

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO BACTERIANA DO LEITE EM CALDO DE CANA DE AÇUCAR

SORAIA PEREIRA DA SILVA

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Carina Frigieri Salaro

**Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia
de Jaboticabal - Fatec, para obtenção do título de
Tecnólogo em Biocombustíveis.**

Silva, Soraia Pereira da
S586v Validação do método de avaliação bacteriana do leite em caldo de cana de açúcar / Soraia Pereira da Silva.— Jaboticabal : Fatec, 2012.
24f.

Orientador: Mariana Carina Frigieri Salaro

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2012.

1. Qualidade. 2. Micro-organismos. 3 Produtos lácteos. I. Salaro, M. C. F. II. Título.

CDU 664.113

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DE PRESENÇA DE BACTÉRIAS NO LEITE E NO CALDO DE CANA PARA USO DIDÁTICO

AUTOR: SORAIA PEREIRA DA SILVA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à FATEC-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

MARIANA CARINA FRIGIERI SALARO

RITA DE CASSIA VIEIRA MACRI

FLAVIA ROBERTA DE ANNUNZIO

Data da apresentação: 19 de dezembro de 2012.

Presidente da Comissão Examinadora

Dedico

Aos meu pais Ayton Pereira da Silva e Benedita dos Santos Silva, aos meus irmãos Ayton Pereira da Silva Junior e Karen Pereira da Silva e ao meu companheiro Ricardo Henrique Penariol pelo apoio e dedicação em todas as horas principalmente nas difíceis para a elaboração deste trabalho.
Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar nas realizações deste trabalho.

A minha orientadora Mariana Carina Frigieri Salaro pela dedicação, compreensão e pela ajuda que sempre me deu em todos os momentos do trabalho.

Aos meus companheiros de faculdade Ana Paula dos Reis Lopes, Priscila Barbosa, Luis Felipe Gardenghi, Valquiria Simone Vitor Moroço pelos momentos de alegria que sempre tivemos.

Em especial para Priscila Silva que sempre me ajudou em todos os momentos de angustia para a elaboração do trabalho.

E para todos aqueles que de alguma forma contribuíram e me ajudaram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1 - Amostras nos recipientes originais (A) e dispostas nos tubos de ensaio (B)	19
FIGURA 2 - Coleta de bactérias (A) e contaminação da amostra de leite (B).....	19
FIGURA 3 - Adição de azul de metileno nas amostras (A). Coloração das amostras após a homogeneização (B).....	20
FIGURA 4 - Resultados obtidos para as amostras após 20 minutos (A). Em destaque a diferença de coloração entre as amostras 3 e 4 (B)	20
FIGURA 5 - Amostra original de caldo de cana e contaminação da amostra por adição de cultura bacteriana líquida (A). Adição de azul de metileno nas 2 amostras (B)	21
FIGURA 6 - Coloração das amostras após homogenização (A). Resultados obtidos para as amostras após 20 minutos (B).	21

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Relação entre o tempo de descoramento do leite e o número de bactérias após a adição de azul de metileno.....	18
---	----

LISTA DE ABREVIATURA

UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias por Mililitros
UHT	Ultra High Temperature

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO.....	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Qualidade do leite.....	14
3.2 Qualidade da cana.....	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
6 CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

RESUMO

VALIDAÇÃO DO METODO DE AVALIAÇÃO BACTERIANA DO LEITE EM CALDO DE CANA DE AÇÚCAR.

O leite é um excelente meio de cultura para vários micro-organismos. Desta forma a qualidade do leite pode ser avaliada em função da sua microbiota, fornecendo informações que refletem as condições sobre as quais o alimento foi produzido, beneficiado e mantido. O caldo de cana ou garapa também pode ser considerado como uma ótima fonte para crescimento de micro-organismos e a falta de práticas higiênico-sanitárias adequadas nas diferentes etapas de obtenção podem comprometer a qualidade microbiológica do produto. O presente trabalho avaliou a presença de micro-organismos no leite e no caldo de cana utilizando uma técnica já empregada para a avaliação da qualidade do leite com o propósito de validar essas análises para serem incorporadas nas práticas da disciplina de Microbiologia do curso de Biocombustíveis. Porém, a técnica não foi eficiente na avaliação do caldo de cana. Dessa forma, somente a avaliação do leite será incorporada às aulas.

