

Algumas considerações em torno do exame físico-químico e bacteriológico do leite e os resultados obtidos com a pasteurisação em Porto Alegre

Dr. Coulo Barcellos

Docente da Faculdade de Medicina

Considera-se leite o produto de secreção das glândulas mamárias das fêmeas dos mamíferos.

Quando se fala em leite, sem outra especificação, compreende-se desde logo que se designa unicamente leite de vaca.

O Congresso Internacional reunido em Gênova, em 1908, para repressão das fraudes, adotou para o leite de boa qualidade, a seguinte definição: "O leite é o produto integral da mungidura total e ininterrupta de uma fêmea leiteira, em estado hígido, bem nutrida e descansada."

Todos os problemas que dizem respeito ao abastecimento e consumo desse alimento são de grande relevância em Saúde Pública, porisso que o leite é a alimentação exclusiva dos recém-nascidos, o alimento preferido da infância, da velhice e dos doentes.

Tratando-se de alimento completo que contém todos os princípios indispensáveis à nutrição, como proteicos, gorduras, hidrato de carbono, vitaminas, sais e água, no mais perfeito equilíbrio, compreende-se a importância que merece o exame físico-químico e bacteriológico deste produto, não só para verificar a sua boa qualidade, como também para reprimir as possibilidades de fraude.

Análise físico-química

A análise físico-química do leite é da máxima importância, constituindo o fundamento de toda a fiscalização sanitária desse alimento natural.

Caractéres organolépticos:

Côr — O leite fresco é de côr característica, branco-amarelada, idêntica, para alguns autores, à da porcelana branca, menos brilhante, naturalmente.

O matiz amarelo predomina no leite gordo, indicando, às vezes, a presença de pús, que o exame microscópico revelará.

A côr azulada do leite faz supor adição de regular quantidade de água.

A presença de certos germes transforma a côr do leite, como acontece com os bacilos piocianicos, que lhe conferem um tom azul-esverdeado, ou os bacilos "lacti-eritrogenes" e "prodigiosus", que comuni-

cam ao leite tonalidade avermelhada. Póde provir tambem esta côr, da presença de sangue, facilmente verificada pelo exame microscópico.

O leite normal apresenta um aspecto opaco característico, consequente da presença de gordura emulsionada e de suspensões coloidais de natureza proteica, que entram em sua composição.

Odor — O odor do leite é "sui-generis", recordando, até certo ponto, ao que exala a pele das vacas sadias.

E' facilmente alterável, dependendo, ora do gênero de alimentação do animal, ora das fermentações que tenha sofrido, ou, enfim, da falta de higiene dos estábulos e dos encarregados da colheita do leite.

Sabôr — O leite tem sabôr adocicado característico, apresentando variações, de acordo com as mesmas causas que alteram o odor.

Acresce salientar ainda que o tratamento higiênico do leite (pasteurização, esterilização, cosimento) se reflete no sabôr, bem como a saúde do animal (inflamação aguda ou crônica das glândulas mamárias).

Exame físico:

Viscosidade — A viscosidade do leite é maior do que a da água, apresentando-se de 5,060 a 5,726, na temperatura de 20°C.

Tensão superficial — E' função da quantidade de gordura e está, por consequente, em razão inversa da mesma.

Índice crioscópico — Segundo Winter, o leite apresenta um característico verdadeiramente único entre os diversos produtos de secreção orgânica, que consiste no seu perfeito equilíbrio osmótico com o soro sanguíneo.

Assim, seus índices crioscópicos são mais ou menos idênticos, aliás o que não é de admirar, pois que, de acordo com Gorup-Besanez, a composição das cinzas oriundas da calcinação do leite muito se aproxima da que se obtém com a calcinação do sangue, justificando pois, os pontos de semelhança existentes entre estes dois líquidos orgânicos.

A determinação do índice crioscópico serve para averiguar, exgotadas as demais provas a fraude do leite.

No estado normal, o ponto crioscópico do leite varia de $-0,550$ a $-0,530$.

Densidade — Dois processos diferentes permitem determinar a densidade do leite: pela balança de Mohr-Westfal e pelo densímetro.

