



UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO
TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ELIFAZ PEREIRA RIBEIRO DA SILVA

**Rotina de inspeção da qualidade de leite fluído e rastreamento de
contaminação microbiológica de queijo tropical ralado.**

Araguaína

2023

ELIFAZ PEREIRA RIBEIRO DA SILVA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO: Rotina de inspeção da qualidade de leite fluído e rastreamento de contaminação microbiológica de queijo tropical ralado.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à UFNT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína, Curso de Medicina Veterinária para a obtenção do título de Médico Veterinário, sob orientação do Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Junior.

Araguaína

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

P436r PEREIRA RIBEIRO DA SILVA, ELIFAZ.

Rotina de inspeção da qualidade de leite fluído e rastreamento de contaminação microbiológica de queijo tropical ralado.: RASTREIO DE SALMONELLA SPP, COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES E ESCHERICHIA COLI EM QUEIJO RALADO TIPO TROPICAL. / ELIFAZ PEREIRA RIBEIRO DA SILVA. – Araguaína, TO, 2023.

43 f.

Relatório de Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Medicina Veterinária, 2023.

Orientador: JOSÉ CARLOS RIBEIRO JÚNIOR

1. Análises microbiológicas. 2. análises físico-químicas. 3. Rotina da inspeção do leite fluído. 4. Queijo tropical ralado. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

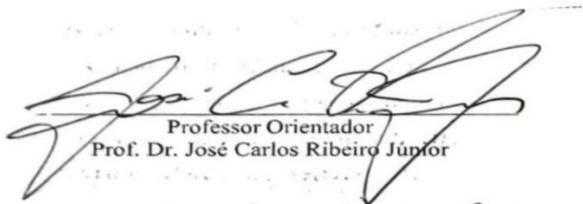
ELIFAZ PEREIRA RIBEIRO DA SILVA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO: Rotina de inspeção da qualidade de leite fluído e rastreamento de contaminação microbiológica de queijo tropical ralado.

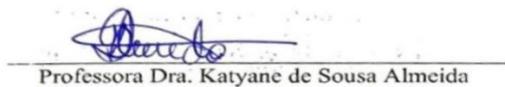
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à UFNT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína, Curso de Medicina Veterinária para a obtenção do título de Médico Veterinário, sob orientação do Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Junior.

Aprovado em: 16/11/2023

Banca examinadora:


Professor Orientador
Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior


Professora Dra. Cátia M. De Oliveira Lobo


Professora Dra. Katyane de Sousa Almeida

ARAGUAÍNA

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus pelas portas abertas e benções concedidas a mim em forma de pessoas e oportunidades. Minha gratidão aos meu pais e meu irmão Wesley que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso, onde nunca puseram obstáculos ou empecilhos por mais impossíveis que parecessem os desafios. Dedico essa conquista a você Edimar e a você Maria Lúcia, que nunca mediram esforços pra conquistar o melhor para os seus filhos, e os vê-los formados e bem sucedidos em suas ações.

Agradeço aos meus amigos Max Martins e Bianca Dias (o Mg da minha Taq) pelo incentivo e parceria em todo esse processo acadêmico e fora dele, deixando todo o percurso mais leve. Não menos importante, agradeço também ao homem que foi responsável pela divisão de águas na minha vida acadêmica, meu orientador prof. José Carlos, um exemplo de profissional o qual me inspiro, desde a recepção de braços abertos no laboratório, a todo apoio e enormes oportunidades a mim concedidas, como ele mesmo diz “é um prazer ensinar pra quem quer aprender” e eu devolvo em resposta dizendo, é um prazer ser orientado de quem sabe, quer e gosta de ensinar. Agradeço também a Cristiane por toda paciência, dedicação, ensinamentos e acolhimento com seus apelidos carinhosos.

Agradeço a toda a equipe LABMA, em especial minha amiga Nara, mulher de grande garra e inspiração. Não deixando de fora meus agradecimentos à equipe LIPOA em nome do Ronaldo e Giovanna pela receptividade, ensinamentos e acolhimento no estágio curricular, onde sem dúvidas foi uma grande experiência, acadêmica, profissional e pessoal.

Mais uma etapa sendo concluída e com certeza muitas outras estão por vir, novos desafios e oportunidades, que a força esteja conosco e que nunca nos falem sonhos e desejos em realiza-los, com a graça e bondade de Deus.

RESUMO

O relatório de estágio supervisionado tem por objetivo esclarecer as atividades realizadas durante todo período, podendo ser complementado e/ou comparado com informações encontradas na literatura. O estágio aconteceu no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) localizado na Rodovia Celso Garcia Cid, PR-445, Km 380 - Campus Universitário, Londrina - PR, 86057-970, sob supervisão do Prof. Dr. Rafael Fagnani e sob orientação do Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior. O estágio ocorreu no período de 14 de agosto a 25 de outubro de 2023, totalizando 400 horas. Durante todo o período de estágio foram acompanhadas todas as atividades em laboratório incluindo as análises físico-químicas e microbiológicas realizadas em leite cru, como acidez, alizarol, crioscopia, gordura, contagem bacteriana total e lactofermentação, e em leite pasteurizado analisando, índice crioscópico, fosfatase, peroxidase, contagem de enterobactérias e lactofermentação, assim como na fazenda escola em sua rotina com manejo dos animais e ordenha das três vacas em lactação no período do estágio realizado. Assim como também foram acompanhados projetos desenvolvidos pelos residentes. Uma das atividades realizadas incluíram o acompanhamento do rastreamento de coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em um estabelecimento privado que adquire o queijo e a vende ralada no norte do Paraná, sumarizado nesse relatório. A rotina dos residentes e estagiários foi sempre supervisionada pelo técnico do laboratório Ronaldo Tamanini e o professor responsável Prof. Dr. Rafael Fagnani, para um melhor aperfeiçoamento profissional.

Palavras chave: Análises Microbiológicas, Inspeção, Laboratório, Leite.

ABSTRACT

The supervised internship report aims to clarify the activities carried out throughout the period, and can be complemented and/or compared with information found in the literature. The internship took place at the Laboratory of Inspection of Products of Animal Origin (LIPOA) located at Rodovia Celso Garcia Cid, PR-445, Km 380 - Campus Universitário, Londrina - PR, 86057-970, under the supervision of Prof. Dr. Rafael Fagnani and under the guidance of Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior. The internship took place from August 14 to October 25, 2023, totaling 400 hours. Throughout the internship period, all laboratory activities were monitored, including the physicochemical and microbiological analyses carried out in raw milk, such as acidity, alizeol, cryoscopy, fat, total bacterial count and lactofermentation, and in pasteurized milk analyzing, cryoscopic index, phosphatase, peroxidase, enterobacteria count and lactofermentation, as well as on the school farm in its routine with management of the animals and milking of the three lactating cows in the period of the internship carried out. As well as projects developed by the residents were also followed. One of the activities carried out included the monitoring of the screening of total and thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in a private establishment that acquires the raw material and sells it grated in northern Paraná. The routine of residents and trainees has always been supervised by laboratory technician Ronaldo Tamanini and the professor in charge Prof. Dr. Rafael Fagnani, for better professional improvement.

Kew words: Microbiological Analysis, Inspection, Laboratory, Milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Foto da vista externa do laboratório -----	12
Figura 2- Gráfico demonstrando divisão das atividades desenvolvidas no estágio em porcentagem da carga horária-----	13
Figura 3- Fluxograma das análises de leite pasteurizado no laboratório de inspeção de produtos de origem animal (LIPOA). Londrina-PR-----	14
Figura 4- Fotos do processo de diluição das amostras na presença do fogo-----	16
Figura 5- Foto do kit fosfatase (substrato, solução reagente e catalizador). Resultado do teste da fosfatase, coloração azul amostra positiva, coloração acinzentada amostra negativa. -----	22
Figura 6- Foto do resultado da análise de peroxidase, comparando o método oficial do não oficial-----	23
Figura 7- Foto do material utilizado no teste da titulação de acidez. Ponto de viragem da amostra-----	24
Figura 8- Foto do material utilizado no teste do alizol. A coloração da amostra e a ausência de grumos ou coágulos denotam que o leite testado possui estabilidade térmica após a realização da prova -----	25
Figura 9- Foto do material utilizado no teste da densidade. Realização da prova da densidade com o uso do termolactodensímetro -----	26
Figura 10- Fotos do processo da quantificação de gordura com o uso do butirômetro. Quantificação da gordura na escala do butirômetro -----	27
Figura 11- Foto do processo de pesagem das 25g representativas de toda a peça do produto. Diluição das alíquotas com swab -----	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Resultados obtidos de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* no rastreamento da contaminação de queijos tropicais em estabelecimento inspecionado no norte do Paraná no período de 18 de setembro a 4 de outubro de 2023 -----36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
°H	Graus Hortvath
µl	Microlitros
AFNOR	Association Française de Normalisation
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais
BPLS	Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose
CC	Contagem de coliformes totais
CMT	Califórnia Mastite Teste
Dr°	Doutor
Drª	Doutora
E.COLI	<i>Escherichia coli</i>
EB	Enterobactérias
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
H	Horas
IDF	Montipó apud FIL
ISO	International Organization for Standardization
KOH	Hidróxido de potássio
LIA	Agar Lisina Ferro
LIPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MKTTn	Caldo Base Tetrionato Novobiocina Tetrionato Mueller Kauffman

