

**LIVROS DIDÁTICOS
LIPOA**

VOL. VI

MANUAL DE AULAS PRÁTICAS INSPEÇÃO DE LEITE E DERIVADOS

**BRUNA GAROFALI SIMONE DRABER
DANIELE BONDAN PACHECO
HELENICE GONZALEZ DE LIMA
NATACHA DEBONI CERESER**

MANUAL DE AULAS PRÁTICAS INSPEÇÃO DE LEITE E DERIVADOS



UFPEL

MANUAL DE AULAS PRÁTICAS INSPEÇÃO DE LEITE E DERIVADOS

**BRUNA GAROFALI SIMONE DRABER
DANIELE BONDAN PACHECO
HELENICE GONZALEZ DE LIMA
NATACHA DEBONI CERESER**

Pelotas, RS

Editora Natacha Deboni Cereser

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Manual de aula práticas [livro eletrônico] :
 inspeção de leite e derivados : volume VI /
 Bruna Garofali Simone Draber...[et al.]. --
 Pelotas, RS : Ed. das Autoras, 2022.--
 (Livros didáticos LIPOA)
 PDF

Outras autoras: Daniele Bondan Pacheco, Helenice
 Gonzalez de Lima, Natacha Deboni Cereser.
 Bibliografia.
 ISBN 978-65-00-57125-7

1. Leite - Análise 2. Leite - Produção 3. Leite -
 Qualidade 4. Microbiologia 5. Medicina veterinária -
 Métodos I. Draber, Bruna Garofali Simone.
 II. Pacheco, Daniele Bondan III. Lima, Helenice
 Gonzalez de. IV. Cereser, Natacha Deboni. V. Série.

22-136413

CDD-636.089

Índices para catálogo sistemático:

1. Medicina veterinária 636.089

Eliete Marques da Silva - Bibliotecária - CRB-8/9380

Direitos Autorais e Licença de Uso de [Bruna Garofali Simone Draber, Daniele Bondan Pacheco, Helenice Gonzalez de Lima e Natacha Deboni Cereser](#) está licenciado com uma Licença [Creative Commons - Atribuição-NãoComercial-CompartilhaIgual 4.0 Internacional](#). Baseado no trabalho disponível em <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/downloads/>.



Sumário

AUTORES	8
AGRADECIMENTOS	9
LISTA DE FIGURAS	10
APRESENTAÇÃO	12
ORIENTAÇÕES GERAIS	13
ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	15
Introdução a microbiologia	16
Resumo	16
Técnica abordada	16
Montagem de material	16
Contagem de mesófilos	17
Resumo	17
Técnica abordada	17
Montagem de material	17
Contagem de microrganismos da Família <i>Enterobacteriaceae</i>	18
Resumo	18
Técnica abordada	19
Montagem de material	19
Coliformes totais, termotolerantes e <i>E. coli</i>	20
Resumo	20
Técnica abordada	20
Montagem de material	21
Contagem de bolores e leveduras	22
Resumo	22
Técnica abordada	22
Montagem de material	23
Contagem de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	24
Resumo	24
Técnica abordada	24
Montagem de material	24
Pesquisa de <i>Salmonella spp.</i>	25
Resumo	25
Técnica abordada	25
Montagem de material	26
Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	27

Resumo	27
Técnica abordada	28
Montagem de material	29
ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	31
Determinação da Densidade do Leite	32
Amostras	32
Técnica	32
Montagem de material	32
Acidez e termoestabilidade do Leite	34
Amostras	34
Técnica abordada	34
Montagem de material	34
Determinação de gordura, EST e ESD	35
Amostras	35
Técnica	35
Montagem de material	36
Resíduos de inibidores no leite	37
Amostras	37
Técnica abordada	37
Montagem de material	37
Pesquisa de enzimas	38
Amostras	38
Técnica abordada	38
Montagem de material	39
Pesquisa de fraudes	41
Neutralizantes de acidez	41
Reconstituintes de densidade	41
Substâncias conservadoras	43
REFERÊNCIAS	46

AUTORES

BRUNA GAROFALI SIMONE DRABER, Médica Veterinária, Residente em Inspeção de Leite e Derivados, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Pelotas.

DANIELE BONDAN PACHECO, Médica Veterinária, Residente em Inspeção de Leite e Derivados, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Pelotas.

HELENICE GONZALEZ DE LIMA, Médica Veterinária, Doutora em Zootecnia, Professora de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Pelotas.

NATACHA DEBONI CERESER, Médica Veterinária, Doutora em Medicina Veterinária, Professora de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Pelotas.

AGRADECIMENTOS

Nós gostaríamos de agradecer a equipe do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, que auxiliam nas aulas práticas e também aos discentes que cursam a disciplina de Inspeção de Leite e Derivados.

Os autores.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de revisão.	15
Figura 2 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de contagem de mesófilos.	16
Figura 3 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de contagem da família <i>Enterobacteriaceae</i> .	18
Figura 4 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de NMP de coliformes e <i>E.coli</i> .	20
Figura 5 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de contagem de bolores e leveduras.	21
Figura 6 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de contagem de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .	23
Figura 7 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de <i>Salmonella</i> .	25
Figura 8 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .	27
Figura 9 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de determinação de densidade.	31
Figura 10 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de determinação de acidez e termoestabilidade.	33
Figura 11 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de determinação de gordura, EST e ESD.	34
Figura 12 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de resíduos.	36
Figura 13 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de enzimas.	38
Figura 14 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de bicarbonato.	39
Figura 15 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de amido.	40
Figura 16 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de sacarose.	40
Figura 17 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de cloretos.	41
Figura 18 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de cloro.	42

Figura 19 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de formol. 43

Figura 20 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de peróxido de hidrogênio. 43

APRESENTAÇÃO

O Manual de Aulas Práticas do LIPOA – Inspeção de Leite e Derivados tem por objetivo auxiliar no preparo de aulas práticas da cadeira de Inspeção de Leite e seus derivados do curso de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas.

O Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas (LIPOA-UFPel) é um importante espaço dedicado à busca por segurança alimentar e qualidade dos produtos de origem animal. Em funcionamento desde 1998, funciona como uma importante ferramenta à vida acadêmica de graduandos e pós-graduandos da universidade atuantes na área de inspeção, microbiologia, química e qualidade de alimentos, além de prestar serviços à comunidade de toda a região sul do Rio Grande do Sul. Sua estrutura oferece estágios voluntários vinculados aos projetos de ensino, pesquisa e extensão desenvolvidos pelo grupo. Seu corpo acadêmico conta com professores doutores nas áreas de inspeção de leite, carnes, pescados e seus sub produtos derivados. Maiores informações podem ser obtidas no site <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/> e nas redes sociais @veterinariapreventiva.ufpel

ORIENTAÇÕES GERAIS

Sendo as boas práticas de laboratório (BPL), um sistema de qualidade que engloba diferentes processos padronizados, a implantação de um roteiro de BPL exerce um importante papel na conscientização dos usuários dos laboratórios sobre a necessidade de se estabelecer determinados padrões de segurança visando o bom funcionamento do mesmo. A segurança dos usuários e do ambiente de trabalho são um dos principais objetivos da implantação dessas medidas, bem como assegurar a qualidade e validação dos resultados da pesquisa ou serviço prestado nas dependências do laboratório.

Regras gerais de conduta

A organização das atividades e do ambiente de trabalho é uma ferramenta primordial para a prevenção de acidentes relacionados à manipulação de substâncias e equipamentos, incluindo riscos físicos, químicos e biológicos. Para tanto algumas regras devem ser seguidas:

- Guardar objetos pessoais (bolsas, casacos, notebooks, etc.) em armários, salas e outras acomodações fora do ambiente do laboratório.
- Levar para o laboratório apenas os objetos indispensáveis para a realização do trabalho.
- Sempre utilizar-se dos equipamentos de proteção individual (EPI's) indicados para o procedimento, bem como verificar a utilização dos mesmos pelos demais indivíduos presentes no laboratório.
- Em hipótese alguma consumir ou armazenar alimentos, balas, chicletes ou bebidas nas dependências do laboratório.
- Não fumar.
- Nunca trabalhar com os cabelos soltos, principalmente ao redor do fogo.
- Evitar o uso de adornos, como relógios, pulseiras, anéis e outros durante o trabalho no laboratório.
- Evitar distrair-se, ou perturbar terceiros que estejam realizando algum trabalho no laboratório.
- Manter-se atualizado quanto aos procedimentos gerais de organização do laboratório, como o conhecimento dos locais corretos de armazenagem de substâncias e utensílios, formas de descarte, uso de etiquetas de identificação etc.
- Caminhar com atenção nas dependências do laboratório e evitar correr.
- Sempre manter o ambiente de trabalho, os utensílios e os equipamentos organizados e limpos após o seu uso, a fim de evitar principalmente a contaminação de posteriores manipuladores.

- Somente fazer uso de equipamentos e aparelhos do laboratório para o seu propósito designado e após ter compreensão das respectivas instruções de manuseio e segurança dos mesmos.
- Possuir conhecimento das propriedades físicas e da toxicidade dos reagentes antes de utilizá-los.
- EPI'S utilizados no laboratório e/ou contaminados com materiais tóxicos ou patogênicos não devem ser utilizados em cozinhas, banheiros e salas de aula.
- Evitar trabalhar sozinho, ou fora das horas de trabalho convencionais.

Responsabilidades do manipulador

- Conhecer perfeitamente as técnicas a serem empregadas no procedimento, bem como o correto manuseio dos equipamentos e substâncias a serem utilizados.
 - Sempre utilizar o equipamento pessoal de proteção de acordo com as instruções.
 - Seguir cuidadosamente as regras e normas de segurança presentes no manual.
 - Conhecer perfeitamente a localização e funcionamento de todos os equipamentos de emergência, bem como relatar todas as condições de falta de segurança, ou acidentes e incidentes ocorridos no laboratório.
 - Relatar ao responsável pelo laboratório problemas de ordem organizacional, estrutural, em equipamentos e materiais.
 - Lavar as mãos ao final dos procedimentos de laboratório e remover todo o equipamento de proteção incluindo luvas e aventais.
 - Desligar as luzes, o gás e equipamentos após a sua utilização, sempre observando a necessidade e o uso dos mesmos por terceiros (no caso de estufas, geladeiras, etc.).
 - Seguir os procedimentos de descarte adequados para cada reagente ou material de laboratório
-
- É importante ao usuário conhecer as principais indicações e/ou sinalizações presentes no ambiente de trabalho. Esses pictogramas são empregados com a finalidade de informar de forma objetiva os riscos ou os cuidados a serem adotados com a substância, material ou ambiente.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Introdução a microbiologia

Resumo

Nesta primeira aula, os docentes e residentes irão demonstrar as normas gerais do laboratório, os cuidados necessários, ilustrar alguns equipamentos presentes, alertar sobre os perigos do ambiente de aula prática e demonstrar algumas técnicas que serão utilizadas durante o semestre.