Balança de Mohr-Westfal — A determinação da densidade do leite por este processo não constitue um meio absolutamente certo, motivo porque, na prática, recorre-se de preferência aos lacto-densímetros.

Densímetro — Como foi dito, na prática, é o processo correntemente empregado para determinar a densidade do leite.

Utiliza-se o termo-lacto-densímetro de Quevenne, cuja aferição póde ser feita por um densímetro controlado, ou mesmo pela balança de Mohr-Westfal.

Técnica — Enche-se com leite bem homogeneizado, uma proveta de 250 a 300 cc. de capacidade, introduzindo-se, a seguir, o densímetro.

Uma vez estacionado o aparelho, faz-se a leitura, que deve corresponder exatamente à superfície livre do leite e cujo resultado é expresso de acordo com a temperatura.

A 15°C, a densidade será a da leitura. Si fôr maior ou menor do que o estalão 15°C, proceder-se-á à correção, usando para isso uma tabela.

Na falta desta, se corrigirá a densidade, adicionando ou subtraindo 0,2 por grau de temperatura abaixo ou acima de 15°C.

A densidade do leite normal varia de 1029 a 1032, a 15°C.

A determinação da densidade pelo lacto-densímetro está sujeita a causas de erro proveniente do próprio operador que, fazendo a leitura do gráu indicado no aparelho, não o faz com a necessária atenção, registando assim um número que não exprime a realidade.

Isoladamente, a densidade do leite não constitue meio capaz de afirmar qualquer adulteração ou fraude, precisando da colaboração dos outros elementos que são mais sensíveis, para atingir tal objetivo.

Deve-se levar em conta que o leite, nos primeiros dias que seguem ao parto, apresenta uma densidade muito reduzida, sem que, para tanto, intervenha ação erinínosa do fornecedor.

Exame químico:

As constantes químicas do leite normal constituem a base principal de uma fiscalização sanitária deste produto.

Determinação da gordura — Existem diversos processos para a determinação da gordura do leite, classificados em 4 grupos principais:

1.º grupo — os processos reunidos neste grupo baseiam-se na circunstância de que a gordura, por sua menor densidade, ocupa sempre, pelo repouso mais ou menos prolongado, a superfície do leite.

Os aparelhos empregados para dosar a gordura do leite por este processo são chamados cremômetros, dos quais existem vários tipos.

São métodos físicos de dosar a gordura muito imprecisos, não sendo usados na prática.

2.º grupo — Os processos pertencentes a este grupo tomam por ponto de referência a opacidade do leite, que varia de acordo com a quantidade de gordura que contiver.

Os aparelhos empregados para este fim são os lactoscópios, entre os quais são mais conhecidos o de Hussner e o de Donné.

O resultado, dependendo diretamente da acuidade visual do operador, compreende-se desde logo que não deve merecer confiança na prática.

Atualmente, não se utilizam mais os lactoscópios na dosagem da gordura.

3.º grupo — Pertencem a este grupo os processos que empregam reativos químicos, para extrair a gordura que se quer dosar.

Existem o lactobutirômetro de Marchand, de Saleron, Adam e outros.

No lactobutirômetro ou galatômetro de Adam, usa-se como reativo extrator, uma solução etéreo-alcoólica.

Resta verificar no aparelho o volume ocupado pela gordura, ou pesá-la após evaporação do dissolvente.

Marchand emprega como reativo a mistura álcool-éter, agindo sobre o leite, após prévia alcalinização pela lixívia de soda a 25%.

4.º grupo — Os métodos que constituem este grupo baseiam-se na propriedade que tem o ácido sulfúrico de dissolver todos os componentes do leite, com exceção da gordura.

Citam-se, entre êles, o de Babcock e o método clássico de Gerber.

O primeiro consiste em tratar o leite pelo ácido sulfúrico, de densidade de 1,820. Centrifuga-se, a seguir, a mistura num tubo especialmente graduado, e lê-se na parte superior, a quantidade de gordura que contém o leite em exame.

Processo de Gerber — De todos os processos para determinar a taxa de gordura do leite, o de Gerber é o mais preciso e essencialmente prático.

