



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALBERTO KOJI YAMADA

**RASTREAMENTO DE CONTAMINAÇÕES  
MICROBIOLÓGICAS E RESÍDUOS DE PROTEÍNA EM  
INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS**

---

Londrina  
2011

ALBERTO KOJI YAMADA

**RASTREAMENTO DE CONTAMINAÇÕES  
MICROBIOLÓGICAS E RESÍDUOS DE PROTEÍNA EM  
INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanerli Beloti

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

Y19r Yamada, Alberto Koji.

Rastreamento de contaminações microbiológicas e resíduos de proteína  
em indústrias de laticínios / Alberto Koji Yamada. – Londrina, 2011.  
77 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa  
de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Leite – Contaminação – Teses. 2. Leite –  
Microorganismos – Teses. 3. Laticínios – Microbiologia – Teses.  
4. Escherichia coli – Teses. 5. Indústria de laticínios – Teses. I.  
Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de  
Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência

ALBERTO KOJI YAMADA

**RASTREAMENTO DE CONTAMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E  
RESÍDUOS DE PROTEÍNA EM INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanerli Beloti  
UEL – Londrina – PR

---

Dr<sup>a</sup>. Lucienne Garcia Pretto Giordano  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elsa Helena Walter de Santana  
UNOPAR

Londrina, 28 de março de 2011.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, por todo o amor, apoio e incentivo ao longo da minha vida.

À Mishelly Peixoto pelo carinho e compreensão.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanerli Beloti pela orientação, paciência e contribuição na minha formação profissional.

Ao Ronaldo Tamanini, obrigado pelas horas de ajuda com correções e viagens em tantas madrugadas.

Aos amigos do LIPOA, Livia Cavaletti, Débora Garcia, Francielle Abreu, Fernanda Mantovani, Márcia Rocha, Cristiane Giombelli, Ana Paula Battaglini, Rafael Fagnani, Francine Fernandes, Carolina Shecaira, Guadalupe Espicaski, Prof. Dr. Valmir de França, Rafael Máximo, João Paulo Araújo, José Carlos Ribeiro, Fernanda Blasques e Fábio Goscinski, pelo companheirismo, conversas, discussões e amizade.

A todos que contribuíram para que esta pesquisa fosse realizada, acordando no meio da madrugada para as viagens, preparando material e ficando até tarde no laboratório para concluir as análises.

Aos laticínios por aceitarem participar desta pesquisa.

À todos os amigos, professores, funcionários e colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL.

YAMADA, A. K. **Rastreamento de contaminações microbiológicas e resíduos de proteína em indústrias de laticínios.** 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

O leite, por sua riqueza em nutrientes, representa uma importante fonte alimentar para o homem e um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de um grande número de micro-organismos. Portanto, detectar rapidamente e solucionar o problema das contaminações no leite é um desafio para a indústria de alimentos. Este trabalho teve como objetivo determinar os principais pontos de contaminação dentro da indústria de leite pasteurizado bem como os pontos que apresentam resíduos de alimento após a limpeza. Foram colhidas amostras de leite e *swabs* de superfície dos equipamentos envolvidos no processo de pasteurização de 8 laticínios em 9 rastreamentos no estado do Paraná para determinar a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC). Para contagem de AM realizou-se a semeadura em Ágar Padrão de Contagem (PCA). Para enumeração de CT e *E. coli* foi utilizado o sistema 3M™ *Petrifilm™* e para detectar resíduos de proteínas no equipamento utilizou-se o teste *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™*. Os principais pontos de contaminação do leite pasteurizado por AM, CT e EC foram o tanque de equilíbrio antes da empacotadeira, o tanque pulmão da empacotadeira e as partes internas da empacotadeira. Os pontos que apresentaram resultado positivo para presença de resíduos de proteína foram a tubulação de entrada do tanque de equilíbrio antes da empacotadeira, o tanque de equilíbrio antes da empacotadeira e a tubulação de entrada de leite no tanque pulmão da empacotadeira. Os laticínios utilizam concentrações e temperaturas inadequadas para circulação das substâncias utilizadas na limpeza e sanitização dos equipamentos, o que resulta em higienização ineficiente ou ainda comprometimento do equipamento ao provocar corrosão das superfícies e desgaste precoce das borrachas de vedação. O teste para detecção de resíduos de proteínas pode representar uma importante ferramenta para avaliar a eficiência da limpeza de equipamentos, uma vez que oferece resultados imediatos, permitindo correções que podem evitar perdas e problemas aos laticínios. Em muitos casos não se conseguiu detectar contaminações em superfícies da empacotadeira, por terem origem em pontos internos, inacessíveis à coleta de amostras. No entanto, ficou evidente a relação desses pontos com a contaminação do leite pasteurizado embalado, já que este apresentou contagens de AM, CT e EC superiores às do leite antes de passar pela empacotadeira.

**Palavras-chave:** Leite. *Clean-Trace™*. Aeróbios mesófilos. *Escherichia coli*. Proteína.

YAMADA, A. K. **Tracing of microbiological contamination and protein residues in dairy industries.** 2011. 76 f. Dissertation (Animal Science Master Degree) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

Milk, for its nutritional richness, represents an important food source for humans and an excellent culture medium for the development of a great number of microorganisms. Therefore, quick detecting and solving contamination problems in milk is a challenge for the food industry. This study aimed at determining the main contamination spots in pasteurized milk industry as well as food residues in surfaces after cleaning. Milk samples and surface *swabs* were collected in 8 dairy industries of Paraná state in 9 tracings for mesophilic aerobes (MA), total coliforms (TC) and *Escherichia coli* (EC) enumeration. Samples were sowed in Plate Count Agar (PCA) for MA while 3M™ *Petrifilm*™ was used for TC and *E. coli* enumeration. Detection of protein residues was possible using the 3M™ *Clean-Trace*™ *Surface Protein Plus* test. The main contamination spots of pasteurized milk by MA, TC and *E. coli* were the balance tank before the milk packing machine, the balance tank on top of the packing machine and internal parts of the packing machine itself. Positive results for protein residues presence were found on the milk inlet pipe of the balance tank before the packing machine, the balance tank itself and the milk inlet pipe of the balance tank on top of the packing machine. The dairy industries use inadequate temperatures and concentrations of circulating substances for cleaning and sanitizing the equipment, which results in inefficient sanitation or it can compromise the equipment by causing corrosion of the surfaces and early wear of rubber gaskets. The test for detecting protein residues can represent an important tool for the evaluation of equipment cleaning efficiency, with immediate results, which allows interventions that can prevent losses and problems to the industries. In many cases, contamination detection in surfaces of the packing machine was not possible for they were in inner parts of this equipment, inaccessible to sample collecting. However, the relation of this spots with pasteurized milk contamination became clear since packed milk showed superior MA, TC and *E. coli* contamination compared to milk collected right before passing through the packing machine.