ML	Mililitro
N°	Número
NAOH	Hidróxido de sódio
NMP	Número Mais Provável
PCA	Plate Count Agar
PH	Potencial Hidrogeniônico
PPM	Partes por milhão
PR	Paraná
PROF.	Professor
UFC	Unidade formadora de colônia
Prof^a	Professora
R1	Residentes de primeiro ano
R2	Residentes de segundo ano
RIISPOA	O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RPM	Indicação de velocidade atual
RVS	Caldo Rappaport Vassiliadis
S100	Desincrustante alcalino clorado não espumante
TSI	Agar Tríplice Açúcar Ferro
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges Proskauer
VRBG	Bile Vermelho Violeta Glicose
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	14
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	15
3.1 Fluxograma das análises do leite	16
3.1.1 Recebimento do leite.....	17
3.1.2 Análise microbiológica.....	17
3.1.3 Procedimento de diluição das amostras	18
3.1.4 Contagem de enterobactérias.....	19
3.1.5 Lactofermentação	20
3.1.6 Contagem de aeróbios mesófilos.....	21
3.1.7 Detecção e isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	21
3.1.8 Contagem de coliformes a 30°C e 45°C	22
3.1.9 Contagem de <i>Escherichia coli</i>	23
3.1.10 Análises físico-químicas	23
3.1.11 Índice crioscópico (em leite pasteurizado e cru).....	23
3.1.12 Fosfatase (em leite pasteurizado).....	24
3.1.13 Peroxidase (em leite pasteurizado)	26
3.1.14 Titulação da acidez pelo método Dornic (em leite cru)	27
3.1.15 Alizarol (em leite cru).....	28
3.1.16 Densidade (em leite cru).....	29
3.1.17 Gordura (em leite cru)	30
4. MANEJO DE ORDENHA	31
4.1 limpeza de utensílios e equipamentos da ordenha	33
5. MANEJO DOS ANIMAIS	34
6. RASTREIO DE <i>SALMONELLA</i> SPP, COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES E <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM QUEIJO RALADO TIPO TROPICAL	35
6.1 Introdução	35
6.2 Material e métodos	36
6.3 Resultados e discussão	38
6.4 Conclusão	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma posição de destaque na produção de leite estando presente em quase todos os municípios brasileiros, tornando o leite, um dos sete produtos agropecuários com maior valor bruto de produção (Embrapa, 2020). Na indústria de alimentos do Brasil, a indústria de laticínios se destacou com segundo maior faturamento da indústria voltada para alimentos, perdendo apenas para o setor relacionado a derivados de carne (DE MARCO, Edenara,2020).

Apesar da remuneração nem sempre estar compatível com a qualidade da matéria prima ofertada, e à presença de crises econômicas, a atividade na indústria leiteira nacional tem se mostrado promissora. Em cerca de uma década teve um aumento de mais de 50% em sua produção (PINHEIRO, 2012; MALISZEWSKI, 2020).

Em caso de produtos lácteos ou derivados obtidos para exportação, cabe ao Ministério da Agricultura e pecuária, através da Secretaria de Defesa Agropecuária, controlar e também regulamentar toda mercadoria de origem animal, garantindo qualidade e inocuidade do produto. Além disso, compete ao ministério, com as secretarias de agricultura do estado, promover uma ampla fiscalização, visando a conformidade entre a legislação de inspeção industrial e sanitária brasileira e as normas de sanidade exigidas pelo país importador (BRASIL, 2017).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018), os critérios utilizados para garantir tanto a segurança quanto a higiene de alimentos, são os padrões microbiológicos, devendo ser atendidos até o último dia de validade do produto. Já os padrões relacionados à segurança incluem os micro-organismos patogênicos, suas toxinas e metabólitos de relevância presentes no produto. E em relação aos padrões de higiene incluem-se os micro-organismos indicadores (BRASIL, 2019).

A análise microbiológica é uma importante ferramenta na obtenção de dados, fornecendo informações sobre qualidade, higiene e segurança dos alimentos, e essa medida vem sendo adotada na indústria de alimentos como forma de controle de qualidade (WATANUKI,2008).

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária foi realizado na área de inspeção de produtos de origem animal no departamento

de medicina veterinária preventiva, no período de 14/08/2023 a 25/10/2023 de 2023, com carga horária semanal de 40 horas, totalizando um total de 400 horas, sob supervisão do Prof. Dr. Rafael Fagnani.

Para a escolha do local de estágio foram levadas em consideração o papel do laboratório de inspeção de produtos de origem animal, na análise microbiológica e físico-química do leite, assim como manejo na ordenha e acompanhamento da rotina na fazenda escola no município de Londrina no Paraná. O laboratório possui uma estrutura adequada e uma equipe técnica capacitada com projetos, residência, mestrado e doutorado em andamento durante o estágio curricular, com horário de funcionamento de 8:00 às 12 horas, e das 14:00 às 18:00 horas de segunda a sexta, com plantões intercalados entre os residentes aos sábados, domingos e feriados.

2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio curricular obrigatório foi realizado no laboratório de inspeção de produtos de origem animal (LIPOA – Figura 01) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) no município de Londrina (PR), entre os dias 14 de agosto de 2023 a 25 de novembro 2023, totalizando 400 horas de estágio supervisionado.

O estágio curricular obrigatório foi iniciado com uma breve elucidação da rotina e das atividades desempenhadas pela equipe formada por 4 residentes R1, 4 Residentes R2, e o técnico do laboratório., em seguida foi feita uma apresentação dos setores, laboratório e fazenda escola.

Figura 01 – Foto da vista externa do laboratório.



Fonte: Autor (2023)

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o estágio curricular obrigatório foram realizadas diversas atividades relacionadas a rotina laboratorial como preparo de amostras, materiais, vidrarias e meios de cultura, análises microbiológicas e físico-químicas do leite, descarte de material contaminado, lavagem de material e vidrarias; como também, acompanhamento da rotina na fazenda, incluindo manejo e ordenha,

As análises realizadas para o leite recebido tanto da vigilância sanitária quanto de instituições particulares divididas em duas partes: análises microbiológicas de leite e derivados, nas quais foram analisados: contagem de enterobactérias e lactofermentação; e análises físico-químicas do leite analisando: índice crioscópico, fosfatase e peroxidase.

Enquanto que do leite oriundo da fazenda escola, as análises microbiológicas foram: contagem bacteriana total, e lactofermentação. Enquanto que as físico-químicas foram: acidez, alizarol, crioscopia e densidade.

Durante todo o período de estágio permitiu-se o acompanhamento das análises microbiológicas, físico-químicas rotina na ordenha e manejo dos animais pertencentes à fazenda escola.

Dessa forma objetivou-se participar do maior número possível de atividades desenvolvidas em cada setor. A divisão de horas de estágio (Figura 02), de acordo com cada setor foi sucedida da seguinte maneira: Análises microbiológicas, análises físico-químicas, ordenha e manejo.

Figura 02– Gráfico demonstrando divisão das atividades desenvolvidas no estágio em porcentagem da carga horária



Fonte: Autor (2023)

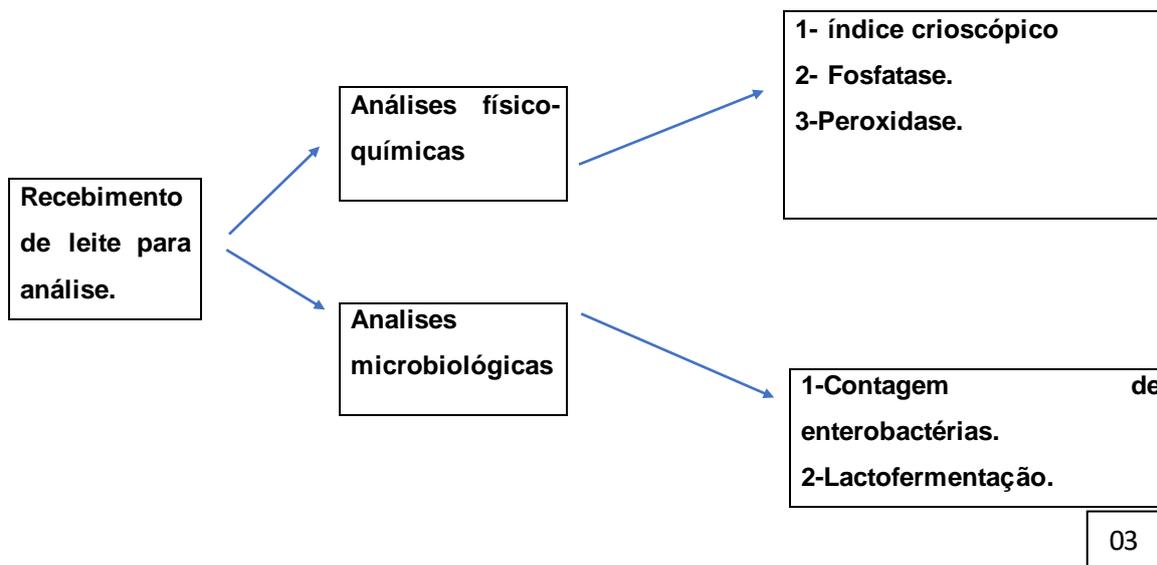
As atividades executadas pelos residentes e estagiários, eram sempre supervisionadas tanto pelo técnico do laboratório quanto pelos professores responsáveis.

Ao longo do estágio como parte do processo de aprendizado, equipes de residentes e estagiários eram divididas para participação em aulas práticas referentes às atividades desenvolvidas em laboratório. A implementação de tal dinâmica se mostrou imprescindível para a melhor compreensão das atividades posteriores.