Gerber emprega um aparelho denominado butirômetro, que se compõe de um longo tubo, em média de 15 cm. de comprimento, tendo na parte inferior uma haste estreita, arredondada ou achatada, conforme o modelo do aparelho, de que existem vários. Sobre esta haste, estão gravadas divisões que correspondem a 0,1% de substância gordurosa, permitindo um cálculo exato e preciso.

Técnica — Colocado o butirômetro em uma estante, introduzem-se nêle 10cc. de ácido sulfúrico, de densidade compreendida entre 1820 a 1830, e 11cc. de leite a examinar, juntando-se, a seguir, 1cc. de álcool amílico.

Arrolha-se e agita-se fortemente o butirômetro, até dissolução completa da caseína.

Terminada esta operação, que deve ser feita com muito cuidado, pois é fortemente exotérmica, necessitando para isso que os tubos sejam envolvidos em borracha, leva-se à centrifugação.

Si a centrífuga não tiver intermação dirêta, o butirômetro deve ser colocado durante 5 a 10 minutos em banho-maria (65 - 60°C), e, só depois então, centrifugados pelo espaço de 3 a 5 minutos.

A leitura será fácil, ao longo da coluna graduada, sendo o resultado expresso em gramas de gordura por cento.

O mecanismo íntimo da reação que se passa dentro do butirômetro é o seguinte: o ácido sulfúrico carameliza a lactose e dissolve a caseína, deixando livre, porém, a gordura que, sob a ação do calor e da centrifugação, forma uma camada bem distinta, ao longo da haste graduada.

O ácido sulfúrico empregado na reação deve ser desnitrado, tendo densidade compreendida entre 1830 a 1840, a 15°C.

Para obtê-la, a mais ou menos 1825, deve-se ajuntar ao ácido de:

1840	—	105cc.	de água distilada por litro de ácido.
1838	—	93cc.	" " " " " " "
1836	—	81cc.	" " " " " " "
1834	—	69cc.	" " " " " " "
1832	—	56cc.	" " " " " " "
1830	—	44cc.	" " " " " " "
1828	—	32cc.	" " " " " " "

De acordo com a taxa de gordura, classifica-se o leite do seguinte modo:

- 2,7% = desnatado
- 2,7% a 3,5% = magro
- + 3,5% = gordo.

Determinação da acidez do leite — Logo após a ordenha, a reação do leite é anfótera, acidificando-se a seguir, no decorrer do tempo.

Trata-se de uma pesquisa de grande relevância para a Saúde Pública, constituindo uma das bases mais firmes em que se fundamenta a fiscalização sanitária desse produto.

Assim, a determinação da acidez total do leite tem grande valor prático para se conhecer o seu estado de conservação, e mesmo a sua pureza biológica.

A técnica consiste na neutralização da acidez total (livre + combinada), por soluto alcalino titulado, expressando-se o resultado em ácido láctico, por litro de leite.

Coloçam-se 10 cc. de leite bem homogêneo em balão de Erlenmeyer, de 100cc., juntando-se 2 a 4 gotas de soluto alcoólico de fenoltaleína a 2%, que serve como indicador, e titula-se com a solução Dornic (solução de soda a 4,144%) contida em uma bureta graduada, até o aparecimento de cor rósea leve.

O número de cc. de solução de soda gastos, lidos na bureta do acidímetro, multiplicado por 10, dá a acidez em graus Dornic, em 1000cc. de leite em exame.

Cada grau Dornic é igual a 100 mgrs. de ácido láctico em 1000cc. de leite.

É considerado normal o leite com acidez compreendida entre 15 e 20 graus Dornic; mais de 20° — ácido; menos de 15° — ou alcalino ou fraudado com água, o que aliás, com mais precisão, se poderá constatar com outras determinações, tais como densidade, extrato magro e a soma densidade + gordura, que não deve ser menor que 1034,5.

Dosagem do extrato seco — Usa-se, na prática, para determinação do extrato seco, a tabela ou calculador de Ackermann.

Este autor inventou um aparelho, por meio do qual se pôde determinar rapidamente o extrato seco do leite, partindo da densidade e da taxa de gordura, previamente conhecidas.

Em geral, o extrato seco do leite varia de 11 a 14,24%.

Dosagem do extrato magro — Determina-se o extrato magro, subtraindo a gordura do extrato sêco.