Técnica abordada

Serão abordadas as seguintes técnicas:

- Técnicas de pipetagem com pipetador automático e também com pipeta graduada de vidro;
- Diluições em série e sua importância;
- Semeadura de superfície com alça de Drigalski;
- Semeadura de superfície por esgotamento;
- Semeadura de profundidade;
- Semeadura em tubo por agulhamento;

Montagem de material

Material necessário para uma bancada:

- 1 Pipetador monocal;
- 1 Caixa de ponteiras;
- 1 Balão volumétrico ou pipeta graduada de 25 mL em embalagem estéril;
- 1 Pera;
- 1 Erlenmeyer com 100 mL de amostra (leite);
- 1 Erlenmeyer com 225 mL de APT;
- 2 Tubos com 9 mL de APT;
- 1 Saco estéril com 4 alças plásticas e 4 alças de Drigalski;
- 1 Alça de platina;
- 1 Alça agulha;
- 2 Placas com ágar PCA;
- 1 Placa em embalagem estéril;

- 1 Erlenmeyer com ágar PCA líquido;
- 1 Tubo com ágar PCA inclinado.



Figura 1 - Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de revisão.

Contagem de mesófilos

Resumo

Mesófilos são um grande grupo de microrganismos, que tem como característica principal, a capacidade de se multiplicar em temperatura ambiente, uma temperatura ótima de multiplicação dos 30-36°C;

São indicadores de higiene;

Contagem até 300 colônias;

Técnica abordada

Conforme a ISO 4833-1;

Usamos 3 diluições, incluindo a zero;

Semeadura de profundidade com ágar PCA (1 mL da diluição na placa estéril, verter o meio na placa e homogeneizar em movimentos em forma de oito, suaves);

Incubação a 30°C por 72°C;

Contagem direta;

Montagem de material

- 1 Pipetador monocanal;
- 1 Caixa de ponteiras;

- 1 Balão volumétrico ou pipeta graduada de 25 mL em embalagem estéril;
- 1 Pera;
- 1 Erlenmeyer com 100 mL de amostra (leite);
- 1 Erlenmeyer com 225 mL de APT;
- 1 Tubo com 9 mL de APT;
- 3 Placas estéreis embaladas;
- 1 Erlenmeyer com 100 mL de PCA líquido;
- Placas com colônias, com 3 diluições subsequentes, onde pelo menos 2 placas estejam no intervalo de contagem (semear do estoque);



Figura 2- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de contagem de mesófilos.

Contagem de microrganismos da Família *Enterobacteriaceae*

Resumo

É uma grande família de bactérias, bacilos Gram negativos, que conseguem fermentar glicose e são oxidase negativas;

Também é indicador de higiene;

Contagem de até 150 colônias;

Este Guia foi elaborado para uso interno e exclusivo do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas (LIPOA/2022)

Entre seus representantes temos os coliformes totais, termotolerantes, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, entre outros.

Técnica abordada

Conforme a ISO – 21528-2;

São feitas 3 diluições, incluindo a zero;

Semeadura por profundidade com ágar VRBG com sobrecamada (1 mL da diluição na placa estéril, verter o meio na placa e homogeneizar em movimentos em forma de oito, suaves. Quando solidificar o meio, verter uma sobrecamada);

Estufa 37°C por 24 horas;

Escolher 2 placas para contagem, com até 150 colônias, de diluições subsequentes ou de duplicata e realizar a contagem;

Nessa análise, é necessária confirmação bioquímica, então são escolhidas 5 colônias de cada placa contada e passar para ágar nutriente, que será incubado por 24 horas a 37°C;

Para comprovação bioquímica, é realizado a teste de fermentação da glicose, inocular a colônia em um tubo com ágar glicose (com indicador de pH púrpura de bromocresol);

Para preparação do ágar glicose, a cada 100 mL de ágar glicose, adicionar 0,2 mL de púrpura de bromocresol, pipetar em tubos sem inclinar;

Para aula, utilizar ácido tartárico para simular resultado positivo no teste de fermentação da glicose;

O teste de oxidase não é realizado para aula, pois o resultado é negativo, não alterando a cor da fita;

Montagem de material

- 1 Pipetador monocanal;
- 1 Caixa de ponteiras;
- 1 Balão volumétrico ou pipeta graduada de 25 mL em embalagem estéril;
- 1 Pera;
- 1 Erlenmeyer com 100 mL de amostra (leite);
- 1 Erlenmeyer com 225 mL de APT;
- 1 Tubo com 9 mL de APT;
- 3 Placas estéreis embaladas;

- 1 Erlenmeyer com 150 mL de VRB líquido;
- Placas com colônias, com 3 diluições subsequentes, onde pelo menos 2 placas estejam no intervalo de contagem (semear do estoque);
- 2 Tubos com ágar glicose, um negativo e um positivo;



Figura 3- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de contagem da Família *Enterobacteriaceae*.

Coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*

Resumo

Os coliformes totais são um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*, dentro deles estão os coliformes termotolerantes, e a *E. coli* é a sua principal representante em DTHA (doenças de transmissão hídrica e alimentar).

São bacilos Gram negativos, fermentadores de lactose, produzindo ácido e gás.

Os coliformes termotolerantes têm a capacidade de fermentar a lactose em temperaturas mais elevadas, 45°C.

São indicadores de higiene.

Técnica abordada

Para coliformes totais – ISO 4831;

Para termotolerantes e *E. coli* – APHA/2015;

São feitas 3 diluições;

Prova presuntiva – realizada em triplicata de tubos por diluição, com caldo lauril sulfato e tubo de Durham invertido, tampa de bucha, serão 9 tubos de lauril (3 por diluição);

Incubados a 37°C por 48 horas;

Como resultado da prova presuntiva, teremos alguns tubos positivos (com produção de gás e turvos) e outros negativos;

Tubos positivos serão semeados para caldo verde brilhante e incubados a 37°C por 48 horas e também serão semeados em caldo E.C, que serão incubados a 45°C em banho maria por 48 horas (todos com tubos de Durham invertidos dentro para verificar a produção de gás);

Tubos positivos de VB serão contabilizados para o resultado de coliformes totais por número mais provável;

Tubos positivos de E.C serão contabilizados para o resultado de coliformes termotolerantes por número mais provável;

Os tubos positivos de E.C devem ser semeados em ágar L-EMB, para verificação de colônias características de *E. coli*;

(Se necessário podemos simular tubos positivos com a tiragem parcial de gás na preparação dos tubos e turvamos o meio com 0,1 mL de leite).