**Keywords:** Milk. *Clean-Trace*™. Mesophilic aerobes. *Escherichia coli*. Protein.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Variação da coloração na reação do Biureto (adaptado do boletim técnico - 3M™ *Clean-Trace™ Surface Protein Plus*).....23
- Figura 2** – *Clean-Trace™ Surface Protein Plus* mostrando resultado que indica resíduos de proteína na superfície amostrada .....24

### ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Figura 1** – Circuito de beneficiamento, pontos e áreas de amostragem com *swabs* microbiológicos e teste *Clean-Trace™*, aplicados em 9 rastreamentos em 8 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011 .....42
- Figura 2** – Testes para detecção de resíduos de proteína *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™* prontos para leitura, Londrina, 2011 .....42
- Figura 3** – *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™* sendo aplicado na tubulação de entrada de leite no tanque de equilíbrio antes da empacotadeira, no laticínio A, 2011 .....43
- Figura 4** – Utilização do *Quick Swab 3M™* em tanque de equilíbrio antes do pasteurizador, no laticínio B, 2011 .....43
- Figura 5** – Escala de cores obtidas no teste *in vitro* comparada com a escala do rótulo do *Clean-Trace™*, Londrina, 2011 .....49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Avaliação <i>in vitro</i> da sensibilidade de detecção de proteína do swab <i>Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™</i> .....48
<b>Tabela 2</b>	– Contagens médias de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e <i>E. coli</i> encontradas nas amostras de leite de 6 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011 .....50
<b>Tabela 3</b>	– Contagens médias de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e <i>E. coli</i> encontradas nas superfícies do equipamento de beneficiamento do leite em 6 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011 .....52
<b>Tabela 4</b>	– Resultado de testes aplicados para detecção de resíduos de leite após higienização utilizando o <i>Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™</i> , de acordo com a superfície testada, em 9 rastreamentos em 8 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011 .....54
<b>Tabela 5</b>	– Rastreamento da contaminação do leite utilizando-se contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e <i>E. coli</i> , no laticínio A, entre 2010 e 2011 .....56
<b>Tabela 6</b>	– Resultado das contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e <i>E. coli</i> e resíduos de proteína nas superfícies de equipamentos em rastreamento no laticínio A, entre 2010 e 2011 .....57
<b>Tabela 7</b>	– Rastreamento da contaminação do leite utilizando-se contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e <i>E. coli</i> , no laticínio B, entre 2010 e 2011.....58
<b>Tabela 8</b>	– Resultado das contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e <i>E. coli</i> e resíduos de proteína nas superfícies de equipamentos em rastreamento no laticínio B, entre 2010 e 2011 .....60
<b>Tabela 9</b>	– Rastreamento da contaminação do leite utilizando-se contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e <i>E. coli</i> , no laticínio C, entre 2010 e 2011 .....61

<b>Tabela 10</b> – Resultado das contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e <i>E. coli</i> e resíduos de proteína nas superfícies de equipamentos em rastreamento no laticínio C, entre 2010 e 2011 .....	62
---	----

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Principais países produtores de leite no mundo - 2008 .....13
- Quadro 2** – Principais estados produtores de leite no Brasil - 2009 .....14

### ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Quadro 1** – Pontos de amostragem de leite, total de amostras colhidas e volume amostrado em 9 rastreamentos em 8 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011 .....44
- Quadro 2** – Padrões físico-químicos e microbiológicos para leite pasteurizado.....47

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	11
1.1	PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E NO MUNDO	13
1.2	PASTEURIZAÇÃO DO LEITE	16
1.3	OBTENÇÃO E CONTAMINAÇÃO DO LEITE	16
1.4	MICRO-ORGANISMOS INDICADORES	18
1.4.1	Aeróbios Mesófilos	18
1.4.2	Psicrotróficos	19
1.4.3	Coliformes a 30°C	19
1.4.4	Coliformes a 45°C	20
1.4.4.1	<i>Escherichia coli</i>	20
1.5	MÉTODOS RÁPIDOS	21
1.5.1	O sistema <i>Petrifilm</i> <sup>TM</sup> AC e EC	21
1.5.2	<i>3M</i> <sup>TM</sup> <i>Clean-Trace</i> <sup>TM</sup> <i>Surface ATP</i>	22
1.5.3	<i>3M</i> <sup>TM</sup> <i>Clean-Trace</i> <sup>TM</sup> <i>Surface Protein Plus</i>	23
	<b>REFERÊNCIAS</b>	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	33
2.1	OBJETIVO GERAL	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b>	34
	<b>RESUMO</b>	35
	<b>ABSTRACT</b>	36
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	37
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	39
2.1	Teste de Sensibilidade do <i>Clean-Trace</i> <sup>TM</sup> <i>Surface Protein Plus</i>	39
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	48
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	64
	<b>REFERÊNCIAS</b>	65
	<b>ANEXOS</b>	72
	ANEXO A – Questionário de rastreamento em laticínios	73

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é considerado um dos alimentos mais completos e equilibrados quanto à composição de nutrientes à disposição do homem, sendo amplamente consumido tanto na sua forma líquida quanto na forma de derivados. Por ter em sua composição carboidratos, lipídeos, minerais, proteínas e vitaminas, é um alimento muito vulnerável a alterações físico-químicas e sensoriais. Além disso, a deterioração provocada por micro-organismos pode causar modificações que limitam a durabilidade do leite e seus derivados, e assim levar a problemas de saúde pública e prejuízos à indústria (FREITAS; OLIVEIRA; SUMBO, 2002).

A contaminação por micro-organismos tem sido atribuída a deficiências em toda a cadeia do leite, desde o manejo e higiene durante a ordenha a problemas sanitários como elevados índices de mastites, descuidos com a correta desinfecção e manutenção de equipamentos e a falta de treinamento das pessoas envolvidas no processo produtivo (PADILHA; FERNANDES, 1999; FRANCO et al., 2000; GUIMARÃES, 2002; CARDOSO; ARAÚJO, 2003; VALLIN et al., 2009; MATTOS et al., 2010; BELOTI et al., 2011).

A qualidade do leite é uma constante preocupação para técnicos e autoridades ligadas à área de saúde pelo risco de veiculação de micro-organismos patogênicos (LEITE JR; TORRANO; GELLI, 2000; TIMM et al., 2003). No entanto, uma elevada carga de micro-organismos traz problemas também para a indústria. Mesófilos e/ou psicrotrofos são micro-organismos que degradam os constituintes do leite e alteram as propriedades físico-químicas, importantes na manutenção da qualidade do produto. Além disso, muitas bactérias contaminantes do leite cru produzem enzimas cuja atividade afeta a qualidade do leite e dos seus derivados, causando problemas tecnológicos e prejuízos às indústrias de laticínios (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

A saúde do rebanho leiteiro, boas práticas durante a ordenha e a conservação do leite em baixas temperaturas durante seu armazenamento na propriedade e no transporte até sua chegada à indústria, são procedimentos fundamentais para evitar o desenvolvimento de micro-organismos responsáveis pela deterioração do leite. Além da matéria-prima de boa qualidade, o processamento, manipulação, transporte e armazenamento devem ser adequados. Por esse motivo,

o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002), estabeleceu critérios para a produção, identidade e qualidade do leite.

O leite produzido no Brasil apresenta baixa qualidade microbiológica, que pode ser verificada através de altas contagens de micro-organismos indicadores de higiene, como aeróbios mesófilos e coliformes (NERO et al., 2004; ARCURI et al., 2006; NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009). É necessária, para a segurança do leite, a eliminação dos micro-organismos patogênicos usualmente pela aplicação de tratamentos térmicos. O processo de pasteurização atende esse objetivo, mas deve-se ter preocupação com as etapas pós-pasteurização: embalagem, transporte e comercialização, etapas onde a recontaminação pode comprometer a segurança do produto.

Diversos trabalhos com leite pasteurizado desenvolvidos em diferentes regiões do país têm evidenciado um elevado percentual de amostras fora dos padrões estabelecidos pela legislação em vigor para análises microbiológicas e físico-químicas (FREITAS; OLIVEIRA; SUMBO, 2002; TINOCO et al., 2002; OLIVEIRA; NUNES, 2003; POLEGATO; RUDGE, 2003; TAMANINI et al., 2007).

Detectar rapidamente e solucionar o problema das contaminações pós-pasteurização é um desafio que a indústria de alimentos enfrenta diariamente. A falta de ferramentas que permitam identificar rapidamente a eficiência da limpeza acabam por promover a vulnerabilidade do leite a contaminações. Um grande problema enfrentado pela indústria é a demora para obtenção de resultados sobre a eficiência da limpeza e sobre a qualidade dos produtos através da microbiologia tradicional, que não oferece resultados em menos de 48 horas. Algumas ferramentas hoje disponíveis no mercado para avaliar deficiências no processo de limpeza buscam resíduos de matéria orgânica ao invés de micro-organismos, e têm a vantagem de oferecer resultados imediatos, permitindo medidas corretivas ou mesmo a determinação de nova limpeza antes do processamento do alimento, evitando sua contaminação. A bioluminescência, por exemplo, busca resíduos de Adenosina Tri-fosfato (ATP) como indicador da presença de matéria orgânica. No entanto, o custo elevado do teste e a necessidade de equipamento para leitura limitaram a disseminação irrestrita do método (COSTA, 2001).