Exemplo: um determinado leite tem 3,8% de gordura e 12,94% de extrato sêco; o extrato magro será 9,14%.

Para conclusão de uma fraude de água, este dado, juntamente com a acidez e mais a soma da densidade + gordura, que não deve ser inferior a 1,034,5, fornece resultados preciosos.

Prova do álcool e do alizarol — Estas duas provas são de grande importância no exame preliminar do leite, para conhecer as alterações e adulterações deste produto.

Prova do álcool - Esta prova é muito sensível e de simples execução.

Em tubo de ensaio, misturam-se 1cc. de álcool de 68 a 70° e 1cc. de leite.

O leite fresco não se coagula, ao passo que o alterado apresenta este fenômeno, de imediato.

Prova do alizarol — Em um cc. de alizarol, adiciona-se 1cc. de leite a examinar.

Não havendo coagulação, permanecendo cor violácea, trata-se de leite normal. Havendo, ao contrário, coagulação com cor amarela ou amarelo-canário, significa alteração do leite, em geral por excesso de acidez.

Outras dosagens podem ser praticadas no leite, como a da lactose e das proteínas, que deixaremos de descrever, por não ter o mesmo interesse higiênico.

Verificação da atividade das diástases — As diástases existentes no leite, ou que se formam em consequência da ação biológica dos micróbios que ele contém, podem ser caracterizadas por intermédio de reações químicas de fácil execução.

A negatividade destas provas indica que o leite foi aquecido à temperatura superior a 80°, que inativa todas as diástases.

Prova das peroxidases — A prova das peroxidases faz-se por meio da reação de Dupuy, que consiste em adicionar 3 gotas de soluto aquoso de guaiacol a 1% e algumas gotas de soluto de água oxigenada a 10%, em 5cc. de leite a examinar.

O leite que não foi aquecido a 80° apresenta coloração vermelha, o que não acontece no caso contrário.

Prova da catalase — Esta prova consiste em verificar a quantidade de oxigênio que se desprende, quando se tratam 15cc. de leite por 3cc. de água oxigenada.

Em geral, o leite proveniente de vacas portadoras de mastite e de doenças febris, bem como quando possui muitos micróbios, revela intenso desprendimento de oxigênio.

Prova das redutases — Faz-se esta prova, incubando durante algum tempo leite adicionado com soluto de azul de metilênio. A cor intensa da mistura desaparece, mais ou menos rapidamente, consoante a quantidade de redutases, relacionada à abundância de micróbios sacarolíticos.

EXAME BACTERIOLÓGICO DO LEITE

O exame bacteriológico do leite é de grande valor, para avaliar as suas condições higiênicas.

São inúmeras as moléstias transmitidas pelo leite, por diversos mecanismos:

1.º — transmissão de moléstias que são comuns ao animal e ao homem.

2.º — transmissão de moléstias, por determinados germes, que contaminam o leite em diferentes fases do seu comércio, a partir do momento da ordenha.

3.º — transmissão de moléstias, em consequência de alteração espontânea ou artificial das propriedades físico-químicas do leite.

No 1.º caso, cita-se, de maneira especial, a tuberculose, a melitococcia, diversas salmoneloses, afecções produzidas pelo estreptocóco, etc.

No 2.º caso, as infecções que se podem transmitir são muito numerosas, dependentes da própria mungidura, feita por portadores de germes, sem os necessários cuidados de higiene, e cujos agentes patogênicos encontram no leite um ótimo meio de cultura (febre tifóide, paratifóide, escarlatina, diftéria, afecções gastro-intestinais das crianças e dos adultos, anginas, incluindo-se atualmente até a paralisia infantil).

Finalmente, no 3.º caso, o leite pôde ainda ser perigoso nos casos de fraude, pela adição de água de poços contaminados ou de produtos químicos adicionados com o fim de conservá-lo, ou de impedir as alterações espontâneas.

No leite, encontram-se habitualmente duas classes de germes: acidificantes e proteolíticos.

Pela ação dos germes proteolíticos sobre as matérias protéicas, o leite se altera profundamente, sem perder no entanto, seu estado líquido.