Palavras-chave: Qualidade. Micro-organismos. Produtos lácteos.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF PRESENCE OF BACTERIA IN MILK AND SUGAR CANE JUICE FOR TEACHING

Milk is an excellent culture medium for various microorganisms. Thus the quality of milk can be evaluated according to their microbiota, providing information that reflect the conditions under which food is produced, processed and maintained. The sugar cane juice can also be considered as a great source for microbial growth and lack of proper hygienic and sanitary practices in different stages of production may compromise the microbiological quality of the product. This study evaluated the presence of microorganisms in milk and sugar cane juice using a technique already employed for evaluating the quality of milk to validate these analyzes and to be incorporated into practice the discipline of Microbiology of Course Biofuels. However, the technique was not effective in evaluating the sugar cane juice. Thus, only the evaluation of milk will be incorporated.

Keywords: *Quality. Microorganisms. Milk products.*

1 INTRODUÇÃO

O leite é um excelente meio de cultura para vários micro-organismos. Algumas vezes o leite pode conter micro-organismos patogênicos (*Salmonella*, *Coxiella burnetii*, *Mycobacterium bovis*, *M tuberculosis*, *Brucella abortus*) originários ou não do próprio animal. A contaminação do leite pode ocorrer durante a ordenha, o transporte e o armazenamento (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2007).

Assim, grandes populações de micro-organismos (*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*) podem estar presentes no leite. Grandes populações são indicativas de que as características iniciais do leite foram modificadas pelo crescimento microbiano. Desta forma a qualidade do leite pode ser avaliada em função da sua microbiota, fornecendo informações que refletem as condições sobre as quais o alimento foi produzido, beneficiado e/ou mantido (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2007).

Caldo de cana ou garapa também pode ser considerado como uma ótima fonte para crescimento de micro-organismo. O caldo é uma bebida extraída diretamente da cana-de-açúcar através de um processo de moagem. Durante o processo a casca da cana é retirada para eliminar as sujeiras, a seguir as canas são prensadas ou espremidas e o caldo obtido já está pronto para ser consumido (ANDRADE, 2012).

Atualmente a comercialização de caldo de cana-de-açúcar tem se mostrado bastante precário devido, principalmente, à falta de práticas higiênico-sanitárias adequadas nas etapas de despalhamento, descascamento e corte da cana. Geralmente, os processos citados são realizados com instrumentos inadequados para manipulação de alimentos, como foices e facas não higienizadas e sanitizadas adequadamente (SILVA; FARIA, 2006).

Segundo Gallo (1989), procedimentos inadequados no manuseio de um produto alimentício, sob o ponto de vista higiênico-sanitário, comprometem a saúde humana, principalmente quando se trata da cana-de-açúcar, que possui alta atividade de água, pH e temperatura favoráveis, tornando-se um meio propício para o desenvolvimento microbiano.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da presença de micro-organismos no leite e no caldo de cana com finalidade didática sendo incorporada às aulas práticas da disciplina de Microbiologia do curso de Tecnologia em Biocombustíveis.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Qualidade do leite

A qualidade do leite é hoje um dos temas mais discutidos no cenário da pecuária nacional e isso se deve a grande participação que esse produto tem no setor socioeconômico do país. O leite é um dos alimentos mais completos para alimentação humana, por possuir elementos essenciais em sua composição como proteínas, vitaminas, cálcio, gorduras entre outros. É um alimento muito perecível, tendo suas características físicas, químicas e biológicas alteradas por ações de micro-organismos (GRACINDO; PEREIRA 2009).

A falta de higiene dos manipuladores, dos aparelhos e utensílios utilizados para a preparação da ordenha desse alimento são um dos fatores que podem causar doenças na população. Para diminuir o risco de contaminação dos alimentos é necessário ter informações básicas sobre higiene, para garantir alimentos de qualidade para o consumo humano. Segundo o mesmo autor as contaminações do leite podem ser:

- Físicas: presença de objetos estranhos no leite como pedra, plásticos, vidros ou qualquer objeto que causa danos à saúde do consumidor;
- Química: presença de substâncias estranhas no leite. Podem ser: resíduos de antibióticos, vermífugos, carrapaticidas administrados aos animais;
- Biológica: presença de bactérias, fungos, vírus, protozoários ou outros micro-organismos que pode estar presente no ambiente, na pele do animal ou nas mãos dos ordenadores podendo causar danos à saúde do consumidor

O mesmo autor destaca que para o alimento ser considerado de qualidade e seguro à saúde deve apresentar:

- Contagens bacterianas baixas;
- Ausência de micro-organismos patogênicos ao homem;
- Não deve haver resíduos de medicamentos veterinários;
- Mínima contaminação com produtos químicos ou toxinas microbianas.