Com o mesmo intuito de obter informações sobre a limpeza de superfícies onde são beneficiados alimentos, foi lançado em março de 2010 pela

3M™ do Brasil o *Clean-Trace™ Surface Protein Plus*, que recolhe resíduos de proteína e outras substâncias redutoras, resultantes do processamento de alimentos, que não foram retirados pela limpeza (3M, 2009). Os resíduos de alimentos são a fonte de nutrientes para a proliferação microbiana. A ausência de resíduos restringe o crescimento e multiplicação de micro-organismos. No entanto, por se tratarem de ferramentas recentemente desenvolvidas e disponibilizadas comercialmente, praticamente não há estudos de campo sobre sua eficiência.

### 1.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E NO MUNDO

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de leite em 2008 chegou a mais de 578 milhões de toneladas. O Brasil aparece como sexto maior produtor, com mais de 27 milhões de toneladas. De acordo com o quadro 1, os Estados Unidos aparecem como maiores produtores com 14,9% da produção mundial, seguidos pela Índia (7,6%) e China com 6,2% (FAO, 2010).

Posição	País	Produção anual milhões de toneladas (%)
1º	Estados Unidos	86,16 (14,9)
2º	Índia	44,1 (7,6)
3º	China	35,85 (6,2)
4º	Rússia	32,09 (5,5)
5º	Alemanha	28,65 (4,9)
6º	Brasil	27,57 (4,7)
7º	França	24,51 (4,2)
8º	Nova Zelândia	15,21 (2,6)
9º	Reino Unido	13,71 (2,3)
10º	Polônia	12,42 (2,1)

**Quadro 1** – Principais países produtores de leite no mundo - 2008  
**Fonte:** FAO (2010)

No primeiro semestre de 2010 a exportação de leite *in natura* no Brasil foi significativamente maior em relação ao primeiro semestre de 2009 e a quantidade de leite destinado à industrialização foi de 5,1 bilhões de litros (IBGE, 2010).

No Brasil, o agronegócio do leite contribui para a diminuição da evasão rural e também desempenha um importante papel no suprimento de alimentos e geração de empregos e renda, tanto no meio urbano quanto rural (DIAS; OLIVEIRA, 2004).

A produção de leite está presente em todos os estados do Brasil, sendo que a maior produção é originada da região Sudeste. A produção de leite alcançou 29,1 bilhões de litros no Brasil em 2009, uma alta de 5,6% em relação ao ano anterior, segundo pesquisa divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). O principal produtor nacional é o estado de Minas Gerais com 27,2% do total produzido, seguido pelo Rio Grande do Sul (11,6%). De acordo com o quadro 2, a produção do Paraná colocou o estado na terceira posição, com 11,4% do total produzido, seguido por Goiás, cuja produção corresponde a 10,3% (IBGE, 2010).

Posição	Estado	Produção anual milhões de litros (%)
1º	Minas Gerais	7.931,11 (27,2)
2º	Rio Grande do Sul	3.400,17 (11,6)
3º	Paraná	3.339,30 (11,4)
4º	Goiás	3.003,18 (10,3)
5º	Santa Catarina	2.237,80 (7,6)
6º	São Paulo	1.583,88 (5,4)
7º	Bahia	1.182,01 (4,0)
8º	Pernambuco	788,25 (2,7)
9º	Rondônia	746,87 (2,5)
10º	Mato Grosso	680,58 (2,3)

**Quadro 2** – Principais estados produtores de leite no Brasil - 2009  
**Fonte:** IBGE (2010)

No estado do Paraná, três bacias leiteiras se destacam na produção de leite, a Centro-Oriental, a Oeste e Sudoeste, que concentram 48,5% dos produtores de leite do estado e 53% da produção estadual de leite. O setor foi incentivado pela criação do programa governamental Leite das Crianças, que estimulou os pequenos produtores adquirindo a produção, melhorando a renda e criando empregos. Os laticínios paranaenses processam, em média, 1,7 bilhão de litros de leite ao ano, segundo uma pesquisa recente do Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES) juntamente com o Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) (IPARDES, 2010).

O leite tem grande importância na alimentação sob o aspecto nutritivo, mas também é um excelente meio de cultura para micro-organismos devido a suas características intrínsecas, como alta atividade de água, pH próximo ao neutro, além da riqueza em nutrientes (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes, apresentando um número elevado de micro-organismos o que representa um risco à saúde dos consumidores, principalmente quando consumido sem nenhum tipo de tratamento térmico (NERO; MAZIERO; BEZERRA, 2003; NERO et al., 2004).

A comercialização informal de leite *in natura*, ou seja, que não foi submetido a nenhum tipo de beneficiamento, nem controle de qualidade, é comum em algumas regiões do país, devido ao baixo custo e também pela falta de informação sobre os riscos desta prática (NERO; MAZIERO; BEZERRA, 2003; TAMANINI, 2008).

Em 2002, entrou em vigor no Brasil a Instrução Normativa 51 determinando a adoção de várias medidas que possibilitam a obtenção de um leite seguro e de boa qualidade. O objetivo principal de tais regulamentações é garantir a qualidade do leite, determinando padrões para características químicas, organolépticas e microbiológicas do leite cru a ser utilizado como matéria-prima e também do leite pasteurizado (BRASIL, 2002).

## 1.2 PASTEURIZAÇÃO DO LEITE

O processo de pasteurização do leite promove a eliminação de micro-organismos patogênicos e de uma grande parcela de micro-organismos saprófitas e deteriorantes. Um dos fatores que interferem na sua eficiência é exatamente a qualidade do leite cru, que está relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binômio tempo/temperatura em que o leite permanece desde a ordenha até o processamento (MUTUKURIMA et al., 1996).

De acordo com Souza e Cerqueira (1996), o processo de pasteurização é eficiente quando elimina toda a flora patogênica e reduz o número de micro-organismos não patogênicos, sem alterar a composição, o equilíbrio físico-químico, sabor e aroma do leite. A pasteurização pode ter uma eficiência de 97% a 99,99% na redução de micro-organismos do leite, dependendo do binômio tempo/temperatura utilizado, da quantidade e do tipo de micro-organismos presentes na matéria-prima (SOUZA; CERQUEIRA, 1996; LOPES; STAMFORD, 1998). O produto deve ser submetido a uma temperatura entre 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos, sendo então imediatamente resfriado à temperatura de 4°C e em seguida envasado em circuito fechado (BRASIL, 2002).

## 1.3 OBTENÇÃO E CONTAMINAÇÃO DO LEITE

Enquanto permanece armazenado nos alvéolos da glândula mamária sadia, o leite é isento de micro-organismos (MACHADO; CASSOLI, 2002). A contaminação do leite ocorre principalmente durante a ordenha e armazenamento, etapas em que recebe uma alta carga microbiana e tem sua qualidade comprometida (BELOTI et al., 2002; FAGAN et al., 2005).

O processo de contaminação do leite inicia-se na propriedade rural, durante e após a ordenha, por uma deficiência de higienização dos utensílios utilizados, por descuidos e procedimentos inadequados na higienização dos animais, pela má qualidade da água utilizada no processo, por ocasião da presença de doenças que afetam o rebanho ou ainda pelo próprio homem. Segundo Fagan et al.

(2005) e Mattos et al. (2010) os principais pontos de contaminação na ordenha são os tetos dos animais, os três primeiros jatos, a água residual e a superfície de utensílios de ordenha como baldes e latões. Além disso, os fatores relacionados a ineficiências de transporte e refrigeração, as longas distâncias a serem percorridas, problemas durante seu processamento e estocagem, também são fatores importantes, que interferem na qualidade do leite. Desse modo, para que seja mantida a qualidade do leite que será consumido pela população é preciso produzir, pasteurizar e comercializar da forma mais higiênica possível, seguindo as orientações e exigências da legislação.