Montagem de material

- 1 Pipetador monocanal;
- 1 Caixa de ponteiras;
- 1 Balão volumétrico ou pipeta graduada de 25 mL em embalagem estéril;
- 1 Pera;
- 1 Erlenmeyer com 100 mL de amostra (leite);
- 1 Erlenmeyer com 225 mL de APT;
- 2 Tubos com 9 mL de APT;
- 1 Grade com 9 tubos com caldo lauril sulfato com tubos de Durham invertidos;
- 1 Grade com 5 tubos com caldo lauril sulfato positivos e 4 negativos;
- 1 Grade com 5 tubos com caldo verde brilhante e 5 tubos com caldo E.C (pode ser o lauril de novo, pois é da mesma coloração);

- 1 Grade com 4 tubos de caldo verde brilhante positivos e 1 negativo, 2 tubos de caldo E.C positivos e 3 negativos, ou outras variações para as diferentes bancadas;
- 1 Placa com colônias características de *E. coli* em ágar L-BEM para demonstração (estoque de aula);



Figura 4- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de NMP de coliformes e *E. coli*.

Contagem de bolores e leveduras

Resumo

São indicadores de higiene;

Estão disseminados no ambiente de produção e nas câmaras de maturação;

São indesejáveis em alimentos, pois produzem diversas enzimas que podem causar sua deterioração.

Algumas espécies de bolores são produtoras de micotoxinas, que são prejudiciais à saúde.

Técnica abordada

Conforme a ISO 6611

A amostra nessa análise é de doce de leite, então vamos necessitar pesar o produto para fazer a primeira diluição;

Vão ser feitas 2 diluições, 10^{-1} e 10^{-2} ;

Semeadura de profundidade, com ágar BDA (a metodologia oficial indica a utilização de ágar YGC ou ágar OGYE);

A metodologia nos pede que seja em duplicata de placas;

Contar placas no intervalo de 10 a 150 colônias;

Montagem de material

- 1 Pipetador monocanal;
- 1 Caixa de ponteiras;
- 1 Saco estéril em um Becker;
- 1 Balança;
- 1 Pote de doce de leite;
- 1 Colher embalada em saco estéril;
- 1 Erlenmeyer com 225 mL de APT;
- 1 Tubo com 9 mL de APT;
- 4 Placas estéreis embaladas;
- 1 Erlenmeyer com 100 mL de PCA líquido;
- Placas com colônias, com duas diluições em duplicata, onde pelo menos 2 placas estejam no intervalo de contagem;



Figura 5- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de contagem de bolores e leveduras.

Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva

Resumo

São mesófilos, cocos Gram positivos, que produzem a enzima coagulase;

Há uma correlação com *Staphylococcus* que produzem a enzima coagulase e a produção de enterotoxinas, que causa intoxicação em seres humanos.

Técnica abordada

Conforme a ISO 6888-1

Serão realizadas 3 diluições, sendo a primeira já preparada com um derivado lácteo, como queijo;

Preparação do ágar Baird Parker – 300 mL do meio base autoclavado + 15 mL da emulsão de gema de ovo (1 gema com 60 mL de água estéril) + 3 mL de telurito de potássio;

Semeadura de superfície com alça de Drigalski, então preparar 3 placas estéreis com ágar pronto, inocular 0,1 mL da diluição e espalhar com a alça de Drigalski, para o crescimento de colônias por toda a placa, tendo a contagem como objetivo;

Depois da contagem de colônias típicas e atípicas separadamente, serão selecionadas 5 colônias típicas e 5 colônias atípicas por placa contada (contar 2 placas de diluições subsequentes, com intervalo de 10 a 300 colônias) para serem semeadas em caldo BHI, que será usado para o teste de coagulase;

Preparar uma grade com 10 tubos de BHI turvos (que poderá ser simulado utilizando a mesma solução usada para o APT + 0,1 mL de iogurte) para realizar o teste de coagulase;

Para o teste de coagulase, preparar 10 eppendorfs com 0,3 mL da solução de APT (simulando plasma de coelho, onde, durante a aula acadêmicos irão adicionar 0,1 mL do BHI turvo);

Para simular o resultado, temos eppendorfs prontos com ágar simulando a coagulase e alguns somente com a solução de APT (caixa de coagulases aula);

Montagem de material

- 1 Pipetador monocal;
- 1 Caixa de ponteiras;

- 1 Saco estéril com a diluição 10^{-1} pronta, 225 mL de APT, com 25 g de iogurte um Becker;
- 2 tubos com 9 mL de APT;
- 3 Placas com Ágar Baird Parker;
- 5 Alças de Drigalski em embalagem estéril;
- 3 Placas com colônias características que pelo menos 2 estejam no intervalo de contagem;
- 10 Tubos de BHI turvos;
- 10 Eppendorfs com 0,3 mL de solução APT;
- 10 Eppendorfs com o resultado, alguns positivos e outros negativos;



Figura 6- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*.