3.1 Fluxograma das análises do leite

As atividades desenvolvidas foram realizadas de acordo com cada etapa de análise seguindo o fluxograma das análises (Figura 03) e serão descritas a seguir.

Figura 03 – Fluxograma das análises de leite pasteurizado no laboratório de inspeção de produtos de origem animal (LIPOA). Londrina - PR.



Fonte: Autor (2023).

3.1.1 Recebimento do leite

As amostras e contra provas, chegavam na recepção do laboratório por dois vieses distintos, por solicitação de análises da vigilância sanitária, ou através do pedido de análises por empresas privadas. Na recepção, os residentes faziam a verificação documental recebendo e conferindo o termo de apreensão que acompanhava cada amostra e sua respectiva contraprova, aferindo também a temperatura do leite recebido, na qual o leite precisava chegar numa temperatura máxima de 4°C, de acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2018). Preenchiam-se as fichas de recebimento com as informações pertinentes, depois realizou-se a lavagem das embalagens com sabão e água corrente, identificava-se cada uma das amostras e suas respectivas contraprovas e logo após eram postos em uma geladeira de temperatura regulada de 2 a 8 °C, até a realização das análises microbiológicas e em sequência as físico-químicas.

3.1.2 Análise microbiológica

Para a realização das análises microbiológicas, é necessário o preparo das vidrarias e dos meios de cultura, ou o uso de Petrifilm, sendo o mesmo um meio de cultura desidratado que fornece todos os nutrientes necessários para o

crescimento de bactérias. Um meio de cultura consiste em uma formulação líquida, sólida (ágar) ou semi-sólida (pouco ágar) utilizada especificamente para o crescimento, armazenamento ou transporte de micro-organismos ou outros tipos de células (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

O meio de cultura atende às necessidades específicas do grupo, da família, do gênero ou da espécie cultivado, permitindo seu cultivo fora de seu "habitat" natural. Os meios e soluções utilizados foram formulados e produzidos seguindo-se os critérios dos métodos de análise utilizados para os gêneros pesquisados, em ambiente.

Durante o período de estágio foi acompanhada a realização de análise microbiológica de 20 amostras de leite pasteurizado e 11 amostras de leite cru. Foram pesquisadas no leite pasteurizado: enterobactérias, realizada a técnica de contagem através da inoculação por superfície em petrifilm EB de acordo com o método oficial do MAPA, AFNOR 3M 01/06-09/97 e lactofermentação fornecendo resultado na leitura da amostra de 10 ml após incubação a 37°C por 24 horas. Já para o leite cru foram pesquisados: Aeróbios mesófilos viáveis a 30°C utilizando a contagem por inoculação em profundidade usando o agar PCA (Plate Count Ágar) de acordo com a ISO 4833-1, e também a lactofermentação para uma análise rápida sobre a qualidade desse leite cru.

3.1.3 Procedimento de diluição das amostras

Para realização da maioria das análises das amostras era necessário a preparação das diluições para obtenção das amostras, procedimento este que tem por objetivo reduzir a concentração de uma das substâncias através da adição de uma substância à outra (Figura 4, A e B).

A preparação e inoculação de diluições seriadas da amostra tem por objetivo reduzir o número de micro-organismos por unidade de volume, facilitando assim na contagem de placas. Obtendo dessa forma na contagem dessas placas um número de colônias entre 25 e 250 UFC/ml; na contagem em petrifilm um limite permitido de até no máximo 10 UFC/ml; também podendo ser realizada a contagem das colônias presentes pelo método do Número Mais Provável (NMP).

Figuras 04, A e B – Processo de diluição das amostras na presença do fogo.



Fonte: Autor (2023).

3.1.4 Contagem de enterobactérias

Muitos dos micro-organismos que compõem a família Enterobacteriaceae são capazes de estabelecer as bactérias sacarolíticas e a contaminação de origem ambiental no produto. A Instrução Normativa número 161 de 1º de julho de 2022, estabelece os critérios microbiológicos para leite pasteurizado como estando próprios para consumo aquelas amostras que apresentarem, no máximo, 10 UFC/mL de Enterobacteriaceae (BRASIL, 2022).

Como método para a avaliação da qualidade das amostras de leite pasteurizado, foi realizada a técnica de contagem de enterobactérias através da inoculação por superfície em petrifilm EB de acordo com AFNOR 3M 01/06-09/97 (metodologia oficial MAPA).

Pode-se usar também a técnica de Contagem por inoculação em profundidade pelo método ISO 21528-2 uma metodologia também oficial do MAPA (BRASIL,2022). Esse método de análise para enterobactérias com inoculação em profundidade usa o agar VRBG (Bile Vermelho Violeta Glicose) segundo a ISO 21528-2 (metodologia oficial MAPA), visando determinar a população de enterobactérias em amostras de leite pasteurizado, analisando assim a eficiência no processo de pasteurização e armazenagem do produto.

3.1.5 Lactofermentação

É uma análise rápida sobre a qualidade do leite, que pode ser utilizada para o controle de qualidade da matéria-prima, sendo imprescindível o uso de análises oficiais e complementares para um diagnóstico preciso. Com essa prova é possível identificar problemas como, presença de micro-organismos psicrotróficos, proteolíticos, coliformes e antibióticos apenas com a prova da lactofermentação.

Essa análise fornece resultados em 24 horas e pode ser usada como um controle de qualidade da matéria prima. A técnica se baseia na leitura do aspecto de coagulação de 10 ml do leite formado após 24h de incubação a 37°C, e o tipo de coágulo (Figura 16) nos indica qual grupo de micro-organismos é predominante na amostra (SOUSA,2020).

No coágulo gelatinoso, há presença de um coágulo firme, brilhante, uniforme e sem bolhas, o soro indica a presença de bactérias ácido lácticas, e devido ao baixo PH, o leite coagula. No coágulo esponjoso, observa-se a formação de bolhas de gás na amostra conferindo um aspecto de esponja, nesses casos os microrganismos predominantes são os coliformes, os quais fermentam a lactose e produzem gás decorrente do seu metabolismo. No coágulo digerido, sua principal característica é a formação de soro com encolhimento do coágulo, sendo típico das bactérias psicrotróficas proteolíticas. E na ausência de coágulo, a amostra continua no mesmo estado de quando foi colocada no tubo após Incubação, ainda líquida exceto pela formação da linha de creme, o que indica que alguma substância está inibindo a multiplicação das bactérias naturais do leite, como por exemplo, resíduos de antibióticos, sanitizantes ou presença de conservantes (SOUSA,2020).

Durante o período de estágio foi possível acompanhar a realização de aproximadamente 31 ensaios de leite cru e pasteurizado, e os principais resultados foram: ausência de coágulo e coágulo gelatinoso respectivamente.

3.1.6 Contagem de aeróbios mesófilos

A contagem de micro-organismos mesófilos é um importante indicador da qualidade do leite, as quais predominam em situações de falhas higiênico-sanitárias, bem como na inadequada refrigeração do leite. Tais microrganismos se multiplicam em temperatura ótima entre 25°C e 40°C, com mínima entre 5°C e 25°C, e máxima entre 40°C e 50°C, os quais correspondem à grande maioria entre os micro-organismos de importância em alimentos (LANGONI,2011).

As análises determinaram os microrganismos mesófilos aeróbios viáveis a 35°C, pela técnica de Contagem por inoculação em profundidade, seguindo o método ISO 4833-1 (DA SILVA,2017).

Durante o período de estágio foi possível acompanhar a realização de aproximadamente 11 ensaios de leite cru, e os principais resultados foram uma contagem de aeróbios mesófilos dentro do padrão permitido uma vez que seja de no máximo $1,0 \times 10^4$ UFC/mL de acordo com a Instrução Normativa N° 51, de 3 de agosto de 2020.

3.1.7 Detecção e isolamento de *Salmonella* spp.

A *Salmonella* spp. é uma bactéria Gram negativa, que possui a capacidade de formar ácido e gás a partir da fermentação da glicose. Apresentam uma temperatura ideal de crescimento de 5 °C a 47°C, sendo eliminada quando exposta a temperaturas a partir de 70°C (PUI *et al.*, 2011), este é motivo que a sua presença em produtos lácteos está intensamente relacionada com a utilização do leite cru ou a um processo de pasteurização ineficiente (FRANCO; LANDGRAF e DESTRO, 2005).

A Instrução Normativa N° 20, De 21 De outubro de 2016 prevê a detecção de *Salmonella* Spp. Como sendo em presença ou ausência do micro-organismo na alíquota comprovada. Sendo assim, a análise qualitativa de *Salmonella* spp., como sendo um indicador de segurança microbiológica é executada seguindo as normas recomendadas pela ISO 6579-1 (metodologia oficial MAPA). A partir da recuperação das colônias em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e BPLS (ágar verde brilhante vermelho de fenol), as quais todos os isolados típicos foram encaminhados para os testes bioquímicos

como: ágar ureia, ágar TSI (Tríplice Açúcar Ferro), e caldo lisina, para a confirmação de *Salmonella* spp.

Durante o período de estágio foi possível acompanhar a realização de 2 ensaios de leite cru, e os resultados foram negativos para *Salmonella* spp.

3.1.8 Contagem de coliformes a 30°C e 45°C

Também chamados de coliformes totais, esses indicadores formam um grupo da família *Enterobacteriaceae* fermentando lactose e glicose, enquanto as demais enterobactérias fermentam apenas a glicose. Como resultado dessa fermentação há a formação de ácido e gás, produtos importantes na identificação desses indicadores.