A contaminação pode atingir números da ordem de milhões de bactérias por mL, podendo incluir tanto micro-organismos patogênicos como deterioradores. A contaminação microbiana prejudica a qualidade do leite, interfere na industrialização, reduz o tempo de

prateleira do leite fluido e derivado lácteo e pode colocar em risco a saúde do consumidor (BRITO; BRITO, 1998).

Segundo Balbani e Butugan (2001) a classificação do leite de vaca nos tipos A, B e C é baseada em padrões microbiológicos. O leite tipo A é o que contém menos de 10.000 micro-organismos/ml de leite cru, enquanto o B pode apresentar até 500.000 micro-organismos/ml e o C, mais de 500.000 micro-organismos/mL. Guerreiro *et al.*, 2005 destaca que a contagem máxima de bactérias permitida no leite é de $0,1 \times 10^6$ UFC/mL.

De acordo com Brito e Brito (1998) uma das maneiras de evitar a proliferação de bactérias é submeter o produto a refrigeração. Quanto mais baixa for a temperatura de armazenamento do leite (ideal entre 4° e 7°C), menor será a taxa de multiplicação dos micro-organismos presentes no leite. Por isso, tão importante quanto os cuidados na obtenção, será a rapidez com que o leite for refrigerado.

A aceitação do leite por parte do consumidor depende muito de suas características sensoriais tais como sabor odor, cor, que podem ser alterados por bactérias diminuindo o tempo de vida útil do produto. Por isso, deve-se ter toda a higiene possível e o manuseio correto do leite desde a ordenha até o consumidor final.

Geralmente, os micro-organismos isolados do leite são os micro-organismos formadores de esporos, coliformes e bactérias gram-negativas, que podem resistir à pasteurização (GUERREIRO *et al.*, 2005). Os micro-organismos contaminantes do leite podem ser divididos em três grupos principais: as bactérias mesófilas, que se multiplicam rapidamente quando o leite não é armazenado sob-refrigeração; as bactérias psicrotróficas que causam degradação das proteínas e gordura do leite, com conseqüentes alterações no sabor e odor e possuem a capacidade de se multiplicar à baixas temperaturas e as bactérias termodúricas que resistem à pasteurização, pois suportam temperaturas mais altas (menos de 100°C) ou produzem esporos que sobrevivem por anos no ambiente, que são formas de resistência contra condições adversas. Segundo Pietrowski *et al.*, (2008) a pasteurização destrói os micro-organismos patogênicos, porém não recupera um leite de má qualidade. Assim, quanto maior a contaminação microbiana antes da pasteurização, tanto maior será sua microbiota residual.

3.2 Qualidade da cana

A cana-de-açúcar, planta da família das gramíneas, espécie *Saccharum officinarum*, originária da Ásia Meridional, é muito cultivada em países tropicais e subtropicais, para obtenção do açúcar, etanol, energia e da cachaça, devido à sacarose contida em seu caule (CARVALHO; MAGALHAES, 2007). O caldo extraído da cana é popularmente conhecido como garapa e muito passível de contaminação. Trata-se de uma bebida de sabor agradável e refrescante muito popular no Brasil e consumida por várias pessoas de diferentes classes sociais na maioria das vezes é comercializada por vendedores ambulantes denominados garapeiros. A bebida varia em sua composição química e na sua coloração mas o líquido preserva todos os nutrientes presentes na cana como ferro, vitaminas, sódio, potássio, entre outros. Ainda, o caldo de cana-de-açúcar pode conter grandes quantidades de nutrientes orgânicos e inorgânicos, tem grande quantidade de água e seu pH varia de 5,0 a 5,5, sendo desta forma, considerado uma ótima fonte para crescimento de diferentes micro-organismos (OLIVEIRA *et al*,2006). O caldo de cana não oferece grandes riscos de contaminação aos consumidores, uma vez que na maioria das vezes, é ingerido logo após o preparo. Entretanto, este deve apresentar boas condições de higiene, assim como a matéria-prima e a água serem de boa qualidade. A procedência, o armazenamento e as práticas de higiene durante a manipulação também devem ser considerados como itens importantes (CARVALHO; MAGALHAES, 2007). Os manipuladores do processo assumem também grande importância para a contaminação, atuando como fonte de disseminação de micro-organismos patogênicos sendo um grupo de relevância epidemiológica na transmissão de enteropatógenos. Os micro-organismos podem ser tanto do campo como provenientes de equipamentos utilizados no processo de extração do caldo (OLIVEIRA *et al*,2006).