Os germes acidófilos impedem o desenvolvimento dessas ações proteolíticas, tornando cada vez mais ácida a reação, constituindo no leite flora bacteriana útil, e mesmo fisiológica, dentro de certo limite, tolerável ou conveniente.

Os germes proteolíticos são representados pelo proteo, bacilo fluorescente e liquidificante, bacilo do grupo "subtilis" e mesentéricos e, entre os anaeróbios, pelo bacilo "putrificus".

No grupo dos acidificantes, incluem-se os fermentos lácticos, que atuam sobre a lactose do leite, com produção de ácido láctico, alguns estreptocócos, como o "acidilactici" de Hueppe, o "termophilus" de Orla-Gensen, etc., bacilos "calcasicum", "acidophilus", "bulgaricum" e, principalmente, os germes do grupo "coli-aerógenes".

As bactérias do grupo coli-aerógenes possuem as características de bastonetes gram-negativos, desenvolvendo-se em boas condições, nos meios de cultura artificiais.

Estes germes pertencem a dois gêneros diversos: o colibacilo, ao gênero "Escherichia" e o bacilo aerógenes, ao gênero "aerobacter", constituindo assim as espécies *Escherichia coli* e *aerobacter aerógenes*.

Exame quantitativo — O exame quantitativo tem por fim contar o número de micróbios existentes na unidade de volume do leite a examinar, unidade que é, habitualmente, o cm³.

A contagem directa dos micróbios é muito difficil, em virtude da sua aglomeração, motivo porque se deve, primeiramente, diluir o leite em água esterilizada, semeando em seguida, sobre placas de gelose.

A diluição é feita por meio de pipetas calibradas, ou por successivas misturas com água esterilizada, obtendo-se diluições a 1/10, 1/100, 1/1000, etc.

Coloca-se a placa de Petri na estufa, a 37°, durante 24 a 48 horas, e depois contam-se as colônias desenvolvidas que, multiplicadas pelo título da diluição, dará o número de micróbios por cm³.

A contagem de germes se faz, ou em gelose simples, ou em gelose com indicador.

Atualmente, emprega-se a gelose com indicador (bromocresol a 1%). na qual as colônias acidificantes tomam coloração amarelada e as alcalinizantes, proteolíticas e indiferentes ficam de cor azulada.

Predominam no leite de boa qualidade colônias de germes acidificantes, e no de má qualidade, colônias alcalinizantes.

Exame qualitativo — Como não é possível fazer uma análise bacteriológica diária de todos os germes patogênicos que se podem encontrar no leite, é preciso adotar um índice de contaminação idêntico ao que se faz com a água, dotado das características de ser sensível e rápido.

Este índice, conforme se realiza em todos os serviços de higienização de leite, é a pesquisa dos germes do grupo coli-aerógenos.

Utiliza-se de preferência o meio de Endo, que tem a vantagem de ser sensível e de dar resultados precisos no fim de 24 horas.

Para isto, tomam-se 5 tubos de hemólise, cheios até à metade com meio de Endo, e nos quais junta-se 1cc. da diluição do leite a 1%.

A semeadura deve ser feita por picada, desprezando-se o restante do líquido.

A seguir, estufa a 37°, durante 24 horas.

A pesquisa é considerada positiva quando, no fim deste praso, os tubos apresentarem as seguintes características:

- 1.° — gás.
- 2.° — arrebatamento da gelose.
- 3.° — viragem para cor mais intensa do que a do meio de Endo.
- 4.° — odor fecalóide.

Póde-se ainda recorrer, para melhor segurança da prova, à pesquisa do indol em água peptonada, ou à passagem em assúcares, como a glicose, lactose, sacarose, manita e dulcita.

Pesquisas complementares às vezes se tornam necessárias para identificação do estreptocóco, bacilos do grupo tífico-paratífico, bem como do bacilo de Koch. Para tanto, utilizam-se meios especiais de cultura, coloração pelo Gram e pelo Ziehl-Nielsen, e inoculação em coabaio.

Utiliza-se em Porto Alegre, para higienização do leite, o processo americano conhecido por pasteurização baixa ou lenta.

Consiste no aquecimento do leite entre 63° e 65°C., durante 30 minutos, seguido de brusco resfriamento e conservação em baixa temperatura (4° a 5°), para não se alterar.