A denominação de coliformes a 30 °C se dá com a finalidade de diferenciação para com os coliformes termotolerantes, os quais fermentam a lactose com produção de gás quando incubados a 45°C, os mesmos possuem relação com a possível contaminação fecal, servindo como importante ferramenta na obtenção de informações sobre as características higiênico-sanitárias dos alimentos para consumo.

As análises para coliformes a 30°C foram realizadas por meio de inoculação em superfície em Petrifilm EC de acordo com o método AOAC 991.14 (metodologia oficial MAPA).

A presença de coliformes nos alimentos pode ser utilizada como indicativo de contaminação após o processo de pasteurização ou relacionado com a má estocagem do produto. As bactérias deste grupo estão relacionadas à deterioração dos queijos tipo frescal e são consideradas como os principais agentes contaminantes nos mesmos, produzindo fermentações anormais e estufamento precoce desses produtos, além de possíveis intoxicações alimentares (OKURA, M.H. *et al.*,2006).

Durante o período de estágio foi possível acompanhar a realização de 5 ensaios de leite cru e pasteurizado, e os resultados foram encontrados dentro do padrão para ambas as contagens, de acordo com a Instrução Normativa N° 51, de 3 de agosto de 2020.

3.1.9 Contagem de *Escherichia coli*

As bactérias da espécie *Escherichia coli* são importantes indicadores de contaminação fecal possuindo grande relevância para a vigilância sanitária, a quem cabe verificar essa questão, sendo usados como indicadores em todos os produtos pertencentes a cadeia láctea, também podendo usados para a avaliação da qualidade da água na indústria, servindo este muitas vezes como carreador de contaminação fecal para os alimentos. As análises de *Escherichia coli*, foram realizadas mediante inoculação por superfície em Petrifilm EC, segundo AOAC 998.08 (metodologia oficial MAPA). Nesse método, compartilhado com os coliformes totais, as *E. coli* são diferenciadas por formação de colônias Azuis com presença de gás.

Durante o período de estágio foi possível acompanhar a realização de aproximadamente 20 ensaios de leite pasteurizado, e os resultados foram dentro dos padrões de contagem de acordo com a Instrução Normativa Nº 51, de 3 de agosto de 2020.

3.1.10 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas também indicam a qualidade do leite. A importância das análises consiste na detecção dos parâmetros normais de qualidade e possível ocorrência de fraudes como, por exemplo, a adição de água, desnate, superaquecimento, etc. A ausência da realização das análises físico-químicas, enzimáticas e microbiológicas, além de impossibilitar a avaliação da qualidade do leite pasteurizado, inviabiliza a rápida identificação e imediata correção das prováveis falhas de beneficiamento (BELOTI, 2015).

3.1.11 Índice crioscópico (em leite pasteurizado e cru)

O índice crioscópico está relacionado com a temperatura a qual ocorre o ponto de congelamento do leite, e é determinado de forma predominante pelas substâncias que o compõe. O índice crioscópico é aferido por um aparelho chamado crioscópio, o qual analisa e reconhece a concentração das substâncias em solução (BELOTI, 2015).

A crioscopia é medida em graus Hortvath, e no Brasil a legislação determina um padrão de $-0,530^{\circ}\text{H}$ a $-0,555^{\circ}\text{H}$, tendo como referência a

instrução normativa 76 de 26/11/2018 do MAPA, pelo método: IDF 108/ISSO 5764. Tem como princípio o super congelamento da amostra, usando baixas temperaturas, em torno de 3°C negativos e observação da temperatura em que aconteceu o ponto de congelamento, por meio de um sensor mergulhado no tubo contendo a amostra.

É necessário seguir as instruções do fabricante do aparelho utilizado, principalmente em relação ao banho de refrigeração utilizado, o qual é trocado num intervalo entre 15 a 20 dias, o agitador e também o procedimento de calibração recomendados pelo fabricante. Antes do uso é necessário a calibração com os padrões, na mesma temperatura das amostras, efetuando três vezes em três tubos diferentes. Os testes também são feitos em 3 tubos distintos com a mesma quantidade pipetada, antes calibrada, e os resultados da leitura devem ser próximos respeitando uma tolerância de mais ou menos 2 miligraus. Após cada leitura feita, é necessário limpar cuidadosamente o sensor e o agitador água e secar delicadamente com papel absorvente fino. Após o resultado das 3 leituras serem expressos com relação as alíquotas das amostras, se calcula a média das três determinando assim o valor do índice crioscópico, o qual é expresso em graus Hortvet (°H).

Durante o período de estágio foi possível acompanhar a realização de aproximadamente 31 ensaios de leite cru e pasteurizado, e os principais resultados foram dentro dos valores de referência: -0,530°H a -0,555°H de acordo com a Instrução Normativa 76 de 26/11/2018 do MAPA.

3.1.12 Fosfatase (em leite pasteurizado)

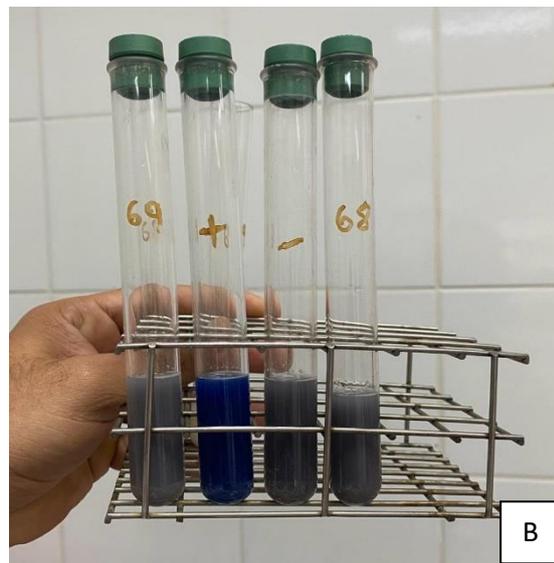
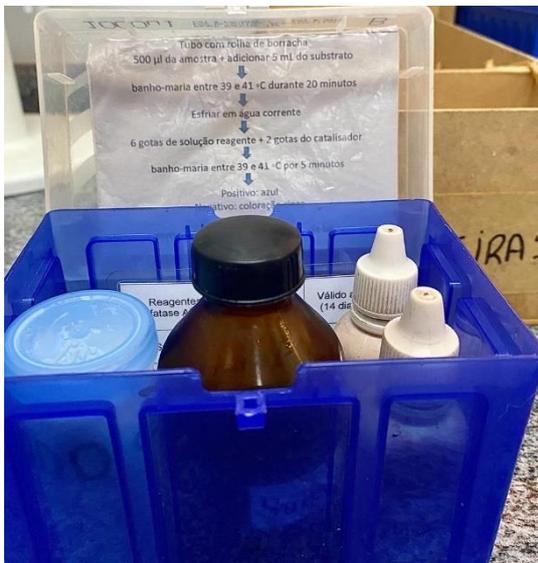
A fosfatase alcalina é uma enzima natural do leite, a mesma pode ser destruída quando submetida a temperaturas próximas da pasteurização. De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), a pasteurização rápida é caracterizada pelo aquecimento do leite de 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos, exclusivamente em equipamento de trocador de calor a placas (pasteurizador), seguido de resfriamento imediato até a temperatura igual ou inferior a 4°C. Dessa forma, é utilizada como controle, sendo sua inativação um indicativo de que foi mantida

a temperatura ideal para a destruição de as gentes patogênicas presentes do leite (BELOTI,2015).

Essa análise tem como princípio a verificação da ação enzimática pela ação da adição do substrato específico da enzima fosfatase no leite. A presença do indicador permite a identificação da atividade enzimática pela reação e coloração formada (positivo apresenta coloração azulada e negativo de coloração acinzentada), (BELOTI,2015).

A amostra foi cuidadosamente agitada antes de se iniciar a análise para melhor homogeneização . Essa análise foram realizadas com um kit de fosfatase alcalina (Figura 05, A) e teste colorimétrico seguindo as orientações do fabricante. Foi retirada uma alíquota de 500 µl em tubo adicionando também 5ml do substrato, levando a solução para banho maria numa temperatura de 39 a 41°C por 20 minutos, em seguida esfriou-se em água corrente. Logo após adiciona-se 6 gotas de solução reagente, mais duas gotas do catalizador, e levada para banho-maria novamente numa temperatura de 39 a 40°C por 5 minutos. O resultado com coloração azulada é positivo, enquanto a coloração acinzentada denota um resultado negativo (Figura 05, B),

Figura 05, A e B – Foto do kit fosfatase (substrato, solução reagente e catalizador). Resultado do teste da fosfatase, coloração azul amostra positiva, coloração acinzentada amostra negativa.



Fonte: Autor (2023).

3.1.13 Peroxidase (em leite pasteurizado)

Também é uma enzima naturalmente presente no leite. Porém apresenta uma maior resistência a temperatura do que a fosfatase, sendo destruída quando submetida a temperaturas superiores a 80°C. A ausência da peroxidase no leite indica que o aquecimento foi superior a temperatura de pasteurização, o que não é permitido para o leite pasteurizado (BELOTI,2015).

Princípio: A enzima peroxidase vai hidrolisar o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, transformando o guaiacol, originalmente incolor para uma forma oxidada, porém dessa vez de coloração salmão (BELOTI,2015).