Para a determinação da presença de contaminantes nas amostras de leite e de caldo de cana foi utilizado o Teste do Azul de Metileno. Este teste baseia-se no consumo de oxigênio do meio pelos micro-organismos presentes, levando à produção de substâncias redutoras, as quais contribuem para a diminuição do potencial óxido-redução (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2007). Essa diminuição pode ser acompanhada pelo uso do azul de metileno, o qual é um corante que em sua forma oxidada apresenta a cor azul e na forma reduzida ele é incolor. Na presença de atividade microbiana o azul de metileno age como acceptor de elétrons tornando-se incolor e a velocidade com que ocorre esse processo está diretamente relacionada à concentração bacteriana do meio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório Didático da disciplina de Microbiologia da Fatec-Jaboticabal.

A avaliação foi realizada essencialmente como descrito em (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2007). Com o objetivo de utilizar esse teste didaticamente nas aulas práticas de Microbiologia foi verificado a viabilidade de realização deste no tempo disponível para a aula prática. Como já dito esse teste já está bem estabelecido para o leite, então foi ensaiado se o mesmo poderia também ser empregado para a avaliação de derivados do leite e do caldo de cana, como controle foi utilizado o leite comercial submetido ao processo de UHT – Ultra High Temperature.

Na realização deste trabalho foram utilizadas quatro amostras de leite e derivados (iogurte, leite fermentado, leite longa vida e leite contaminado previamente com bactérias extraída do ar obtidas no laboratório já referido).

Para avaliação do caldo de cana de açúcar foram utilizadas duas amostras de caldo de cana (caldo de cana puro e caldo de cana contaminado previamente como descrito para o leite).

Inicialmente, os tubos foram identificados. A seguir, os tubos foram preenchidos com as amostras (10mL) a serem testadas. Após isso, foi adicionado 1 mL de azul de metileno (0,02%). As amostras foram misturadas e colocadas na estufa a 37°C. A primeira leitura foi realizada após 20 minutos. O teste foi considerado positivo quando houve o descoramento da cor do fundo do tubo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste empregado neste estudo foi o Teste do Azul de Metileno o conhecido também como Teste da Redutase, o qual na presença de atividade microbiana ocorre um descoramento da solução diretamente relacionada à concentração bacteriana do meio (SILVA FILHO; OLIVEIRA, 2007).

A Tabela1 apresenta a relação entre o tempo de descoramento e a quantidade de bactérias (UFC – Unidades Formadoras de Colônia) após a adição de azul de metileno. É

possível observar que a qualidade do leite é melhor na medida em que a solução demora mais para descorar.

TABELA 1 - Relação entre o tempo de descoramento do leite e o número de bactérias após a adição de azul de metileno.

Tempo de descoramento	UFC/mL	Qualidade
<20 minutos	$>20 \times 10^6$	péssima
20 minutos – 2 horas	$4 \times 10^6 - 20 \times 10^6$	má
2 – 5,5 horas	$5 \times 10^5 - 4 \times 10^6$	regular
>5,5 horas	$<5 \times 10^5$	boa