Apresenta a pasteurização baixa a vantagem de não prejudicar as propriedades físicas e químicas do leite, salvo as vitaminas termolábeis que, menos resistentes ao calor, diminuem levemente.

Quanto à ação sobre as bactérias, a experiência tem demonstrado que a temperatura de 63° a 65° é suficiente, de regra, para eliminar as formas vegetativas dos germes patogênicos, com exceção de certas bactérias termófilas.

Vejamos, a seguir, os resultados obtidos em nosso meio com a pasteurização baixa, consoante dados fornecidos pelo D.E.S. (Fiscalização dos gêneros alimentícios) — Usina de Beneficiamento, onde podemos averiguar as condições em que o leite é fornecido à população de Porto Alegre:

D. E. S. — DIVISÃO TÉCNICA

FISCALIZAÇÃO DOS GÊNEROS ALIMENTÍCIOS

USINA DE BENEFICIAMENTO

Laboratório de Química

Contrôle do leite INDIVIDUAL até o mês de Novembro de 1941

Ano de 1941

Amostras normais	12.369
magros	1.220
desnatados	45
Anormais	487
ácidos	17
impuros	384
aguados	34
prejudicados	34
Total de amostras examinadas	14.556
Média de gordura	3,80
Média de extrato-seco	12,78
Média de extrato magro	8,98
Média de acidês	16,5

Visto:

Dr. Pedro A. Pereira
Médico-Chefe da G. A

D. E. S. — DIVISÃO TÉCNICA**FISCALIZAÇÃO DE GÊNEROS ALIMENTÍCIOS**

**Médias, índices e percentagens verificados na apreciação dos resultados
do Laboratório Bacteriológico**

CONTAGEM DE GERMES POR CC.

LEITE CRÚ	Global		16.200.000						
									
	Diferencial	<table> <tr> <td rowspan="2">{</td><td>Acidificantes</td><td>.....</td><td>16.700.000</td></tr> <tr> <td>Alc. e indiferentes</td><td>.....</td><td>11.800.000</td></tr> </table>	{	Acidificantes		16.700.000	Alc. e indiferentes		11.800.000
{	Acidificantes			16.700.000					
	Alc. e indiferentes		11.800.000						

LEITE PAST.	Global		47.200						
									
	Diferencial	<table> <tr> <td rowspan="2">{</td><td>Acidificantes</td><td>.....</td><td>52.200</td></tr> <tr> <td>Alc. e indiferentes</td><td>.....</td><td>30.000</td></tr> </table>	{	Acidificantes		52.200	Alc. e indiferentes		30.000
{	Acidificantes			52.200					
	Alc. e indiferentes		30.000						

ÍNDICE DE REDUÇÃO 99,70%

PESQUISA DE E. CÓLI E A. AERÓGENES

LEITE PASTEURIZADO 5% de POSITIVO
LEITE CRÚ 100% de POSITIVO

Porto Alegre, 11 de Julho de 1941.

A Média Global de germes foi compreendida dos exames feitos de Julho de 1937 até 10 de Julho de 1941.

A Média diferencial de germes foi compreendida dos exames feitos de Abril de 1940 até 10 de Julho de 1941.

Dr. Pedro A. Pereira

Médico Chefe da G. A.

O Regulamento do D. E. S., no capítulo sobre fiscalização sanitária do leite, art. 349, estabelece o seguinte:

Será considerado leite "integral", somente aquele cujas cifras de análise não estiverem abaixo do padrão mínimo seguinte:

Gordura	3,5%
Ext. seco	12,2%
Ext. magro	8,7%
Lactose anidra	4,3%
Acidez em grãos Dornic	15°

Estas cifras referem-se ao padrão organizado para a Capital Federal, porquanto, em nosso meio, ainda não foi estabelecido um padrão local, o que aliás seria muito interessante, em virtude das variações regionais existentes a respeito.

Em face das estatísticas apresentadas, verifica-se, desde logo, que as médias dos elementos fundamentais do leite demonstram, de modo incontestável, as boas condições em que o produto é entregue ao consumo.

Quanto à ação sobre os germes, o índice de redução de 99.70% exprime bem alto a eficiência do sistema de pasteurização adotado em Porto Alegre.