Análise oficial consiste em transferir 10 ml da amostra para um tubo de ensaio, aquecer essa alíquota em banho-maria por 5min numa temperatura de 45°C, para a ativação da enzima. Acrescenta-se 2ml da solução hidroalcoólica de guaiacol a 1%, deixando escorrer levemente pelas paredes do tubo, e, seguida adicionando 3 gotas de peróxido de hidrogênio a 3%. Porém ainda pode-se alcançar um bom resultado da prova, utilizando 2 ml da amostra de leite adicionado ainda a 2 ml de guaiacol escorrido cuidadosamente pela parede do tubo, formando uma sobrecamada ao leite. Em seguida é adicionado 3 gotas da solução de peróxido de hidrogênio a 3%. No geral, quase todas as amostras que foram consideradas positivas apresentaram reação mesmo sem o processo de aquecimento (Figura 06), dessa forma o aquecimento pode ser tido como parte do processo apenas para confirmação dos resultados negativos, conferido assim maior velocidade na realização dessas análises (Figura 06).

Figura 06 – Foto do resultado da análise de peroxidase, comparando o método oficial do não oficial.



Fonte: Autor (2023).

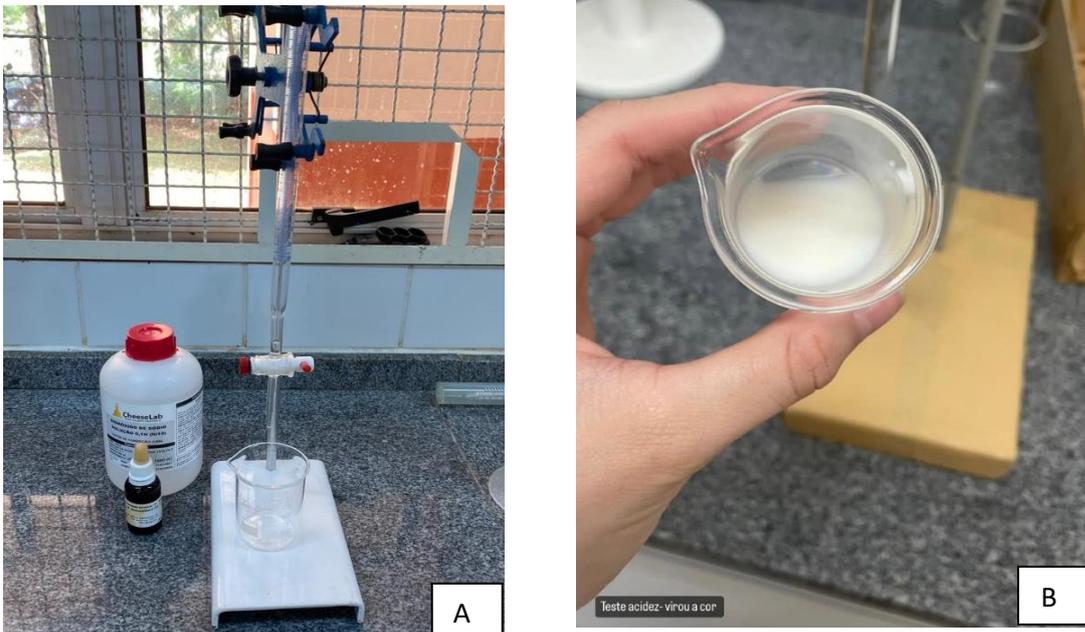
3.1.14 Titulação da acidez pelo método Dornic (em leite cru)

Esse método quantifica a acidez da amostra causada principalmente pela presença do ácido láctico, sendo uma acidez de origem microbiana, seu padrão de normalidade está entre 14 a 18 graus Dornic, que corresponde de 0,14 a 0,18g de ácido láctico em 100 mL da amostra, onde sua mensuração é realizada por neutralização.

Princípio: consiste na titulação de um volume da amostra, adicionando uma solução alcalina de concentração já conhecida (solução Dornic), utilizando como indicador a fenolftaleína (Figura 07, A), (conforme IN 68 – Brasil, 2006).

O processo é realizado adicionando 1ml da solução de trabalho para coloração, podendo ser o peróxido de hidrogênio e 10 ml da amostra a ser titulada, agita-se a solução e observa a viragem de cor (Figura 07, B) para o término da titulação. Transfere-se 10 ml da amostra para um béquer, em seguida são adicionados 4 ou 5 gotas de fenolftaleína a 1% e titular com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N, até o aparecimento da coloração rósea presente por aproximado tempo de 30 segundos.

Figura 07, A e B – Teste de titulação de acidez. A) material usado para realização do teste; B) coloração rósea denotando a viragem da cor branca.



Fonte: Autor (2023).

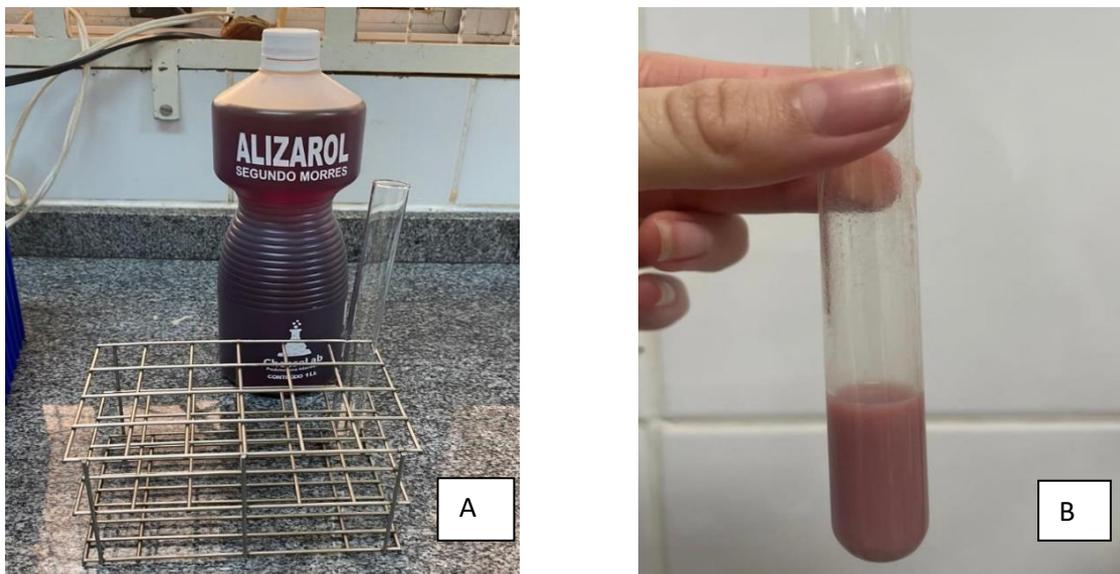
3.1.15 Alizarol (em leite cru)

Essa prova tem a finalidade de avaliar a estabilidade ou resistência térmica do leite, analisando assim se o leite testado possui estabilidade térmica suficiente para suportar o processo de pasteurização.

Princípio: Quando o leite apresenta uma elevada acidez ou desequilíbrio salino ocorre uma coagulação pela desestabilização das micelas pelo álcool. O alizarol (Figura 08, A) atua como indicador de PH, auxiliando na diferenciação entre o desequilíbrio salino e a acidez excessiva mudando aspecto e coloração da amostra.

O procedimento consiste em misturar em um tubo de ensaio partes iguais da solução de alizarol (em 1 ou 2 ml) ou álcool e de leite fluido, agitar e observar a coloração e o aspecto formado, podendo haver formação de grumos, coágulos grandes ou flocos (Figura 08, B).

Figura 08, A e B – Foto do material utilizado no teste do alizol. A coloração da amostra (vermelho tijolo) e a ausência de grumos ou coágulos denotam que o leite testado possui estabilidade térmica após a realização da prova.



Fonte: Autor (2023).

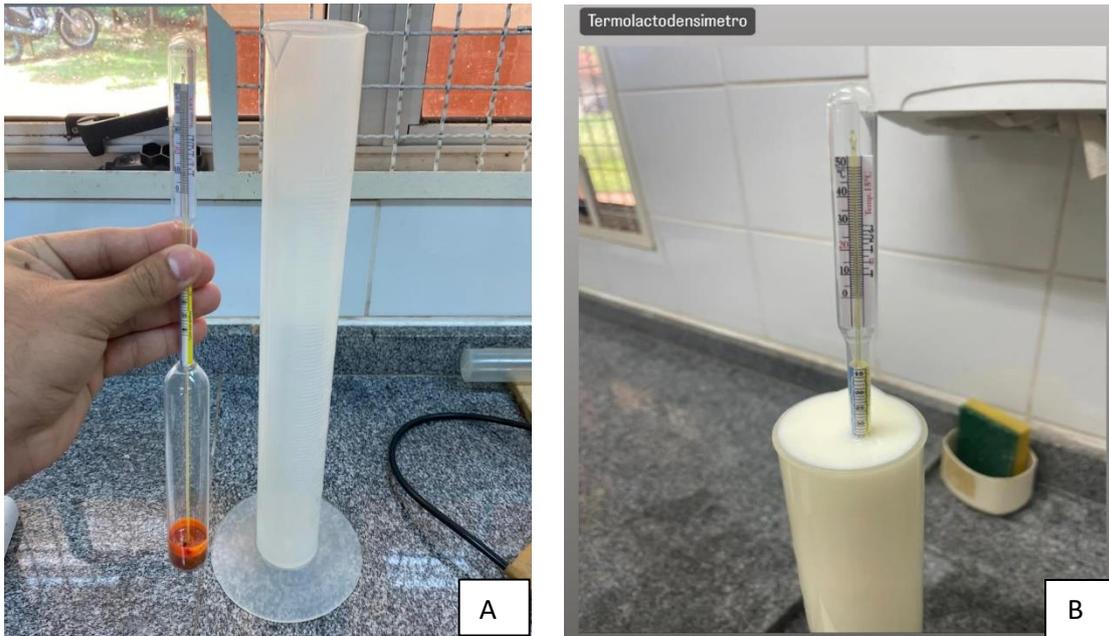
3.1.16 Densidade (em leite cru)

A densidade é determinada pelo resultado da massa sobre o volume. Dessa forma a densidade é uma propriedade sensível a alterações em seu volume, ou na quantidade de sólidos presentes no leite. Assim, esta propriedade auxilia na detecção de fraudes como a adição de água, de reconstituintes, desnatado, e na determinação tanto de sólidos desengordurados quanto de sólidos totais.