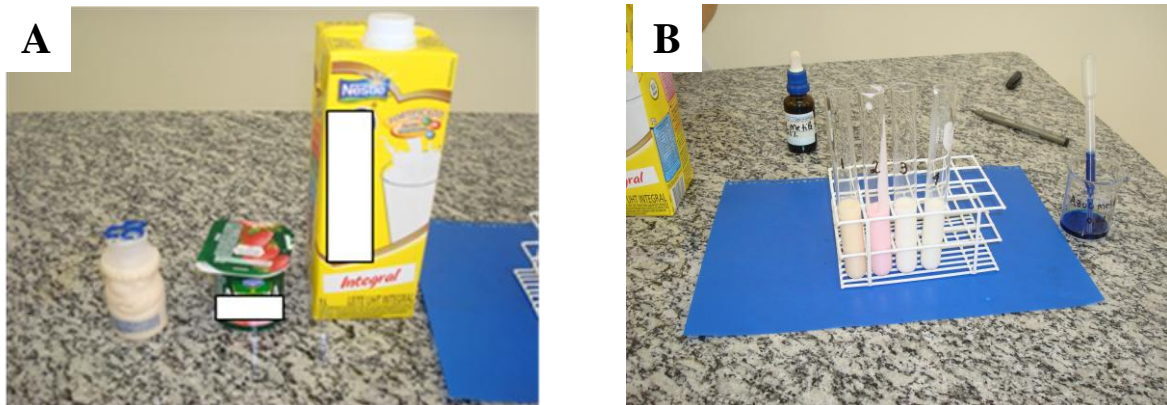
Fonte: Silva Filho; Oliveira, 2007.

Como dito anteriormente, foram analisadas quatro amostras de leite, sendo assim denominadas:

- Amostra 1: leite fermentado
- Amostra 2: iogurte
- Amostra 3: leite
- Amostra 4: leite a ser contaminado

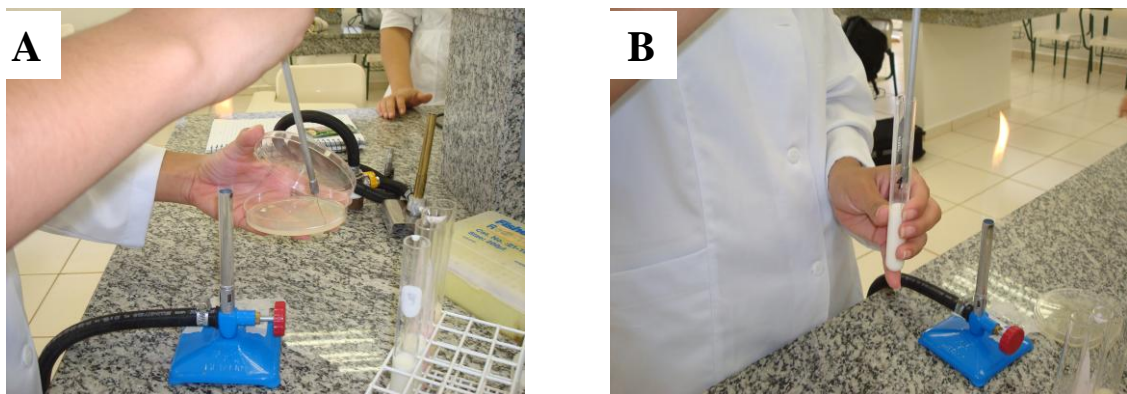
A Figura 1 mostra as amostras a serem avaliadas nos recipientes originais (A) e já dispostas nos tubos de ensaio (B).

FIGURA 1 - Amostras nos recipientes originais (A) e dispostas nos tubos de ensaio (B)



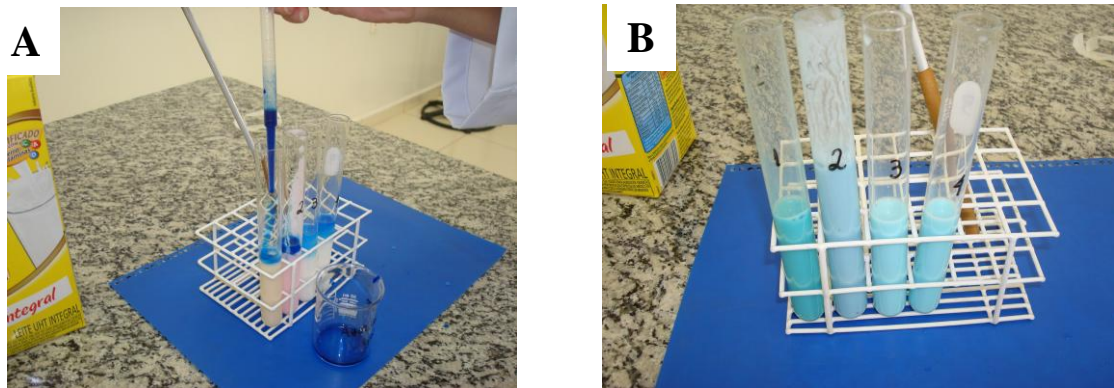
A seguir, procedeu-se a contaminação do leite com bactérias presentes no ar isolado no mesmo laboratório onde foram realizados os experimentos. Essa contaminação foi feita para que fosse possível verificar a presença de um resultado positivo, já que eram esperados resultados negativos para as outras amostras testadas. A Figura 2 mostra o processo de contaminação.