A ordenha, preferencialmente mecânica, deve ocorrer dentro dos mais criteriosos padrões sanitários. Mesmo em condições ótimas, o leite ordenhado apresenta uma carga microbiana que deve ser mantida constante, evitando a multiplicação da mesma no leite (AJZENTAL, 1994).

A prevenção da contaminação deve ser objetivo de toda a cadeia produtiva do leite. No entanto, após a pasteurização, a contaminação está relacionada também à segurança do leite. A qualidade microbiológica do leite pasteurizado é aferida através da quantificação de microrganismos indicadores: os aeróbios mesófilos, coliformes a 30°C e 45°C, que têm seus parâmetros determinados pela IN 51 (BRASIL, 2002). No entanto, os métodos de contagem pela microbiologia tradicional e mesmo pela chamada microbiologia rápida exigem no mínimo 48 horas para apresentar resultados, o que é incompatível com a necessidade da indústria, que precisa de resultados imediatos. Ainda, os parâmetros utilizados não indicam precisamente a fonte de contaminação na indústria. Para essa determinação são necessários rastreamentos microbiológicos através de “swabs” e plaqueamentos que, embora eficientes, são igualmente lentos no fornecimento de resultados.

Os procedimentos higiênicos adotados durante a obtenção e transporte do leite até o estabelecimento de beneficiamento determinará o tipo e a quantidade dos contaminantes do leite (PONSANO; PINTO; JORGE, 1999).

## 1.4 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES

Os micro-organismos indicadores fornecem informações sobre as condições sanitárias da produção, processamento e estocagem. Também indicam a possível presença de patógenos e potencial de deterioração do alimento. Entre os principais grupos de micro-organismo indicadores de qualidade higiênico-sanitária no leite estão os aeróbios mesófilos, coliformes e psicrotróficos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### 1.4.1 Aeróbios Mesófilos

Os aeróbios mesófilos representam um grupo de micro-organismos comumente utilizados para indicar a contaminação total dos alimentos, já que a maioria dos contaminantes do leite, tanto deteriorantes quanto patógenos, pertence a esse grupo. Possuem capacidade de se desenvolverem em temperaturas entre 20°C e 45°C, e temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 40°C (JAY, 2005). No leite cru os aeróbios mesófilos provocam como principal alteração a acidez, decorrente da decomposição da lactose em ácido láctico.

As altas contagens de aeróbios mesófilos em leite pasteurizado podem ser um indicativo de uma matéria-prima excessivamente contaminada, processamento ineficiente, manipulação inadequada e higienização ineficiente dos equipamentos utilizados no processo (TAMANINI et al., 2007).

A quantificação da contaminação do leite é realizada através da contagem padrão em placas (CPP), e o resultado indica a contaminação total que o alimento sofreu, além de permitir uma previsão do tempo de conservação comercial (SILVA; JUNQUEIRA, 1997), que se reflete na validade do produto. O meio de cultura utilizado para contagem é o Agar Padrão para Contagem (PCA), e a metodologia fornece resultados em 48 horas (BRASIL, 2003).

#### 1.4.2 Psicrotróficos

Psicrotróficos são micro-organismos capazes de crescer a  $7^{\circ}\text{C}\pm 1$ , em 7 a 10 dias (COUSIN; JAY; VASAVADA, 1992). Por esse motivo, um grande número de espécies bacterianas, antes consideradas estritamente mesofílicas, estão hoje incluídas no grupo dos psicrotróficos (SILVEIRA, 1998).

A obrigatoriedade do resfriamento e manutenção do leite, logo após a ordenha, a temperaturas entre  $4^{\circ}\text{C}$  e  $7^{\circ}\text{C}$  tem como objetivo controlar o crescimento de micro-organismos mesófilos. Mas essa medida provocou uma mudança na microbiota do leite. O leite refrigerado apresenta uma predominância de micro-organismos psicrotróficos, originando outros tipos de alterações no leite, como a proteólise e a lipólise, que causam grandes prejuízos para a indústria (CASTRO; PORTUGAL, 2000).

Apesar dos psicrotróficos serem facilmente destruídos pela pasteurização, suas enzimas proteolíticas e lipolíticas são termorresistentes e promovem alterações organolépticas no leite e deterioração do produto mesmo após o tratamento térmico (SANTANA et al., 2001; SANTOS; PERESI; LOPES, 1999). Essas enzimas podem causar gelatinização e sedimentação no leite UAT (Ultra Alta Temperatura), desenvolvimento de sabor e aroma indesejáveis em leite pasteurizado e diminuição no rendimento de queijos (SHAH, 1994).

No leite, os micro-organismos psicrotróficos encontrados com maior frequência são os bacilos gram negativos, seguidos pelos bacilos e cocos gram positivos (SANTANA et al., 2001).

#### 1.4.3 Coliformes a $30^{\circ}\text{C}$

Coliformes são reconhecidos como indicadores da qualidade higiênico-sanitária de alimentos. São facilmente destruídos pelo calor e não devem ser encontrados em alimentos que passaram por um tratamento térmico adequado (FORSYTHE, 2005).

A detecção de coliformes em leite pasteurizado tem por finalidade avaliar as condições sanitárias do beneficiamento e também a eficiência da pasteurização, visto que coliformes totais e termotolerantes são destruídos na pasteurização (OLIVEIRA; CARUSO, 1996). Sua presença em leite pasteurizado indica pasteurização ineficiente ou recontaminação pós-pasteurização (PELCZAR, 1996; TIMM et al., 2003).

Este grupo, também chamado de coliformes totais, é formado por bactérias da família *Enterobacteriaceae* e apresentam capacidade de fermentar a lactose, produzindo ácido e gás, quando incubadas a 35-37°C por um período de 48 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SIQUEIRA, 1995). São bactérias ambientais e sua presença está frequentemente relacionada às práticas ineficientes de higiene durante a produção de alimentos e a má qualidade da água (MORENO et al., 1999).

#### 1.4.4 Coliformes a 45°C

Os coliformes a 45°C, conhecidos também como coliformes termotolerantes, são os coliformes totais que continuam fermentando a lactose com produção de gás, quando incubados a 44 - 45,5°C por 48 horas (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 1992). Compreende principalmente os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella*. Indicam contaminação de origem fecal, e a possível presença de outros enteropatógenos no alimento (JAY, 2005).

##### 1.4.4.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* está incluída no grupo dos coliformes termotolerantes e deste grupo, é a única bactéria que representa contaminação fecal. Isso porque seu habitat primário é o trato intestinal de animais de sangue quente e corresponde a 95% dos coliformes encontrados em fezes humana e de animais (HAJDENWURCEL, 1998). É frequentemente isolada em alimentos e em produtos de origem láctea, inclusive sob refrigeração (CATÃO; CEBALLOS, 2001; FDA,

1998). Os outros coliformes termotolerantes se desenvolvem também no ambiente, prejudicando a relação com contaminação fecal.

A *E. coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram-negativo não esporulado, anaeróbio facultativo e capaz de fermentar glicose com produção de ácido e gás. É a espécie predominante na microbiota intestinal de animais de sangue quente. A *E. coli* é considerada o melhor indicador de contaminação fecal e da possível presença de enteropatógenos (CATÃO; CEBALLOS, 2001).

## 1.5 MÉTODOS RÁPIDOS

Segundo Forsythe (2005), os métodos rápidos em microbiologia têm sido desenvolvidos para encurtar o tempo entre a coleta da amostra e a obtenção do resultado, já que os procedimentos convencionais são trabalhosos, consomem muito tempo e impedem a rápida correção de falhas de higienização.

