estresse à proteína por meio de uma solução alcoólica que simula o efeito do aquecimento provocado pelo processamento térmico (O'CONNELL et al., 2001) As três amostras testadas apresentaram estabilidade quando submetidas à prova do álcool 72%. Melo JR (2005) realizou um estudo de estocagem em leites tipo UHT por 120 dias, e observou um decréscimo progressivo desta estabilidade, acompanhada de redução de pH ao longo da vida-de-prateleira nesse tipo de leite. Durante o armazenamento, existe a tendência da produção de ácido lático e redução de pH, o que favorece a desestabilização da emulsão do leite.

Quanto à avaliação microbiológica foram utilizadas as análises de contagem bacteriana pelo manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos (SILVA et al, 2007). Os resultados obtidos foram associados à portaria Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 1998).

Maieski (2011), em sua avaliação sobre os principais microrganismos patogênicos que afetam a qualidade do leite, mostra que todas as provas que

existem para determinar no leite o grau de contaminação do próprio leite. Com relação ao leite UHT as provas servem para detectar se a Ultra pasteurização foi ineficiente ou se houve falha no processo. (BOOR; MURPHY, 2002).

Para representar os resultados das análises microbiológicas seguem expostos na tabela 3 a seguir.

**Tabela 3. Análise microbiológica em leite UHT integral comercializados em supermercados da cidade Ponta Grossa e seus respectivos parâmetros de referência.**

Microrganismos pesquisados	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Referência Padrão RDC
<i>Bacillus cereus</i>	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	10 UFC/g
<i>Clostridium sp.</i>	<10 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	5x10 <sup>2</sup>

Diferentes autores estudando leite UHT em várias regiões do Brasil relataram contagens fora do padrão estabelecido pela Portaria nº 370 (BRASIL,1997) para contagem de aeróbios mesófilos (COELHO et al. 2001, VIDAL-MARTINS et al. 2005; BERSOT et al. 2010, TAMANINI et al. 2011). No entanto Rezer (2010) e Rossi Junior et al. (2006) não encontraram amostras fora do padrão para estes micro-organismos Bersot et al. (2010) analisaram 150 amostras de leites UHT integrais de 3 diferentes marcas e encontraram a predominância de cocos Gram positivos. Coelho et al. (2001) selecionaram 174 colônias para identificação morfológica e todas foram identificadas como Gram-positivas, sendo 98,3% de bastonetes e 1,7% cocos. A maior resistência das bactérias Gram positivas ao calor, em relação às Gram negativas, é bastante conhecida. Entre as Gram positivas, Jay (2005) aponta os cocos como sendo geralmente mais resistentes ao calor do que bastonetes não formadores de esporos. Integrantes do gênero *Bacillus* representaram 38,4% dos Gram positivos encontrados. Esses microrganismos são de origem ambiental e apresentam capacidade de formação de esporos. São de grande importância em alimentos, pois em várias espécies, tanto a forma vegetativa como os esporos são altamente resistentes ao calor. Os esporos são ainda bastante

resistentes a radiações ionizantes, compostos químicos, desidratação e congelamento (FRANCO; LANGRAF, 2008). Já que a presença de células germinadas pode tornar o leite inaceitável para consumo. Porém neste trabalho não foram encontrados microrganismos destes gêneros.



## 7. CONCLUSÃO

Acerca dos resultados para as amostras de leite UHT analisadas, todas as amostras encontram-se dentro dos padrões físico-químicos e microbiológicos realizados pelo presente estudo, com exceção do teor de gordura, em que uma das marcas apresentou valor inferior ao estabelecido pela legislação. Sugere-se que a análise de crioscopia seja incluída assim que possível, já que é uma análise de maior precisão, principalmente no quesito às adulterações, tão visadas na atualidade.

## 8. REFERÊNCIAS

- BASTOS, M. S. R. Leite longa vida UHT: Aspectos do processamento e identificação dos pontos críticos de controle. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 13, n. 66/67, 1999.
- CECCHI, Heloisa Márcia. *Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos*. Editora Unicamp, Campinas, 1999. p. 23, 1999.
- Decreto nº 29.651, de 8 de junho de 1951. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Rio de Janeiro, DF, 11 jul. 1951. Seção 1, p. 10281.
- FAEDO, R.; BRIÃO, V. B.; CASTOLDI, S.; GIRARDELLE, L.; MILANI, A.. Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados á hidrólise enzimática. *Rev. CIATEC-UPF*, Passo Fundo, RS: vol. 3, p. 44-54, 2013. Disponível em: . Acesso em: 23 out. 2016.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. 182 p. GILLIS, W. T.; CARTLEDGE, M. F.; RODRIGUES.
- GOUFF, H. D.; GRIFFITHS, M. W. Major advances in fresh milk and products: fluid milk products and frozen disserts. *J Dairy Science*, v. 89, p. 1163-73, abr. 2006.
- Haug A, Hostmark AT, Harstad OM. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids Health Dis*. 2007;6: 1–16.
- INSTITUTO Adolfo Lutz, *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 3 ed. São Paulo: Imesp, 1985, v.1, 533p.
- LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO – Lanagro/RS. *Laboratório de produtos de origem animal, determinação de acidez titulável em leite fluido*, RS 2013.
- LIMA, F. M.; BRUNINI M. A.; MACIEL JR V. A.; MORANDIN C. S.; RIBEIRO C. T. *Qualidade de leite UHT integral e desnatado, comercializado na cidade de São Joaquim da Barra, SP 2009*.
- LUQUET, F. M. *Leche y productos lácteos*. Acribia: Zaragoza, 1991. 390p
- MARTINS, A. M. C. V.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; SALOTTI, B. M.; BÜRGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físicoquímicas do leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 28, n. 2, p. 295-298, 2008.
- MELO JR, A. S. *Influência da contagem de células somáticas e microrganismos psicotróficos na gelificação e sedimentação do leite UAT*. Lavras, MG, UFLA, 2005. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, 2005.
- NERO, L. A.; MATTOS M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. *Leite cru de quatro regiões*

leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan./mar. 2005.

PACHECO, M. T. B.; ANTUNES, A. E. C. Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência. 1ª ed. Livraria Varela, São Paulo–SP, p. 165-440, 2009.

Pedrini S.C.B. & Margatho L.F.F. 2003. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. Arq. Inst. Biológico, São Paulo, 70(4):391-395.

PENNA, C. F. de. A. M. Determinação da densidade do leite. Belo Horizonte: Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, 2001. p.9(apostila).

POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo/ Brasil. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.

Rosa LS. Avaliação do processo de ultrafiltração do leite: modelagem matemática preditiva na caracterização do fluxo de permeado in seleção de culturas lácticas no processo de pré-fermentação em leite concentrado por membrana ultra filtrante para a elaboração de queijo tipo prato [tese]. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande; 2011.

ROSENTHAL, I. Milk and dairy products: properties and processing. Weinheim, New York: VCH Publishers Inc., 1991.

SGARBIERI, V.C., Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. Brazilian Journal of Food Technology, v.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005.

SILVA, N. et al. Contagem de Bactérias Lácticas. In: SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2007. cap. 14, p.183-189.

SOUSA, L. G. de. Avaliação da composição do leite UHT proveniente de dois laticínios das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná. Acta Scientium Animal Science, Maringá, v.26, n.2, p.259-264, 2004.

SPRESER, E. Lactologia Industrial. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1991.

Tronco VM. Controle Físico-Químico do Leite. In: Manual para Inspeção da Qualidade do Leite. 1997. Santa Maria (RS): UFMS, 103-5.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Ed.). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 5. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 23 p.