FIGURA 2 - Coleta de bactérias (A) e contaminação da amostra de leite (B)



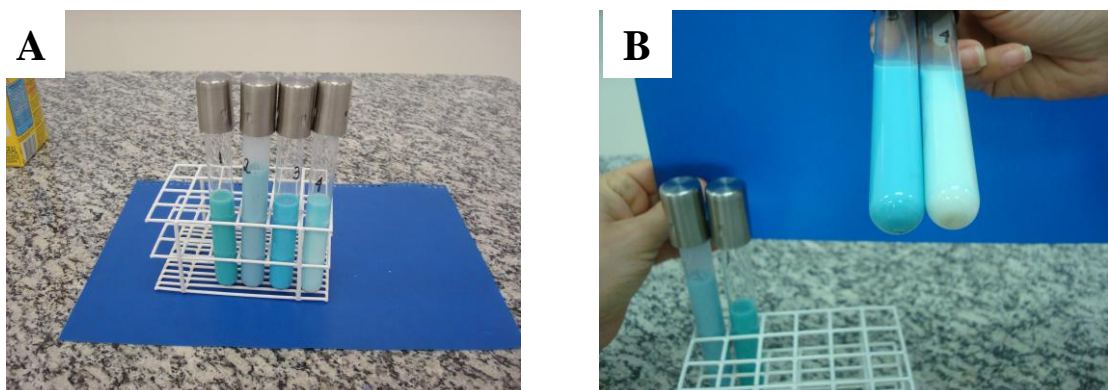
Após isso, o corante azul de metileno foi adicionado às amostras e os tubos foram agitados para promover a homogeneização. A Figura 3 mostra esse processo. Na amostra 2 houve a necessidade de acrescentar um pouco de leite para possibilitar a mistura. Desta forma, o volume do tubo 2 ficou diferente dos demais.

FIGURA 3 - Adição de azul de metileno nas amostras (A). Coloração das amostras após a homogeneização (B)



O interesse seria observar os resultados após 20 minutos, uma vez que, a aula prática possui 100 minutos e deve-se considerar o tempo necessário para as orientações sobre o experimento, o tempo para a realização e o tempo para a interpretação e discussão dos resultados. A Figura 4 mostra os resultados obtidos. É possível observar que as amostras 1, 2 e 3 não sofreram alterações na coloração. No entanto, a amostra 4 contendo o leite contaminado mostrou o descoramento da coloração. Desta forma, concluímos que as amostras 1 e 2 não são interessantes para a utilização na aula prática, pois não descoram e são difíceis de manusear por serem mais viscosos. As amostras 3 e 4 foram ideais, uma vez que o leite original (amostra 3) não apresentou alteração na coloração e o leite contaminado descorou de forma bem evidente (Figura 4B). Nas aulas práticas de Microbiologia serão utilizadas apenas as amostras 3 e 4 na avaliação do leite.

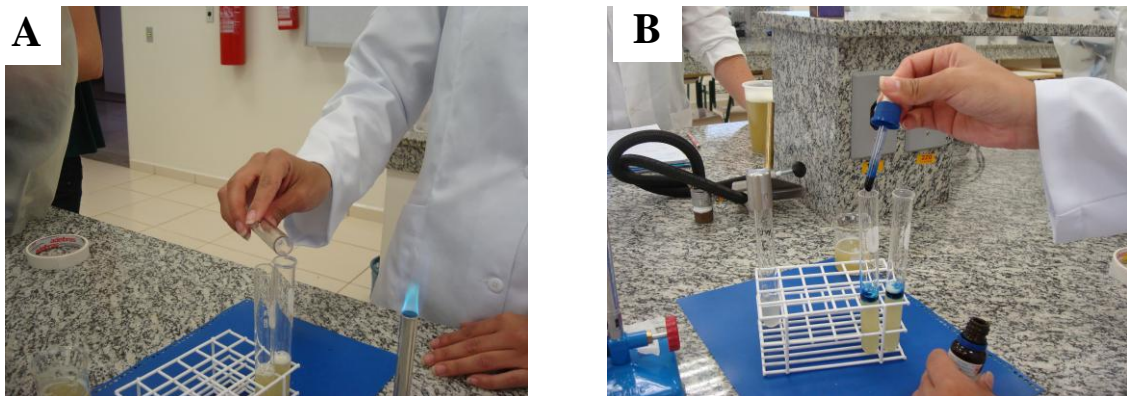
FIGURA 4 - Resultados obtidos para as amostras após 20 minutos (A). Em destaque a diferença de coloração entre as amostras 3 e 4 (B)