Além de facilitar o trabalho do microbiologista, os sistemas comerciais permitem maior confiabilidade e reprodutibilidade. Outras vantagens importantes são a facilidade de estocagem, uso e descarte (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### 1.5.1 O sistema *Petrifilm*<sup>TM</sup> AC e EC

O *Petrifilm*<sup>TM</sup> AC consiste de cartões de papel quadriculado revestido de polietileno recoberto com nutrientes desidratados e um gel hidrossolúvel a frio, protegido por um filme plástico superior transparente revestido internamente pelo mesmo gel, além do indicador cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), que quando reduzido pelas colônias em crescimento, confere a elas uma coloração vermelha. Sua leitura é realizada após 48 horas de incubação a 35°C.

O sistema *Petrifilm*<sup>TM</sup> EC fabricado pela 3M<sup>TM</sup> permite a contagem de *E. coli* e coliformes totais simultaneamente. Utiliza uma mistura desidratada de nutrientes VRB (Vermelho Violeta Bile), um agente geleificante solúvel a frio, um indicador de atividade glicuronidásica e um indicador para facilitar a enumeração da colônia.

O filme superior retém o gás formado pelos coliformes e *E. coli* que são fermentadores de lactose. O gás retido ao redor de colônias vermelhas confirma a presença de coliformes, enquanto que as colônias de *E. coli* são confirmadas pela presença de coloração azul, associada à formação de gás. A placa de *Petrifilm*<sup>TM</sup> EC oferece resultados em 48 horas.

#### 1.5.2 3M<sup>TM</sup> *Clean-Trace*<sup>TM</sup> Surface ATP

Esse sistema de monitoramento de higiene tem como base a mensuração da quantidade de adenosina trifosfato (ATP), indicativo da presença de materiais orgânicos, como resíduos de alimentos, secreções corporais e resíduos microbiológicos. Os resíduos orgânicos indicam que a superfície não foi suficientemente limpa, e os resíduos são a fonte de nutrientes para o crescimento de micro-organismos.

O teste se baseia na reação de bioluminescência, onde a enzima luciferase utiliza a energia química contida na molécula de ATP para promover a descarboxilação oxidativa da luciferina, resultando na emissão de luz. A quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de ATP presente e, portanto, ao grau de carga biológica. A medição é efetuada no 3M<sup>TM</sup> *Clean-Trace* Luminômetro, e os resultados aparecem na tela digital do aparelho, em Unidades Relativas de Luz (RLU).





**Figura 2** – *Clean-Trace™ Surface Protein Plus* mostrando resultado que indica resíduos de proteína na superfície amostrada.

Diante da problemática que é a detecção da contaminação do leite na indústria, tanto pela lentidão dos métodos disponíveis como pelo custo das análises, estudos que determinem os principais pontos de contaminação e localização de resíduos auxiliam no direcionamento de ações corretivas e na implementação de procedimentos preventivos na indústria. O conhecimento dos principais focos de contaminação também permite diminuir os pontos amostrados na rotina, priorizando pontos de perigo.

## REFERÊNCIAS

- 3M. Petrifilm: Placas para contagem de *Escherichia coli*. **Instrução de uso**. 3M do Brasil Ltda. Microbiologia. St Paul, MN 55144-1000
- 3M – 3M MICROBIOLOGY US. **Microbiology**: interpretation guide of plate. St. Paul, MN, USA: 2005. (Catalogue)
- 3M. *Clean-Trace™ Surface Protein Plus*. **Boletim Técnico**. 3M do Brasil Ltda. 2009.
- AJZENTAL, A. Caminhos do leite: da ordenha ao consumidor. **Leite e Derivados**, v.3,n.18, p. 29-40, 1994.
- AJZENTAL, A.; RICCETTI, R. V.; KRUTMAN, F. K. Influência da taxa de contaminação inicial do leite sobre o resultado da pasteurização. **Leite e Derivados**, v.5,n.29, p.41-54, 1996.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n.3, p. 440-446, jun., 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Preparo da amostra para exame microbiológico. Rio de Janeiro: **ABNT**, 03 p., (NBR 10203), mar., 1988.
- BEHMER, M. L. A . **Tecnologia do leite**. 15.ed, São Paulo: Nobel, 1984.
- BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; SOUZA, J. A.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; BALARIN, O.; CURIKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. **Semina, Ciências Agrárias**, Londrina, v.20, n.1, p.12-15, jan./jun.1999.
- BELOTI, V.; SANTANA, E. H. W.; FAGAN, E. P.; BARROS, M. A. F.; PEREIRA, M. S.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; MATTOS, M. R.; NERO, L. A.; VACCARELLI, E. R.; SILVA, L. H. C.; MAGANANI, D. F.; HAGA, M. M. Principais pontos de contaminação na produção leiteira e implementação de boas práticas. In: II Congresso Panamericano de qualidade do leite e controle de mastite, 2002, Ribeirão Preto SP. **CD-Rom...** 2002.
- BELOTI, V.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C; MAGNANI, D. F.; MONTEIRO, A. A. ; BARROS, M. A. F.; MATTOS, M. R.; MORAES, L. B.; FAGAN, E. P. ; SILVA, W. P. ; PIRES, E. M. F. Obtenção de leite com qualidade através da implantação de Boas práticas na ordenha, em quaisquer condições de Produção. In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, II Congresso Estadual da ANCLIVEPA, IV Encontro de Medicina de Pequenos Ruminantes do CONESUL, 2006, Gramado, RS. **CD-Rom ...** 2006. v. 1.

BELOTI, V.; RIBEIRO JUNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; YAMADA, A. K.; SILVA, L. C. C. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 16, 2011.

BONASSI, A. T. Métodos atuais e modernos para análise do leite e derivados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.39 n.235,p.17-22, 1984.

BRAMLEY, A.J.; McKINNON, C.H. The microbiology of raw milk. In: ROTHWELL, R. K. (Ed.). **Dairy microbiology**. London: Elsevier, 1990. v.1, cap.5, p.163-207.

BRASIL – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002. Dispõe sobre os regulamentos técnicos aplicados ao leite cru e pasteurizado. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

BRASIL – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2006.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em leite comercializados no Distrito Federal, no período 1997-2001. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 114-115, p. 34-40, 2003.

CASTRO, M. C. D.; PORTUGAL, J. A .B. **Perspectivas e Avanços em Laticínios**. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2000. 278 p.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínio, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, set./dez., 2001.

CHUNG, C. I.; BAE, I. H.; LEE, J. Y. Bacteriological quality of raw milks collected and stored under different conditions. **Korean Journal of Dairy Science**, v.6, n.1, p.53, 1984.

CITADIN, S.A.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J.; Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.10, n. 1, p. 52-59, jan./mar. 2009.

COSTA, P. D.; **Avaliação da técnica de ATP- bioluminescência no controle do procedimento de higienização na indústria de laticínios**. Viçosa, 2001. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C.. Psychrotrophic microorganisms. In: CARL VANDERZANT; DON F. SPLITTSTOESSER. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: Edwards Brothers, 1992. 1219 p. Cap 9, p.153-167.

DIAS, T. C.; OLIVEIRA, T. B. A. Avaliação técnica e econômica em propriedades produtoras de leite assistidas por um programa de desenvolvimento. In: SIMPÓSIO de excelência em gestão e tecnologia, SEGET. Resende, 2004. v. 1.

FAGAN, E. P.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MÜLLER, E. E.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; MAGNANI, D. F.; VACARELLI, E. R.; SILVA, L. C.; PEREIRA, M. S. Avaliação e implantação de boas práticas nos principais pontos de contaminação microbiológica na produção leiteira. **Semina, Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n.1, p.83-92, jan./mar. 2005.

FAO. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em: 01 nov. 2010.

FONSECA, L. F. L. Leite a granel: Modelo moderno de estocagem e transporte. **Leite e Derivados**, v.7,n.40, p.16-21, 1998.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Arlington: AOAC, 1998, p.29-34.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

FRANCO, B. D. G. M. Inovação nos métodos de análise microbiológica de leite e derivados. **Indústria de Laticínios**, v.3, n.18. p.70-71, 1998.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 68, p. 70-77, 2000.

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P. de; SUMBO, F. D. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 10, p. 89-96, 2002.