Pesquisa de *Salmonella spp.*

Resumo

Leite e derivados estão muitas vezes, envolvidos com surto de Salmonelose;

Bactéria de importância para saúde pública, se detectarmos uma célula dessa bactéria na nossa amostra, já significa risco para a população;

Bacilos Gram negativos, pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, não esporulados, móveis (maioria), anaeróbios facultativos, mesófilos (5 a 47°C);

Técnica abordada

Conforme a ISO 6579-1

1. Pré-enriquecimento

Este Guia foi elaborado para uso interno e exclusivo do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas (LIPOA/2022)

Diluição 10^{-1} que é incubada a 37°C;

Não são realizadas diluições pois o objetivo é a detecção da bactéria e não a contagem;

Já deixamos pronto, 225 mL de APT, com 25 gramas de um derivado lácteo, para o qual a pesquisa é solicitada em legislação;

2. Enriquecimento seletivo

Inoculamos 1 mL do pré-enriquecimento em 10 mL de caldo Tetrationato, incubamos a 37°C por 24 horas;

Inoculamos 0,1 mL do pré-enriquecimento em 10 mL do caldo Rappaport, incubamos a 41°C por 24 horas;

Não ocorre alteração nesses caldos após a incubação;;

3. Isolamento

Semeadura por esgotamento em ágar XLD e ágar BPLS, dividir a placa em 2, para semear de um lado o Rappaport e do outro o Tetrationato;

Trazer uma placa de cada com colônias típicas;

4. Testes Bioquímicos

Tubo com ágar nutriente semeado;

TSI – tubo com o ágar inclinado + tubo característico de *Salmonella* (base amarela com rampa avermelhada);

LIA – tubo com ágar inclinado + tubo característico de *Salmonella* (roxo);

Ureia – tubo com ágar ureia (ágar ureia amarelo) + tubo positivo para mostrar como não é (rosa);

5. Teste sorológico

Cepa de *Salmonella* em ágar nutriente para o teste;

Soro polivalente somático;

O residente realiza o teste para evitar o risco de contaminação dos acadêmicos;

Montagem de material

- 1 Pipetador monocal;
- 1 Caixa de ponteiras;

- 1 Saco estéril com alças de platina;
- 1 Saco estéril com a diluição 10^{-1} pronta, 225 mL de APT, com 25 g do derivado em um Becker;
- 1 Tubo com 10 mL de caldo Rappaport;
- 1 Tubo com 10 mL de caldo Tetrationato;
- 1 Placa com Ágar XLD para semear e 1 placa com colônias características;
- 1 placa com Ágar BPLS para semear e 1 placa com colônias características;
- 1 Tubo de ágar nutriente semeado;
- 1 Tubo com ágar TSI inclinado para semear e 1 característico;
- 1 Tubo com ágar LIA inclinado para semear e 1 característico;
- 1 Tubo com ágar ureia para semear e 1 positivo para demonstrar como não é;
- Lâmina para o teste sorológico;
- Soro polivalente;
- Cepa de *Salmonella* semeada em ágar nutriente para o teste;
- 1 Tubo com solução salina;



Figura 7- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de *Salmonella*.

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Resumo

É uma bactéria amplamente disseminada no meio ambiente;

Com capacidade de multiplicação em diversas situações de temperatura, pH, atividades de água, entre outras adversidades;

São bacilos Gram positivos, anaeróbios facultativos, capazes de causar listeriose em humanos;

Técnica abordada

Conforme a ISO 11290-1

1. Enriquecimento seletivo primário

25 gramas de iogurte em 225 mL de caldo Half-Fraser (APT mais concentrado), já preparado no saco estéril;

Incubado a 30°C por 24 horas;

2. Enriquecimento seletivo secundário

Caldo Fraser (APT mais concentrado), 0,1 mL do enriquecimento seletivo primário, em 10 mL de caldo Fraser;

Incubado a 30°C por 24 horas. Escurece, então caldo Fraser escurecido (café);

3. Isolamento e seleção

Usaremos dois meios de cultura e faremos semeadura de superfície por esgotamento;

1 placa com ALOA (vamos usar PCA para simular o ALOA) e uma placa com Palcam;

1 placa de ALOA com colônias características e 1 placa de Palcam com colônias características (semear do estoque);

4. Testes bioquímicos

Tubo com ágar nutriente semeado para realizar as provas bioquímicas;

Folder que mostra o Gram, teste da motilidade e teste da hemólise;

Para caracterizar o gênero *Listeria*, vamos fazer o teste da catalase, com a cultura que estará no ágar nutriente, em lâmina, com 1 gota de peróxido de hidrogênio;

Semear em um tubo com ágar SIM, por agulhamento, para teste de motilidade;

Tubos com teste de motilidade característico;

Para caracterizar a espécie, temos o teste de carboidratos, então 1 tubo para Ramnose e um para a xilose, que também serão semeados com a cultura do ágar nutriente;

1 tubo positivo (amarelo) para Ramnose e 1 tubo negativo para a xilose (vermelho);

Placa com ágar sangue para semeadura por esgotamento e uma para demonstrar;

Montagem de material

- 1 Pipetador monocal;
- 1 Caixa de ponteiras;
- 1 Saco estéril com alças de platina;
- 1 Saco estéril com a diluição 10^{-1} pronta, 225 mL de Half-Fraser, com 25 g de iogurte em um Becker;
- 1 Tubo com 10 mL de caldo Fraser e 1 tubo com Fraser escurecido;
- 1 Placa com PCA simulando o ALOA e uma placa de ALOA com crescimento característico;
- 1 Placa com Palcam e uma placa com crescimento característico;
- 1 Tubo de ágar nutriente semeado;
- Água oxigenada;
- 1 Lâmina limpa;
- 1 Tubo com ágar SIM e 1 tubo com motilidade característica;
- 2 Tubos com vermelho de fenol, simulando o teste de carboidratos;
- 1 Tubo positivo de Ramnose e 1 negativo de Xilose;
- 1 Placa de ágar sangue;
- 1 Placa de ágar sangue com hemólise completa;



Figura 8- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de *Listeria monocytogenes*.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Determinação da Densidade do Leite

Amostras

Com a densidade elevada – Simulação: adicionar 1 grama de sal para cada 300 mL de leite;

Com a densidade diminuída – Simulação: adicionar 35 mL de água para cada 300 mL de leite;

Técnica

Inserir o Termolactodensímetro na proveta com no mínimo 300 mL de leite;

Verificar a temperatura no termômetro;

Verificar a densidade nos graus do lactodensímetro;

Montagem de material

- 1 Proveta com leite normal;
- 1 Proveta com leite com adição de água;
- 1 Proveta com leite com adição de sal;
- 1 Termolactodensímetro;
- Papel descartável para secar o termolactodensímetro;
- Borrifador com álcool para sua limpeza;
- Tabela de conversão para a temperatura de 15°C;



Figura 9- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de determinação da densidade.