Com o objetivo de verificar se é possível aplicar o mesmo teste na análise microbiológica de caldo de cana foi realizado o ensaio com caldo obtido em um estabelecimento próximo ao local do experimento. O caldo foi colocado em 2 tubos de ensaio e identificados como:

A seguir, a amostra contida no tubo 2 foi contaminada com uma cultura bacteriana líquida (bactérias do ar coletadas no local do experimento) como pode ser observado na Figura 5A. Após isso, o azul de metileno foi adicionado às amostras (Figura 5B).

FIGURA 5 - Amostra original de caldo de cana e contaminação da amostra por adição de cultura bacteriana líquida (A). Adição de azul de metileno nas 2 amostras (B)



Na Figura 6A é possível verificar a coloração das amostras após a homogeneização e na Figura 6B a coloração após o tempo do ensaio. É possível observar um descoramento muito sutil na amostra de caldo contaminado, isso porque a coloração inicial do caldo acaba atrapalhando a verificação correta dos resultados. Desta forma, o teste para avaliação da qualidade do caldo de cana fica comprometido e não será realizado nas aulas práticas como proposto anteriormente. Novos estudos deverão ser realizados com o caldo clarificado.

FIGURA 6 - Coloração das amostras após homogenização (A). Resultados obtidos para as amostras após 20 minutos (B)



6 CONCLUSÃO

O trabalho mostrou a validação da técnica de avaliação da qualidade do leite descrita em Silva Filho e Oliveira (2007). Porém, a mesma técnica não foi eficiente na avaliação do caldo de cana. Dessa forma, somente a avaliação do leite será incorporada às práticas da disciplina de Microbiologia do curso de Biocombustíveis.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE M. C. **Caldo de cana**. Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Pesquisa Escolar on-line. Disponível em:
<http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/index.php?option=com_content&view=article&id=867&Itemid=182>. Acesso em: 01 ago 2012.
- BALBANI, A. P. S; BUTUGAN, O. **Contaminação biológica de alimentos**. São Paulo, v.23, n.4, p. 320-328, 2001.
- BRITO, M. A. V. P; BRITO, J. R. F. **Qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa, 1998.
- CARVALHO, L. R; MAGALHAES, J. T. Avaliação da qualidade microbiológica dos caldos de cana comercializados no centro de Itabuna/BA e práticas de produção e higiene e seus manipuladores. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v.31, n.2, p. 240-248, 2007.
- GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Campinas, 1989. 388 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1989.
- GRACINDO, A. P. A. C ; PEREIRA, G. F. Produzindo leite de alta qualidade. **EMPARN**, Natal-RN, v.1, p. 27, 2009.
- GUERREIRO, P.K; *et al.* Qualidade microbiológica de leite em função de Técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.
- OLIVEIRA, A. C. G.; *et al.* Análise das Condições do Comércio de Caldo de Cana em Vias Públicas de Municípios Paulistas. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v.13, n.2, p.06-18, 2006.
- PIETROWSKI, G. A. M; *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo c comercializado na cidade de Ponta Grossa-PR. In: Semana de Tecnologia em Alimentos, 6., 2008. **Resumos...** Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR: Ponta Grossa-PR, 2008.
- SILVA FILHO, G.N.; OLIVEIRA, V.L. **Microbiologia-Manual de Aulas Práticas**. Florianópolis. Ed. UFSC, 2007.
- SILVA, K. S; FARIA, J. A. F. Avaliação da qualidade de caldo de cana envasado a quente e por sistema asséptico. **Ciencia e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.26, n.4, p. 754-758, 2006.