GONÇALVES R. M. S.; FRANCO R. M. Determinação da carga microbiana em leite pasteurizado tipos "B" e "C", comercializados na cidade do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 53 p. 61-65, 1998.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 102-103, p. 25-34, 2002.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998. 66p.

- HAJDENWURCEL, J. R.; BRANDÃO, S. C. C.; LERAYER, A. L. S. **Nova legislação comentada de produtos lácteos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2002. 327p.
- HAYES, P.R. **Food microbiology and hygiene**. 2.ed. New York: Chapman and Hall, 1995. 516p.
- HOFFMAN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VENTURIM, T. M. Microbiologia do leite pasteurizado tipo "C" comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. **Revista Higiene Alimentar**, v.13, n.65, p.51-54, out. 1999.
- HOLT, J. J. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willian & Wilkins, 1994.
- HUHN, S.; HAJDENWURCEL, J. R.; MORAES, J .M.; VARGAS, O. L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha mecânica e ao chegar à plataforma. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândida Tostes"**, Juiz de Fora, v. 35, n. 209, p. 3-8, 1980.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Estatística da produção pecuária**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=74&z=t&o=23>>. Acesso em: 05 jan. 2011.
- IPARDES. **Caracterização da indústria de processamento e transformação do leite no Paraná** - Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social e Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. Curitiba, 2010.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- LEITE JR, A. F. S.; TORRANO, A. D. M. Variação sazonal das contagens microbiológicas do leite tipo "C" pasteurizado e comercializado em João Pessoa-PB. **Revista Higiene Alimentar**,v.11, n.48. p.41-44, mar./abr.1997.
- LEITE JR, A. F. S.; TORRANO, A. D. M.; GELLI, D. S. Qualidade microbiológica do leite tipo C pasteurizado, comercializado em João Pessoa, Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 45-49, 2000.
- LOPES, A. C. S.; STAMFORD, T. L. M. Efficiency of pasteurization on the microbiological quality of type C milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 1, p. 99-101, 1998.
- MACHADO, P. F.; CASSOLI, L. D. Novas tecnologias na avaliação da qualidade do leite. In: TEIXEIRA, J. C.; INÁCIO NETO, A.; DAVID, F. M.; ANDRADE, G. A.; TEIXEIRA, L. F. A. C. **Avanços em Produção e Manejo de Bovinos Leiteiros**. Lavras, v.1, n. 1, p. 161- 179, 2002.
- MATNER, R.R.; FOX, T.L.; McIVER, D.E.; CURIALE, M.S. Efficacy of the Petrifilm™ *E. coli* count plates for *E. coli* and coliform enumeration. **Journal of Food Protection**, v.53, n.2, p.145-150, 1990.

MATTOS, M. R. d ; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. de A. F.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, B. Qualidade do leite cru produzido na região Agreste de Pernambuco. **Semina, Ciências Agrárias**, v. 81, p. 173-182, 2010.

McALLISTER, J.S; RAMOS, M.S.; FOX, T.L. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (Petrifilm™ SM) method for enumerating bacteria in processed fluid milk samples. **Journal of Food Protection**, v.7, n.12, p.632-635, 1987.

MIWA, A.C.P.; **Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para determinação de proteínas em lagoas de estabilização**. São Carlos, 2003. 133f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G.; VAN DENDER, A G. F.; MACHADO, R. C. Qualidade microbiológica de leites pasteurizados produzidos no estado de São Paulo. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.13, n. 20, p. 56-61, 1999.

MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

MUTUKURIMA, A.N.; FERESU, S.B.; NARVHJ, J.A.; ABRAHAMSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk, produce by small holder farmer. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 8, p. 984-987, 1996.

NADER-FILHO, A.; AMARAL, L. A.; ROSSI JR., O. D. Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo "Integral", processado por algumas mini e macro-usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n.50. p.21-23, jul.ago.1997.

NASCIMENTO, G. G. F.; FIGUEIREDO, S. H. M.; IBISSES, O. B.; ANTONELLI, E. M. Condições microbiológicas do leite pasteurizado comercializado em Piracicaba, SP. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25,n.1,p.13-21, jan./jun. 1991.

NERO, L.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão – PR. **Semina, Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, p.21-26, jan./jun. 2003.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.3, p.211-215, set. 2004.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A.; ANDRADES, N. J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B. D. G. M.; Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.191-195, jan./mar. 2005.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e pesquisa de microrganismos patogênicos no leite produzido na região agreste de Pernambuco. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.. **CD-Rom ...** São Paulo : TecArt, p.1485-1485. 2006.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.2, p.386-390, jun. 2009.

OLIVEIRA, A. J.; CARUSO, J. G. B. **Leite**: obtenção e qualidade do produto fluido e derivados. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. cap.3, p.27-43.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 62, p. 10-21, 1999.

OLIVEIRA, M. M. A.; NUNES, I. F. Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo "C" comercializado em Teresina, PI. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 111, p. 92-94, 2003.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite tipo C comercializado no Recife-PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 105-109, 1999.

PELCZAR, M. J. **Microbiologia**. v. 1, São Paulo, 1996.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófilas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, jul./set. 2006.

POLEGATO, E. P. S. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília-SP/Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v.13, n.61, p.64-65, abr./maio 1999.

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

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; JORGE, A. F. L. Variação sazonal e correlação entre propriedades de leite utilizados na avaliação da qualidade. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 35-38, 1999.

ROGICK, F. A. Produção higiênica do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.37, n.221, p.35-38, 1987.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B. de, GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos. **Semina, Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, p.145-154, jul./dez. 2001.

SANTOS, C.C. M.; PERESI, J. T. M.; LOPES, M. R. V. Avaliação microbiológica e físico-química do leite pasteurizado comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.1, n.58, p.85-89, 1999.

SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Influência da temperatura durante o transporte, na qualidade microbiológica do leite cru. Parte I - Mesófilos Aeróbios. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.109, p.69-74, jun. 2003.

SANTOS M. V.; FONSECA, L. F. L. da. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, n.48, p.432-437, 1994.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, 1997. 228 p.

SILVEIRA, I. A. Influência de microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, v.12, n.55, p.21-26, maio 1998.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, 1995. 159p.

SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. Pasteurização lenta e rápida: Uma avaliação de eficiência. **Leite e Derivados**, v.5, n.29, p.55-64, 1996.

TAMANINI, R. **Bactérias ácido lácticas com atividade antagonista a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em leite cru produzido no estado de Pernambuco**. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo C produzido na região norte do Paraná. **Semina, Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, p.449-453, 2007.

TIMM, C. D.; GONZALEZ, H. L.; OLIVEIRA, D. S.; BÜCHLE, J.; ALEXIS, M. A.; COELHO, F. J. O.; PORTO, C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral produzido em microusinas da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 100-104, 2003.

TINOCO, A. L. A.; COELHO, M. S. L.; PINTO, P. S. A.; NOVATO, M. R. R.; BEZ, F. Estudo microbiológico comparativo de leites pasteurizados em estabelecimentos com inspeção federal e em fazendas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 88-93, 2002.

VALLIN V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R; ANGELA, H. L. ; SILVA, L. C. C. da. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina, Ciências Agrárias**, v. 30, p. 181-188, 2009.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os principais pontos de contaminação microbiológica e de resíduos de alimento em equipamentos de pasteurização de leite em indústrias de laticínios.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência da limpeza e sanitização das superfícies de equipamentos envolvidos no processo de pasteurização do leite utilizando micro-organismos indicadores: aeróbios mesófilos, coliformes e *E. coli*.
- Avaliar a progressão da contaminação do leite no circuito de pasteurização e embalagem.
- Avaliar a limpeza e sanitização das superfícies de equipamentos envolvidos no processo de pasteurização do leite através da pesquisa de resíduos de proteína utilizando o *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™*.
- Verificar se há coincidência entre pontos de maior contaminação e pontos com resíduos.

**ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

**RASTREAMENTO DE CONTAMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E RESÍDUOS DE  
PROTEÍNA EM INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS**

## RASTREAMENTO DE CONTAMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS E RESÍDUOS DE PROTEÍNA EM INDÚSTRIAS DE LATICÍNIOS

### RESUMO

O leite, por sua riqueza em nutrientes, representa uma importante fonte alimentar para o homem e um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de um grande número de micro-organismos. Portanto, detectar rapidamente e solucionar o problema das contaminações no leite é um desafio para a indústria de alimentos. Este trabalho teve como objetivo determinar os principais pontos de contaminação dentro da indústria de leite pasteurizado bem como os pontos que apresentam resíduos de alimento após a limpeza. Foram colhidas amostras de leite e *swabs* de superfície dos equipamentos envolvidos no processo de pasteurização de 8 laticínios em 9 rastreamentos no estado do Paraná para determinar a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC). Para contagem de AM realizou-se a semeadura em Ágar Padrão de Contagem (PCA). Para enumeração de CT e *E. coli* foi utilizado o sistema 3M™ *Petrifilm™* e para detectar resíduos de proteínas no equipamento utilizou-se o teste *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™*. Os principais pontos de contaminação do leite pasteurizado por AM, CT e EC foram o tanque de equilíbrio antes da empacotadeira, o tanque pulmão da empacotadeira e as partes internas da empacotadeira. Os pontos que apresentaram resultado positivo para presença de resíduos de proteína foram a tubulação de entrada do tanque de equilíbrio antes da empacotadeira, o tanque de equilíbrio antes da empacotadeira e a tubulação de entrada de leite no tanque pulmão da empacotadeira. Os laticínios utilizam concentrações e temperaturas inadequadas para circulação das substâncias utilizadas na limpeza e sanitização dos equipamentos, o que resulta em higienização ineficiente ou ainda comprometimento do equipamento ao provocar corrosão das superfícies e desgaste precoce das borrachas de vedação. O teste para detecção de resíduos de proteínas pode representar uma importante ferramenta para avaliar a eficiência da limpeza de equipamentos, uma vez que oferece resultados imediatos, permitindo correções que podem evitar perdas e problemas aos laticínios. Em muitos casos não se conseguiu detectar contaminações em superfícies da empacotadeira, por terem origem em pontos internos, inacessíveis à coleta de amostras. No entanto, ficou evidente a relação desses pontos com a contaminação do leite pasteurizado embalado, já que este apresentou contagens de AM, CT e EC superiores às do leite antes de passar pela empacotadeira.

**Palavras-chave:** Leite. *Clean-Trace™*. Aeróbios mesófilos. *Escherichia coli*. Proteína.

## TRACING OF MICROBIOLOGICAL CONTAMINATION AND PROTEIN RESIDUES IN DAIRY INDUSTRIES

### ABSTRACT

Milk, for its nutritional richness, represents an important food source for humans and an excellent culture medium for the development of a great number of microorganisms. Therefore, quick detecting and solving contamination problems in milk is a challenge for the food industry. This study aimed at determining the main contamination spots in pasteurized milk industry as well as food residues in surfaces after cleaning. Milk samples and surface *swabs* were collected in 8 dairy industries of Paraná state in 9 tracings for mesophilic aerobes (MA), total coliforms (TC) and *Escherichia coli* (EC) enumeration. Samples were sowed in Plate Count Agar (PCA) for MA while 3M™ *Petrifilm*™ was used for TC and *E. coli* enumeration. Detection of protein residues was possible using the 3M™ *Clean-Trace*™ *Surface Protein Plus* test. The main contamination spots of pasteurized milk by MA, TC and *E. coli* were the balance tank before the milk packing machine, the balance tank on top of the packing machine and internal parts of the packing machine itself. Positive results for protein residues presence were found on the milk inlet pipe of the balance tank before the packing machine, the balance tank itself and the milk inlet pipe of the balance tank on top of the packing machine. The dairy industries use inadequate temperatures and concentrations of circulating substances for cleaning and sanitizing the equipment, which results in inefficient sanitation or it can compromise the equipment by causing corrosion of the surfaces and early wear of rubber gaskets. The test for detecting protein residues can represent an important tool for the evaluation of equipment cleaning efficiency, with immediate results, which allows interventions that can prevent losses and problems to the industries. In many cases, contamination detection in surfaces of the packing machine was not possible for they were in inner parts of this equipment, inaccessible to sample collecting. However, the relation of this spots with pasteurized milk contamination became clear since packed milk showed superior MA, TC and *E. coli* contamination compared to milk collected right before passing through the packing machine.

**Keywords:** Milk. *Clean-Trace*™. Mesophilic aerobes. *Escherichia coli*. Protein.

## 1 INTRODUÇÃO

Por sua composição, o leite é considerado um dos alimentos mais completos em termos nutricionais e é muito importante para a dieta humana e animal (TIMM et al., 2003).

O Brasil foi o 6º maior produtor mundial de leite em 2010. No entanto, de maneira geral, o leite produzido apresenta baixa qualidade microbiológica, que pode ser verificada através de altas contagens de micro-organismos indicadores de higiene, como aeróbios mesófilos e coliformes (NERO et al., 2004; ARCURI et al., 2006; NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009). Essa contaminação tem sido atribuída a deficiências no manejo e higiene durante a ordenha, elevados índices de mastite, descuidos com a correta desinfecção e manutenção de equipamentos e à falta de treinamento das pessoas envolvidas no processo produtivo (PADILHA; FERNANDES, 1999; FRANCO et al., 2000; GUIMARÃES, 2002; CARDOSO; ARAÚJO, 2003; VALLIN et al., 2009; MATTOS et al., 2010; BELOTI et al., 2011).

Por ser uma excelente fonte de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais e água, o leite torna-se um excelente substrato para o desenvolvimento de bactérias contaminantes (SOUZA; CERQUEIRA, 1996), e é uma constante preocupação para técnicos e autoridades ligadas à área de saúde pelo risco de veiculação de micro-organismos patogênicos (LEITE JR; TORRANO; GELLI, 2000; TIMM et al., 2003). Além disso, a contaminação também pode causar problemas tecnológicos e econômicos nas indústrias de laticínios (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

A pasteurização deve eliminar contaminantes patogênicos e reduzir a contagem bacteriana total, mas diversos trabalhos com leite pasteurizado desenvolvidos em diferentes regiões do país têm evidenciado um elevado percentual de amostras fora dos padrões estabelecidos pela legislação em vigor para análises microbiológicas e físico-químicas (FREITAS; OLIVEIRA; SUMBO, 2002; TINOCO et al., 2002; OLIVEIRA; NUNES, 2003; POLEGATO; RUDGE, 2003; TAMANINI et al., 2007). As contaminações têm maior gravidade quando ocorrem depois da pasteurização. Detectar rapidamente e solucionar o problema das contaminações pós-pasteurização é um desafio que a indústria de alimentos enfrenta diariamente.

Um grande problema enfrentado pela indústria é a demora para obtenção de resultados sobre a eficiência da limpeza e qualidade microbiológica dos produtos, através da microbiologia tradicional, que não oferece resultados em menos de 48 horas. Algumas ferramentas hoje disponíveis no mercado para avaliar deficiências no processo de limpeza buscam resíduos de matéria orgânica ao invés de micro-organismos, e têm a vantagem de oferecer resultados imediatos, permitindo medidas corretivas ou mesmo a determinação de nova limpeza antes do processamento do alimento, evitando sua contaminação. A bioluminescência, por exemplo, busca resíduos de Adenosina Tri-fosfato (ATP) como indicador da presença de matéria orgânica (COSTA, 2001). No entanto, o custo elevado do teste e a necessidade de equipamento para leitura podem ter limitado a disseminação do método.

Os resíduos de alimentos são fonte de nutrientes para a proliferação microbiana, e sua ausência restringe o crescimento e multiplicação de micro-organismos. Com o mesmo intuito de obter informações sobre a eficiência da limpeza de superfícies onde serão beneficiados alimentos, foi lançado pela 3M™ o *Clean-Trace™ Surface Protein Plus*, que recolhe resíduos de proteína e outras substâncias redutoras, resultantes do processamento de alimentos, que não foram retirados pela limpeza (3M Health Care, St. Paul, MN, USA).