Acidez e termoestabilidade do Leite

Amostras

Alcalina – Simulação: 5 mL de solução base para 250 mL de leite;

Ácida – Simulação; 4 mL de ácido oxálico em 250 mL de leite;

Técnica abordada

1. Teste do álcool alizarol

Adicionar 2 mL da amostra + 2 mL da solução de álcool/alizarol 72% em uma placa de petri;

2. Titulação de acidez

Consiste na titulação, utilizando como indicador a fenolftaleína, de uma porção da amostra por uma solução alcalina de concentração conhecida, o hidróxido de sódio 0,1N;

Solução alcoólica de fenolftaleína 1%;

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L - 0,444 g em 100 mL;

Preparo da amostra – 20 mL da amostra (homogeneizada) + 40 mL de água destilada + 2 mL da solução de fenolftaleína;

Preparo do padrão de coloração - 20 mL da amostra diluída em 40 mL de água + 100 µL da solução de fucsina.

Solução de fucsina P.A. (C.I. 42510): Dissolver 0,06 g de fucsina em 50 mL de álcool etílico absoluto contendo 0,5 mL de ácido acético p.a. Completar o volume para 100 mL com álcool etílico.

Titular com o auxílio de uma pipeta graduada, o hidróxido de sódio na amostra até chegar na coloração padrão;

Verificar quanto de hidróxido de sódio foi utilizado para aplicação na fórmula;

Montagem de material

- 1 Pipetador automático monocal;
- 1 Caixa de ponteiras;
- 1 Erlenmeyer com leite normal;
- 1 Erlenmeyer com leite alcalino;
- 1 Erlenmeyer com leite ácido;

- 1 Tubo com 6 mL de solução alizarol;
- 3 Placas vazias;
- 1 Bureta com hidróxido de sódio;
- 1 Solução padrão feita com o leite normal;
- 3 Becker pequenos vazios;
- 3 Pipetas de 20 ou 25 mL;
- 1 Pera;
- 1 Erlenmeyer com água destilada (mínimo 200 mL)
- 1 Proveta de 100 mL;



Figura 10- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de determinação da acidez e termoestabilidade do leite.

Determinação de gordura, EST e ESD

Amostras

Proveta com no mínimo 400 mL da amostra, homogeneizada, em temperatura perto dos 15°C – retirar da geladeira quando começar a parte teórica da análise;

Becker pequeno com 60 mL da amostra para o analisador;

Técnica

Em um butirômetro, adicionar 10 mL de ácido sulfúrico para análise de leite (está escrito no frasco, qual funciona), depois, adicionar 11 mL da amostra, pela parede do butirômetro para não ocorrer a mistura (essa reação libera calor, cuidado), na sequência, adicionar 1 mL de álcool isoamílico e caso esteja frio, podemos adicionar 0,5

mL de água para auxiliar na visualização do resultado. Homogeneizar com cuidado e o auxílio de um pano molhado até dissolver o coágulo. Centrifugar o butirômetro com a rolha voltada para baixo, por 5 minutos, depois disso, podemos observar a quantidade de gordura no gradiente do butirômetro;

Para obter a quantidade de sólidos totais e sólidos desengordurados, obter a densidade, com o auxílio do termolactodensímetro e usar o disco de Ackermann para encontrar o resultado.

Montagem de material

- 1 Proveta com 400 mL da amostra;
- 1 Becker pequeno com 60 mL da amostra;
- 1 Becker pequeno com água morna para lavagem do analisador;
- 1 Proveta pequena com água;
- 1 Butirômetro;
- Ácido sulfúrico para análise de leite;
- Álcool isoamílico;
- 1 Pipeta de 10 mL para o ácido;
- 1 Pipeta de 11 mL para a amostra;
- 1 Pipetador automático monocanal;
- 1 Caixa de ponteiras;
- 1 Pano umedecido;
- Disco de Ackermann;
- Termolactodensímetro;
- Tabela conversora de temperatura para densidade;



Figura 11- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de determinação de gordura, EST e ESD.

Resíduos de inibidores no leite

Amostras

Primeira linha da grade – duas amostras de leite normais;

Segunda linha da grade – uma amostra de leite e uma de iogurte;

Terceira linha da grade – uma amostra de leite normal e uma de iogurte com 2 gotas de fucsina;

Técnica abordada

2 amostras iniciais, que já sofreram o processo térmico de 80°C por 15 minutos para eliminar os competidores que possam estar presentes;

Será adicionar 1 mL da cultura em cada tubo que depois irá para banho-maria por 3 horas;

Voltamos com os tubos prontos, um positivo para resíduos (com leite fluído) e um negativo (com iogurte);

Adicionar 0,3 mL de CTT em cada tubo (que será água para simulação);

Voltamos com um tubo positivo (com leite fluído) e um negativo (com iogurte + 2 gotas de fucsina, para estar com a coloração rosa, indicando que houve a redução do CTT);

Cultura – 10 mL de iogurte + 30 mL de água destilada;

Montagem de material

- 2 Tubos com 10 mL de leite;
- 2 Tubos com 11 mL de leite;
- 1 Tubo com 11 mL de iogurte;
- 1 Tubo com 11 mL de iogurte + 2 gotas de fucsina;
- 1 Tubo com água, simulando o CTT;
- 1 Tubo com a cultura;
- 1 Pipetador automático monocal;
- 1 Caixa com ponteiras;
- 1 Placa com teste de antibiograma para ilustrar o teste de discos;



Figura 12- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de resíduos.