Princípio: a imersão de termo-lactodensímetro de massa constante na amostra vai provocar um deslocamento de uma quantidade da amostra igual à do lacto-densímetro usado, e em relação ao volume vai ser proporcional à densidade da amostra. Esse deslocamento de volume fará o líquido alcançar um valor na escala graduada em graus densitométricos, aferindo também ao mesmo tempo, a temperatura com valores próximos a 15°C usando o termômetro no interior do aparelho (conforme in 68 – Brasil,2006). A temperatura do leite é considerada importante, pois quando a mesma é superior a 15°C há uma expansão do volume diminuindo a densidade do leite causada pela dispersão das substâncias que o compõe, já o frio aumenta a densidade (BELOTI,2015).

O procedimento consistiu em transferir cerca de 0,5 litros ou 1 litro de leite para uma proveta de com porte essa capacidade. Em seguida mergulha-se o termolactodensímetro limpo e seco na amostra (Figura 09, A e B), deixa o mesmo em repouso para então estabilizar por cerca de 1 a 2 minutos e depois disso faz-se a leitura da densidade na cúspide do menisco.

Figura 09, A e B – Foto do material utilizado no teste da densidade. Realização da prova da densidade com o uso do termolactodensímetro.



Fonte: Autor (2023).

3.1.17 Gordura (em leite cru)

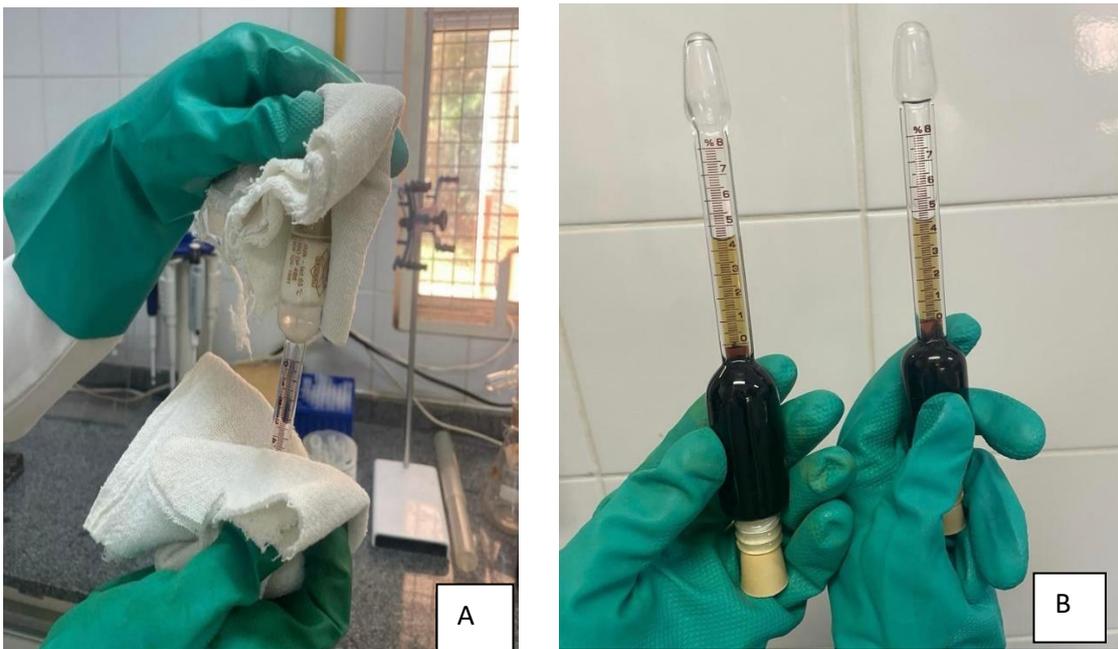
De acordo com Instrução Normativa MAPA - 76, de 26/11/2018, o leite cru refrigerado deve possuir teor mínimo de gordura de 3,0g/100g (três gramas por cem gramas), assim como o leite pasteurizado sendo ele integral; 0,6 a 2,9g/100g (zero vírgula seis a dois vírgula nove gramas por cem gramas) para o semidesnatado; e máximo de 0,5g/100g (zero vírgula cinco gramas por cem gramas) para o desnatado.

Princípio: a quantificação da gordura no leite (Figura 10 A e B) se baseia no ataque seletivo da matéria orgânica presente no leite, por meio da utilização do ácido sulfúrico, com exceção da gordura que por sua vez vai ser separada pela centrifugação da amostra auxiliada pelo uso do álcool amílico, que por sua vez modifica a tensão superficial (conforme IN 68 – Brasil,2006).

O processo de medição da gordura consistiu em adicionar 10 ml de ácido sulfúrico com densidade de 1,820 a 1,825 a 20°C em um butirômetro de Gerber, adicionando 11 ml da amostra estando ela homogeneizada em seguida, escoando o leite com cuidado pela parede do butirômetro e por seguinte adiciona-se 1 ml de álcool isoamílico com densidade de 0,81 a 20°C, fechando ainda o mesmo com uma rolha.

É importante salientar que o butirômetro deve ser segurado com o auxílio de uma toalha ou luva que proteja de queimaduras, pois a reação libera calor. Depois de homogeneizada a mistura deve ser levada para a centrifuga de Gerber (1000 a 1200 rpm) por um tempo de 5 minutos e em seguida essa solução deve ser transferida para um banho maria a uma temperatura de 65°C por 5 minutos. A leitura da gordura é feita na escala do butirômetro (BELOTI,2015).

Figura 10 A e B – Fotos do processo da quantificação de gordura com o uso do butirômetro. Quantificação da gordura na escala do butirômetro.



Fonte: Autor (2023).

4. MANEJO DE ORDENHA

Para que o processo da ordenha seja bem sucedido, todos os procedimentos que ocorrem antes da entrada dos animais na sala de ordenha são de suma importância. Antes de buscar as vacas em pasto, os residentes devem verificar se a instalação está apta para recebê-las, checando se está

tudo preparado e funcionando adequadamente, como: energia elétrica, água, higienização e preparo de todas as etapas da ordenha e seus respectivos materiais e cuidados, incluindo luvas, produtos para higienização das mãos, *pré-dipping* e *pós-dipping*. sabendo-se que os cuidados higiênicos na ordenha são os primeiros e mais importantes passos para se atingir uma boa qualidade microbiológica do leite.

A condução das vacas até a sala da ordenha deve ser feita com tranquilidade, sendo o ideal que elas andem até o local da ordenha voluntariamente, e preferencialmente no mesmo horário.

A ordenha foi realizada com três vacas em lactação no decorrer do estágio curricular. Estando postas e prontas para o início da ordenha, uma vez por semana foi realizado o teste de CMT (Califórnia Mastite Teste), para detecção da mastite subclínica, que apesar de subjetivo, dá uma boa ideia sobre a sanidade da glândula mamária, sendo um teste simples, barato e por apresentar um resultado imediato. Já o teste prático mais eficiente é o teste da caneca telada ou de fundo escuro realizado no início de cada ordenha, o qual foi usado para detecção da mastite clínica observando os primeiros 3 jatos de leite no fundo escuro da caneca.

Em seguida realizou-se o *Pré-dipping*, um procedimento de desinfecção dos tetos antes da ordenha como objetivo de prevenção da mastite ambiental, consistindo na imersão direta, sem lavagem prévia dos tetos em solução de substâncias que matem as bactérias imediatamente, sem deixar resíduos no leite, pois é uma substância volátil evaporando-se o mais rápido possível, como é o caso do uso do cloro a 750 ppm (BELOTI,2015), esperando agir por 30 segundos, e em seguida secando cada teto com um papel toalha descartável.

Na colocação das teteiras o ideal é que elas fossem mantidas para baixo em forma de “Z” e já desacopladas até o momento da colocação, evitando assim a entrada de ar e possíveis contaminações.

Na realização da ordenha a glândula mamária precisa ser esgotada completamente, caso isso não aconteça, a produção de prolactina diminui e por consequência também é reduzida a produção de leite. O leite residual é, portanto, um grave erro de manejo, determinando uma diminuição da produção e até mesmo a interrupção prematura do processo de lactação, ocasionando sérios prejuízos (BELOTI,2015).

No pós-*dipping* o iodo usado deve ser preferencialmente do tipo glicerinado, pois a glicerina tem a função de proteger o teto da irritação causada pelo produto. Essa é considerada uma medida prática, econômica e eficaz para o controle da mastite, reduzindo grande parte das novas infecções intramamárias durante o período de lactação (BELOTI,2015).

Na fazenda escola o resfriamento do leite cru foi feito em tanques de expansão, onde o mesmo refrigera o leite de forma direta nele depositado atingindo uma temperatura de 4°C. Dessa forma, deve-se associar o processo de refrigeração do leite às boas práticas na ordenha, de forma que a quantidade de micro-organismo psicrófilos não ultrapasse uma marca de 10% da quantidade de aeróbios mesófilos presente nessa matéria prima. Nessas condições a refrigeração ganha grande importância em relação a sua eficiência no processo de controle do crescimento microbiano.

No Brasil, os parâmetros que regem a qualidade físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado são regulamentados pela Instrução Normativa (I.N) nº 76, de 26 de novembro de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), determina que a temperatura de conservação e expedição no posto de refrigeração é de 4 °C, enquanto que a temperatura de conservação na usina ou fábrica precisa ser de também 4 °C, e a temperatura de recebimento do leite no estabelecimento precisa estar entre as temperaturas de 7 °C a 9 °C (BRASIL, 2018).

4.1 limpeza de utensílios e equipamentos da ordenha

Quando os equipamentos e utensílios não são higienizados de forma correta, ao longo tempo, inicia-se um processo no qual os resíduos de leite favorecem a proliferação de micro-organismos de forma contínua.

O enxágue prévio de equipamentos e utensílios em temperatura igual ou inferior a 45°C é fundamental para uma melhor eficiência dos produtos de limpeza, uma vez que dessa forma são retirados os resíduos visíveis do leite, já a água muito quente não é indicada nessa etapa da limpeza, pois pode levar a uma desnaturação de proteínas e sua adesão, assim como de sais minerais. Executando assim o pré-enxague de forma correta o resultado vai ser numa remoção de até 90% dos resíduos solúveis.

Em seguida é feita a aplicação de agentes químicos, como o S100, um agente alcalino clorado aplicado por meio de solução com tempo e temperatura de acordo com a indicação do fabricante e do processo empregado. A solução vai agir pelo contato direto sobre as sujidades nas superfícies, retirando, solubilizando e impedindo nova deposição de sujidades, seja por processo químico, ação mecânica ou térmica (BELOTI,2015).

Posteriormente é realizado enxague, realizado com água em temperatura ambiente, no intuito de eliminar todo o agente alcalino clorado e resíduos ainda presentes.

Por conseguinte, usa-se o sanitizante, como o oxiclean, para a redução da carga de micro-organismo a concentrações, tanto das superfícies dos equipamentos quanto dos utensílios usados. Atuando a sanitização portanto de modo a eliminar a microbiota remanescente.

5. MANEJO DOS ANIMAIS

O manejo foi realizado da maneira correta e calma mostrando a eficiência da sanidade quando os animais são bem tratados e alimentados de forma adequada. A fazenda escola possui um total de 27 vacas em pasto, das quais três delas estão em período de lactação, sete foram inseminadas com previsão de parto para o mês de julho de 2024, e um total de 17 vacas secas.

A alimentação ofertada às fêmeas logo após serem ordenhadas, é uma prática que ajuda na prevenção da mastite, uma vez que após a ordenha, os esfíncteres dos tetos das mesmas ficam abertos por alguns minutos, tempo suficiente para que os micro-organismos patogénicos possam ter acesso ao interior da glândula, principalmente levando em consideração a tendência do animal a deitar após a ordenha. Dessa forma o oferecimento de alimento como por exemplo, a ração, faz com que essa fêmea permaneça de pé pelo tempo necessário, até o completo fechamento do esfíncter.

Além disso, as práticas do manejo consistiram tanto em limpeza de cochos presentes nos diferentes pastos, como também higienização e limpeza de feridas observadas ao longo dos processos, cuidado com neonatos, pesagem dos animais, controle sobre estoque de medicamentos, contando também com a aplicação de hormônios de acordo com o protocolo de reprodução nas vacas inseminadas, montado pelo professor responsável.

6. RASTREIO DE *SALMONELLA* SPP, COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES E *ESCHERICHIA COLI* EM QUEIJO RALADO TIPO TROPICAL

6.1 Introdução

A elaboração de queijos é uma importante atividade dentro da indústria de laticínios, precisando de um conjunto de atividades desde a obtenção do leite até o último dia de maturação do produto para expedição no mercado.

A Portaria n° 146/1996 do (MAPA) estabelece o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos no país (BRASIL, 1996), de forma a completar, a Instrução normativa n° 24/2002 determinando as peculiaridades do queijo tipo Tropical. O queijo Tropical, também chamado de Regional do Norte, é o produto obtido pela coagulação do leite através de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, acrescentada pela ação de fermentos lácticos específicos ou pelo uso de soro-fermento, destinado, intrinsecamente, para processamento industrial (BRASIL, 2002a). De acordo com a portaria n° 146/1996, é ainda caracterizado como um queijo semigordo (25,0 e 44,9%) possuindo média umidade (36,0 e 45,9%) e na Portaria n° 27/2002 é determinado o seu uso especificamente para industrialização, ou seja, ralado (BRASIL, 2002b).

Os queijos, incluindo o tropical, possuem características nutricionais que são favoráveis para o crescimento de microrganismos como *Salmonella* spp., coliformes a 30°C, 45 °C e *Escherichia coli*. Frequentemente transmitidos para o leite durante a ordenha realizada de forma inadequada (PIGATTO *et al.*, 2009).

Com essas análises objetivou-se a realização do rastreio de *Salmonella* spp., coliformes a 30 °C e 45 °C, e *Escherichia coli*, de uma empresa privada no norte do Paraná que adquiria as peças integras de queijo tipo tropical de fornecedores externos e as submetia ao processo de ralação para venda. A empresa solicitou as análises em decorrência de uma interdição feita pela vigilância sanitária depois de um de seus lotes atestarem positivo para

Salmonella spp., uma vez que a Instrução Normativa Nº 20, de 21 de outubro de 2016 prevê a ausência de *Salmonella* spp. nesses produtos.

6.2 Material e métodos

Foram coletadas 15 amostras de pontos possíveis de contaminação e matéria-prima em diferentes etapas do processamento nem uma empresa privada na cidade de Ibiporã, norte do Paraná, em 18 de setembro de 2023. A coleta das amostras foi realizada de forma asséptica, nas quais as mesmas foram levadas sob refrigeração, e imediatamente avaliadas no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal LIPOA- UEL.

As amostras coletadas em swab foram imergidas em 10 ml de água peptonada tamponada, nos quais os swabs utilizados no mesmo ponto de coleta se tornaram um pool. As alíquotas com swab foram diluídas decimal e sequencialmente até a diluição 10^{-3} em solução salina (0,85%) peptonada (0,001%) (Figura 11, B).

Dessas condições foram avaliados, *Salmonella* spp., realizando detecção e isolamento conforme a ISSO 6579-1, (metodologia oficial MAPA). Esta metodologia consiste em três etapas, sendo elas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e plaqueamento diferencial. Para a primeira etapa foram pesados 25g representativa de toda a peça do produto (Figura 11, A), em um saco plástico tipo Bag estéril e adicionado 225ml de Água Peptonada Tamponada, esta amostra foi homogeneizada no stomacher por 60 segundos e incubada a 36°C por 18 horas. Após este período, esta amostra de pré-enriquecimento foi homogeneizada novamente e 0,1 ml foi transferido para um tubo com 10 ml do Caldo Rappaport-Vassilidis Soja (RVS), o qual foi incubado a uma temperatura de 41°C e 1 ml foi transferido para um tubo com 10 ml do Caldo Tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn), incubado a 36°C, ambos por 25 horas. Por fim, a etapa do plaqueamento diferencial, baseou-se em estriar uma alçada de cada caldo citado anteriormente em uma placa de Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e uma placa de Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol (BPLS) e incubada a 36°C por 24 horas.

Figura 11, A e B– Foto do processo de pesagem das 25g representativas de toda a peça do produto. Diluição das alíquotas com swab.



Fonte: Autor (2023).

As colônias típicas de *Salmonella* spp. no ágar XLD foram aquelas caracterizadas pelo centro preto com uma zona levemente transparente de cor avermelhada. Já no Ágar BPLS, as colônias típicas possuíam coloração translúcida a vermelha, opacas e cercadas por um halo avermelhado. Para a confirmação preliminar, colônias caracterizadas como suspeitas foram para as provas bioquímicas com a utilização do Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Caldo Lisina Ferro (LIA) e Caldo Uréia De Rustigan e Stuart.

Foram avaliadas também as contagens dos micro-organismos dos grupos dos coliformes totais (30°C) e termotolerantes (45°C). Para a contagem de coliformes a 30°C foi realizada a inoculação por superfície em Petrifilm CC de acordo com a AOAC 991.14 (metodologia oficial MAPA) e incubado a 35°C. Já para contagem de coliformes a 45°C, também foi realizada a inoculação em superfície, em petrifilm CC (para Contagem de Coliformes) de acordo com a AFNOR 3M 01/02-09/89C (metodologia oficial MAPA) e incubado à 45°C.

As colônias de coliformes termotolerantes foram submetidas às provas bioquímicas para diferenciação de *E. coli*, indicadora de contaminação de origem fecal. Foram realizados os testes de citrato, indol, Vermelho de Metila (VM), Voges Proskauer (VP) e coloração de gram.

Para o teste do citrato foi utilizado tubos com 4 mL de Ágar Citrato de Simmons e a técnica consiste em inocular uma alçada da colônia em cada tubo. Os tubos foram incubados a 36°C por 96 horas, após o período de incubação, a viragem de cor do meio verde para azul é indicativo de teste positivo. *E. coli* são citrato negativas, não alterando a cor do meio.