Pesquisa de enzimas

Amostras

1. Peroxidase

1 amostra de leite pasteurizado

1 amostra de leite UHT

2. Fosfatase alcalina

Análise totalmente simulada:

Então serão 3 amostras de leite;

3 amostras de leite com água pra simbolizar a amostra com o substrato;

3 amostras com os resultados, 2 cinzas (negativo e controle) e 1 azul (positivo);

Técnica abordada

1. Peroxidase

Vamos adicionar 2 mL de guaiacol 1% em cada amostra (10 mL, já aquecida em banho-maria a 45°C por 5 minutos) + 3 gotas de água oxigenada, a amostra de leite pasteurizado, formará um anel laranja, indicando a presença de peroxidase, o que é esperado.

2. Fosfatase alcalina

Serão 3 tubos de amostra, que irão adicionar o substrato (água com leite), essa solução irá para o banho-maria e voltamos com ela pronta, sem alteração;

Em seguida, são adicionadas 6 gotas da solução reagente (dicloroquinona) e 2 gotas do catalizador (sulfato de cobre);

Levamos para o banho-maria e voltamos com o resultado, dois tubos cinza (negativo e controle) e um tubo azul (positivo);

A solução reagente é feita com um composto amarelado (ácido píprico) e água, para simular a dicloroquinona;

A solução catalizadora é feita com água e azul de metileno para simular o sulfato de cobre;

Os tubos negativos são feitos com 0,5 mL de leite + 5 mL do substrato + uma pitada de tinta guache preta;

O tubo positivo é feito com 0.5 mL de leite + 5 mL de substrato + 3 gotas de azul de metileno solução;

Montagem de material

1. Peroxidase

- 1 Tubo com 10 mL de leite pasteurizado;
- 1 Tubo com 10 mL de leite UHT;
- 1 Tubo com no mínimo 5 mL de guaiacol 1%;
- Água oxigenada 10 volumes;
- 1 Pipetador monocanal;
- 1 Caixa de ponteiros;

2. Fosfatase alcalina

- 3 Tubos com 0,5 mL de leite;
- 1 Erlenmeyer com 100 mL de substrato;
- 1 Pipeta graduada de 5 mL;
- 1 Pera;
- 3 Tubos com 0,5 mL de leite + 5 mL de substrato;
- 1 Conta-gotas com solução reagente;
- 1 Conta-gotas com solução catalizadora;
- 1 Tubo positivo (azul);

- 2 Tubos negativos (cinza);



Figura 13- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de enzimas.

Pesquisa de fraudes

Neutralizantes de acidez

1. Bicarbonato

- 2 Tubos com 10 mL de álcool absoluto
- 1 Tubo com 10 mL leite;
- 1 Tubo com 10 mL de leite + 1 pitada de bicarbonato;
- Ácido rosólico;
- 2 Placas vazias;

Colocar uma amostra em cada placa, adicionar o álcool e depois adicionar 3 gotas do ácido rosólico;

Positivo – coloração rosa;

Negativo – coloração laranja;



Figura 14- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de bicarbonato.

Reconstituintes de densidade

1. Amido

- 1 Tubo com 10 mL de leite (com bucha);
- 1 Tubo com 10 mL de leite + uma pitada de amido (com bucha);
- 1 Conta-gotas com lugol;

Esquentar as amostras e resfriar, em seguida adicionar 5 gotas de lugol;

Positivo – anel azulado;

Negativo – inalterado;

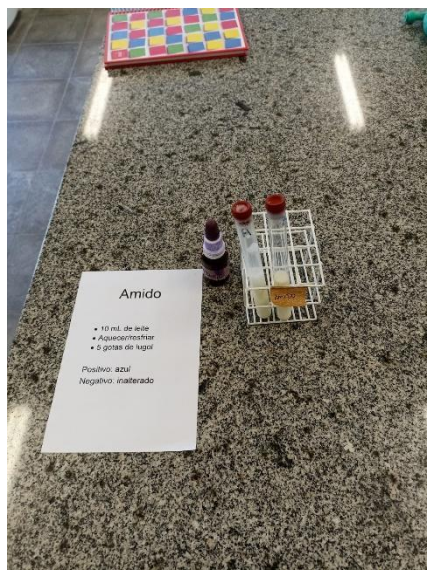


Figura 15- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de amido.

2. Sacarose

- 1 Tubo com 5 mL de leite (com bucha);
- 1 Tubo com 5 mL de leite + uma pitada de açúcar (com bucha);
- 2 mL de ácido sulfúrico 50%;
- Conta-gotas com resorcina 1%;

Adicionar o ácido sulfúrico em cada amostra e depois 5 gotas de resorcina, aquecer na lãmparina;

Positivo – coloração avermelhada;

Negativo – inalterado;

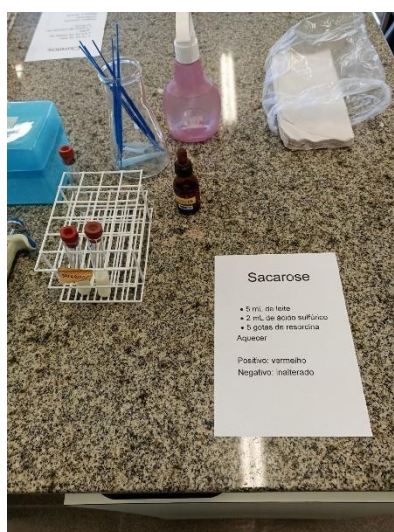


Figura 16- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de sacarose.

3. Cloretos

- 1 Tubo com 10 mL de leite;
- 1 Tubo com 10 mL de leite + uma pitada de sal;
- Frasco com nitrato de prata;
- Conta-gotas com cromato de potássio 5%;
- 1 Pipeta de 5 mL;
- 1 Pera;

Adicionar 4,5 mL de nitrato de prata em cada amostra, depois adicionar 5 gotas de cromato de potássio em cada uma;

Positivo – amarelo;

Negativo – laranja;

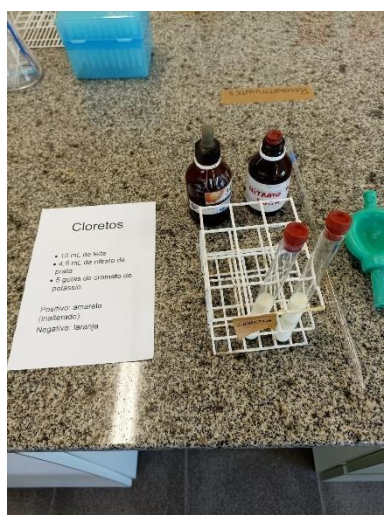


Figura 17- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de cloretos.

Substâncias conservadoras

1. Cloro

- 1 Tubo com 5 mL de leite;
- 1 Tubo com 5 mL de leite + 0,5 mL de hipoclorito;
- Frasco com iodeto de potássio 7,5%;
- 1 Pipetador monocal;
- 1 Caixa de ponteiros;

Adicionar 0,5 mL de iodeto de potássio em cada amostra;

Positivo – amarelo;

Negativo – inalterado;

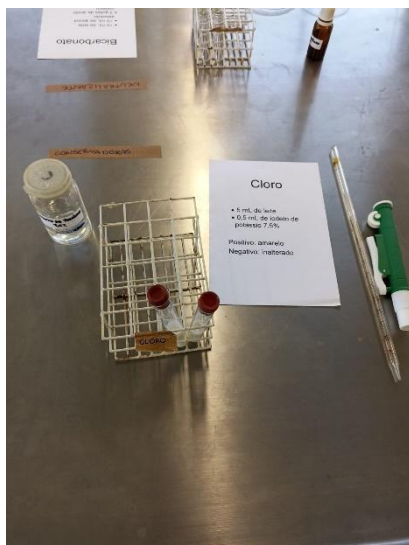


Figura 18- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de cloro.

2. Formol

Não temos formol no laboratório, simulamos o resultado!

- 2 Tubos com 5 mL de leite;
- Ácido sulfúrico 50%;
- 1 Erlenmeyer com água, simulando o cloreto férrico;
- 1 Pipetador monocanal;
- 1 Caixa de ponteiras;
- 1 Tubo negativo, só com o precipitado do ácido e 1 tubo com adição de 0,1 mL de fucsina e 3 gotas de azul de metileno para simular o positivo (deixados na pia, juntamente com o Becker usado para aquecer);

Adicionamos 2 mL de ácido sulfúrico em cada amostra + 1 mL de cloreto férrico e aquecemos, na hora que for aquecer, trocar os tubos.

Positivo – lilás;

Negativo – inalterado;



Figura 19- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de formol.

3. Peróxido de hidrogênio

- 1 Tubo com 5 mL de leite;
- 1 tubo com 5 mL de leite + 5 gotas de água oxigenada 10 volumes;
- Conta-gotas com iodeto de potássio 40%;

Adicionamos 3 gotas de iodeto de potássio em cada amostra;

Positivo – amarelo;

Negativo – inalterado;

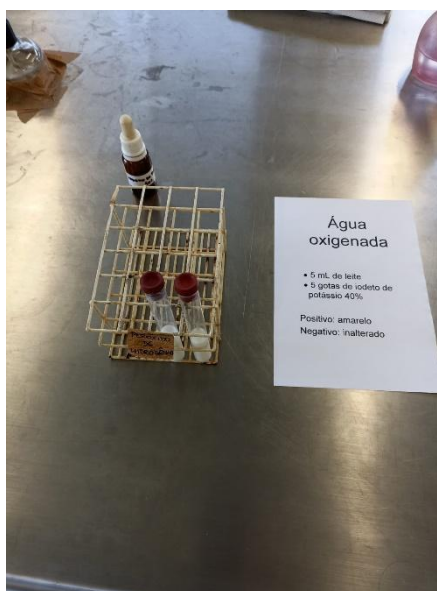


Figura 20- Material a ser disponibilizado para execução de aula prática de pesquisa de peróxido de hidrogênio.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal.** 2022.

DA SILVA, NEUSELY et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** Editora Blucher, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION., **Microbiology of the food chain-Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Part 1: Colony count at 30° C by the pour plate technique.** ISO 4833-1: 2013. 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of the food chain—Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae—Part 2: Colony-count technique.** ISO 21528-2, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology-General guidance for the enumeration of coliforms-Most probable number technique.** ISO 4831 2a, 1991.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Milk and milk products - Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds - Colony-count technique at 25 degrees C.** ISO 6611, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)-Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.** ISO 6888-1, 1999.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of the Food Chain—Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of Salmonella.** ISO 6579-1, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Amd 1: Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.** ISO 11290-1: 1996. 2004.



UFPEL

Redes sociais:

<https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/o-lipoa/>

@[veterinariapreventiva.ufpel](https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/o-lipoa/)