No teste de indol, uma alçada de cada colônia foi inoculada em 4 mL de Caldo Triptona a 1% e este, foi incubado a 36°C por 24 horas. Após este período de incubação, cinco gotas do reagente de Kovacs foram adicionadas em cada tubo, o resultado positivo acontece quando há uma formação de um anel vermelho-violeta na superfície do meio e negativo quando este anel se mantém na coloração do reagente, amarelo. *E. coli* são predominantemente indol positivas.

O teste de Vermelho Metila e Voges Proskauer também consiste em uma alçada de cada colônia em tubos com 6 mL do caldo VM-VP e foram incubados a 36°C por 48 horas. Para o teste de VP, após 48 horas de incubação é transferido 1 mL para um novo tubo de ensaio estéril e adicionado 600 ul de solução α -naftol 5% e depois, 200 ul de solução de KOH 40%, o resultado é considerado positivo quando há o desenvolvimento de uma cor vermelha ou rósea no meio de cultura e a permanência da cor real do meio caracteriza o resultado negativo, *E. coli* são VP negativas. Após retirar 1 mL do caldo VM-VP, a amostra foi reincubada por mais 48 horas e após esse período, foram adicionadas dez gotas do reagente VM, a coloração vermelha indica o teste positivo e a coloração amarela o teste negativo. *E. coli* são VM positivas.

6.3 Resultados e discussão

Das 15 amostras de queijo tropical analisadas nos ensaios microbiológicos, 53,3% apresentaram-se fora do padrão para coliformes totais, apresentando contagem >10 UFC/g em petrifilm CC de acordo com o método AOAC 991.14 (metodologia oficial MAPA). Enquanto que para os coliformes termotolerantes, 40% apresentaram-se fora do padrão, com contagens também >10 UFC/g em petrifilm CC (Tabela 1) de acordo AFNOR 3M 01/02-09/89C (metodologia oficial MAPA).

Através da realização de testes bioquímicos, não foi possível verificar a presença de *E. coli* em nenhuma das amostras de queijo tropical (Tabela 1),

assim como não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em 25g representativas da amostra.

Tabela 1 - Resultados obtidos de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* no rastreamento da contaminação de queijos tropicais em estabelecimento inspecionado no norte do Paraná no período de 18 de setembro a 4 de outubro de 2023.

AMOSTRAS	Coliformes totais (30°C) UFC/g	Coliformes termotolerantes (45°C) UFC/g	<i>E. coli</i> (n isolados)	<i>Salmonella</i> spp. (n isolados)
EMBALAGEM EXTRA QUEIJO NOVO	<10	<10	Negativo (0)	Ausência
EMBALAGEM EXTRA QUEIJO VELHO	<10	<10	Negativo (0)	Ausência
MESA DE EQUIPAMENTOS	350	260	Negativo (4)	Ausência
FATIADOR	140	<10	Negativo (0)	Ausência
FACAS	440	120	Negativo (0)	Ausência
RALADOR	>10 ⁴	>10 ⁴	Negativo (5)	Ausência
CAIXA DE TRANSPORTE	<10	<10	Negativo (0)	Ausência
SECADORA	<10	<10	Negativo (0)	Ausência
CUBA DE PRENSAGEM (MISTURA)	<10	<10	Negativo (0)	Ausência
EMBALADORA	30	10	Negativo (3)	Ausência
MATÉRIA PRIMA AO ABRIR	<10	<10	Negativo (0)	Ausência
MATÉRIA PRIMA RALADA	120	70	Negativo (7)	Ausência
MATÉRIA PRIMA NA SECAGEM	130	30	Negativo (3)	Ausência
MATÉRIA PRIMA APÓS TEMPERAGEM	350	<10	Negativo (0)	Ausência
PRODUTO FINAL	360	140	Negativo (14)	Ausência

Fonte: Elaborado pelo autor.

A presença de coliformes totais e termotolerantes pode ser indicativo de uma possível contaminação por microrganismos patogênicos, como a *E. coli*, a qual esteve ausente nas amostras deste estudo. São indicadores de contaminação de origem ambiental. Porém 40% das amostras tidas como positivas para coliformes a 45°C evidenciam que houve falha higiênico sanitária no processamento da matéria prima, podendo causar riscos à saúde do consumidor (NUNES *et al.*, 2013).

A ausência de *Salmonella* spp. nesse produto, pode estar relacionada com a utilização do leite pasteurizado como matéria-prima para fabricação do queijo, uma vez que este não é resistente ao processo térmico (VINHA *et al.*, 2016).

A contaminação por *E. coli* em queijos, pode acontecer tanto em amostras inspecionadas quanto amostras fabricadas de maneira artesanal. Isto ocorre uma vez que, a presença desse microrganismo no alimento está relacionada com a higiene durante todo o processo de produção deste derivado, seja na ordenha, na utilização de leite cru para o processamento do queijo, na utilização de água não potável, na manipulação inadequada do produto durante a fabricação, no tempo e temperatura inadequados durante o processo de pasteurização, na presença de biofilmes nos equipamentos de produção e até mesmo, uma contaminação pós pasteurização do leite (SOOMRO *et al.*, 2002 e International Dairy Federation, 2016).

6.4 Conclusão

Na pesquisa de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, nenhuma das amostras foram positivas. Contudo, foi observado um expressivo número de amostras com altas contagens de coliformes a 30 e 45°C.

Os principais pontos de contaminação microbiológicos estão correlacionados com os pontos de coleta que apresentaram altas contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes como, ralador, facas e mesa de equipamentos, incluindo também a temperarem como uma possível etapa de contaminação, denotando dessa forma falhas higiênico-sanitárias no processo de produção do queijo ralado. Tornando-se indispensável a implementação de procedimentos padrões de higiene operacional (PPHO), a ser implantado

mediante contaminação ambiental e dos utensílios usados para a ralação, prevenindo a infecção ou controlando a propagação dos patógenos, a fim de garantir segurança alimentar e inocuidade do produto final.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. RDC Nº 12, 02 jan. de 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-12-de-2-de-janeiro-de-2001.pdf>>.

BELOTI, Vanerli et al. Leite: obtenção, inspeção e qualidade. **Londrina: Editora Planta**, p. 51-107, 2015.

BRASIL. Instrução Normativa nº 24, de 10 de outubro de 2002. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- Ibama**. Brasília: 2002a. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/>>.

BRASIL. Portaria nº 27: **Regulamentos técnicos de identidade e qualidade do queijo tropical**. Brasília: 2002b. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos**. Brasília: 1996. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>.

BRAZIL. Instrução Normativa Nº 20, De 21 De Outubro De 2016. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa do Leite: políticas públicas e privadas para o leite. Artigo. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997 a. [Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal](#). Diário Oficial da União, Brasília, 1997.

BRASIL, MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018. **Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A**. **Diário Oficial da União, seção**, v. 1, 2018.

BRASIL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018. Oficializa as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, 30 de novembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância. Instrução Normativa nº 161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União, nº 126, de 6 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa n. 60 de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 26 dez. 2019.

Brasil. (2018). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de novembro de 2018. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**, Brasília, 2017.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. e DESTRO, M. T. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. *In*: FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: editora Atheneu, 2005. p.50 – 55.

LANGONI, Helio et al. Contagem de células somáticas e de micro-organismos mesófilos aeróbios em leite cru orgânico produzido em Botucatu (SP). *Veterinária e Zootecnia*, v. 18, n. 4, p. 653-660, 2011.

NUNES, M. M.; DE ALENCAR MOTA, A. L. A. e Caldas, E. D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 235-240, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513002181>

OKURA, M. H.; ARAÚJO, P. F. D.; JARDIM, F. B. B.; SILVA, R. R.; FINZER, J. R. D. e FRANZÉ, S. J. Influência da atmosfera modificada sobre a qualidade do queijo Minas Frescal. **Hig. aliment**, p. 84-91, 2006. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/vti-728>

Pigatto CP, Schocken-Iturrino, RP, Fadel-Pichetch CMT, Chioda TP, Vittori J, Marin JM (2009) Viabilidade de Escherichia coli produtora de toxina shiga (stec) não-o157 em queijo tipo minas frescal. **Ciência Animal Brasileira** 10: 663-668.

PINHEIRO, C. Pecuária de Leite: transformação social na área rural. *Revista Casa da Agricultura- Bovinocultura de Leite*. Ano 15, n.1, p.6, 2012.

PUI, C. F.; WONG, W. C.; CHAI, L. C.; TUNUNG, R.; JEYALETCHUMI, P.; HIDAYAH, N.; UBONG, A.; FARINAZLEEN, M. G.; CHEAH, Y. K. e SON, R. Salmonella: A foodborne pathogen. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 2, 2011. Disponível em: <http://www.ifrj.upm.edu.my/volume-18-2011.html>

SOUZA, Sabrina Cruz de. Avaliação da qualidade de leites in natura comercializados no município de Areia/PB. 2020.

SOOMRO, A. H., ARAIN, M. A., KHASKHELI, M., & BHUTTO, B. Isolation of Escherichia coli from raw milk and milk products in relation to public health sold under market conditions at Tandojam. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 151-152, 2002. Disponível em: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2002.151.152>

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, p. 202-207, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

VINHA, M. B.; PINTO, C. L. O.; VANETTI, M. C. D.; SOUZA, M. R. M. e CHAVES, J. B. P. Qualidade de queijos Minas frescal produzidos e comercializados informalmente em agroindústrias familiares. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 6, n. 4, p. 51-60, 2016. Disponível em: <https://periodicos.ufv.br/rbas/article/view/2932>