Como proteína é um nutriente abundante no leite, a higienização deficiente dos equipamentos envolvidos no seu beneficiamento pode ser identificada pela presença de resíduos deste componente. No entanto, por se tratar de uma ferramenta recentemente desenvolvida e disponibilizada comercialmente, não há estudos sobre sua eficiência.

O objetivo deste trabalho foi determinar os principais pontos de contaminação, sobretudo após a pasteurização em laticínios, bem como verificar pontos com resíduos de alimentos. Como foram encontradas referências sobre a eficiência do *Clean-Trace™ Surface Protein Plus*, foi realizado também um teste para avaliar sua capacidade de detecção de resíduos de proteína.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE DO *CLEAN-TRACE™ SURFACE PROTEIN PLUS*

Para avaliar a sensibilidade do *swab Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™*, utilizou-se 2 amostras de leite pasteurizado. Foram realizadas duas séries de diluições decimais do leite pasteurizado em água destilada, em duplicata. Cada diluição representou uma concentração diferente de proteína. Um tubo contendo água destilada e um tubo contendo leite integral representaram o controle negativo e positivo, respectivamente. A concentração aproximada de proteína de cada diluição foi estimada tomando-se por base a concentração média de proteína do leite, que é 35 g/L (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001), e pela avaliação por meio de fitas para dosagem de proteína na urina (Uriclin 10, Laborclin), em ambas as séries de tubos.

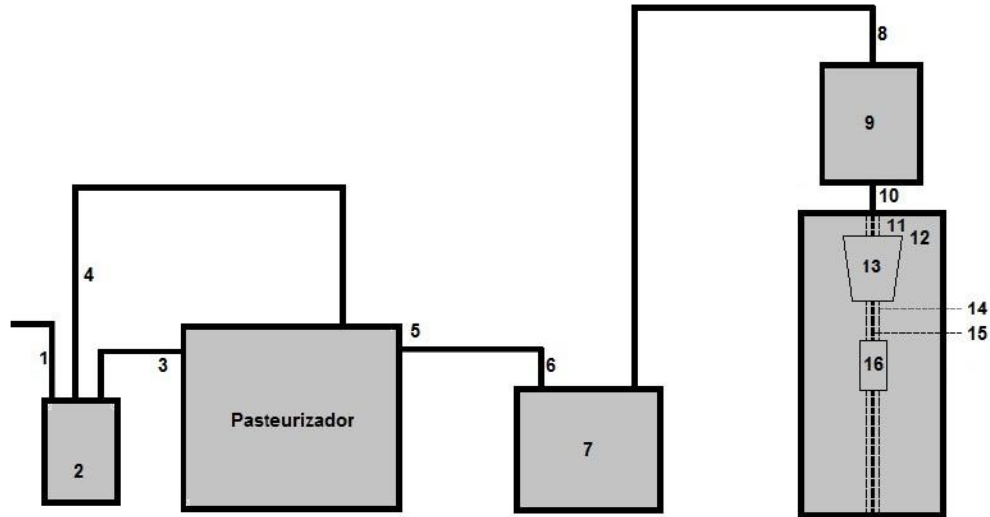
As duas séries de diluições (integral até  $10^{-5}$ ) foram distribuídas em placas de petri descartáveis vazias, em duplicata, na quantidade de 100  $\mu$ L, e espalhadas por toda a superfície. As placas foram então colocadas em estufa a 35°C por 2 horas e 30 minutos para secagem. Após a secagem das placas o *swab Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™* foi umedecido, e aplicado, conforme orientação do fabricante em toda a área da placa de petri. A leitura dos *swabs* foi realizada após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente. A interpretação dos resultados foi realizada conforme orientações do fabricante: uma coloração verde indica um resultado negativo para presença de resíduos de proteína e limpeza eficiente da superfície amostrada; a coloração cinza indica um resultado suspeito para presença de resíduos, deve-se repetir o teste, e se a coloração se mantiver deve-se decidir se é necessária uma nova limpeza; a coloração roxa indica um resultado positivo, com excesso de resíduos de proteína do alimento, devendo-se repetir a limpeza antes de beneficiar o alimento.

## Amostragem

A pesquisa foi conduzida em oito laticínios produtores de leite pasteurizado, em diferentes municípios, localizados na região norte e central do estado do Paraná, no período de agosto de 2010 a janeiro de 2011. As visitas eram pré-agendadas nos laticínios, que se localizam nos municípios de Andirá, Arapongas, Bandeirantes, Califórnia, Cornélio Procópio, Ivaiporã, Jaboti e Jandaia do Sul. Duas amostragens foram realizadas em Jaboti-PR, totalizando nove rastreamentos. Todos os laticínios utilizavam sistema de pasteurização rápida com pasteurizador em placas. Em cada laticínio foi aplicado um questionário (Anexo A) contendo questões a respeito da produção do leite e procedimentos adotados para higienização do equipamento de pasteurização.

## Coleta de amostras

Logo após o enxágue final dos equipamentos de beneficiamento do leite, que tem por finalidade remover todos os produtos químicos utilizados na limpeza e sanitização, e antes da passagem do leite, foram colhidas amostras das superfícies do equipamento de pasteurização e envase do leite através da técnica de esfregação de superfície (ABNT, 1988), utilizando *Quick Swabs 3M™* (3M Company, St. Paul, MN, USA) contendo 1 mL de caldo *Lethen* e moldes plásticos estéreis como delimitadores de área. A amostragem foi realizada utilizando dois *swabs* por superfície, para que se obtivesse quantidade de caldo *Lethen* suficiente para todas as análises: contagem de AM, CT e EC. Todos os pontos de passagem do leite dentro da sala de pasteurização foram amostrados, de acordo com a possibilidade de acesso em cada laticínio. O circuito de beneficiamento e os pontos amostrados estão demonstrados na Figura 1.

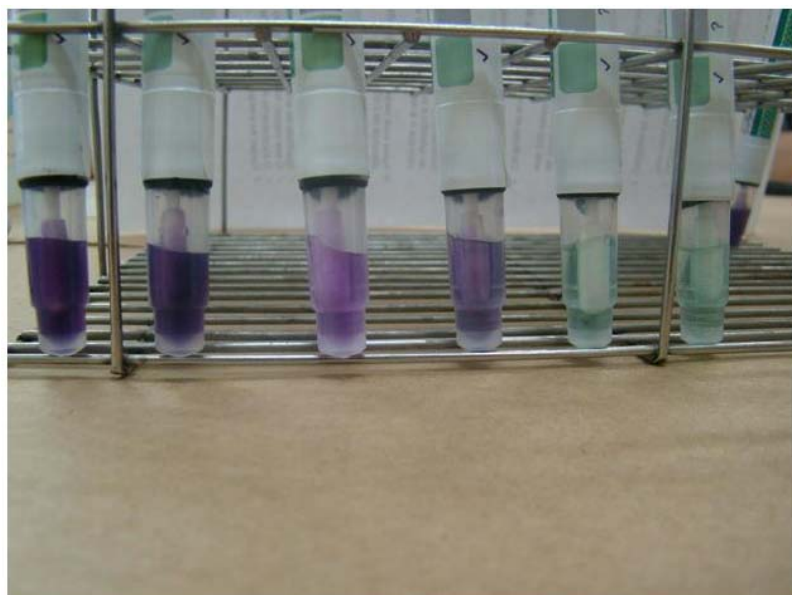


Pontos de amostragem	Swab microbiológico n	Área amostrada cm <sup>2</sup>	Clean-Trace™ n
1 Tubulação/ mangueira entrada leite cru	6	3	6
2 Tanque equilíbrio do pasteurizador	8	50	8
3 Tubulação entrada pasteurizador	4	3	4
4 Tubulação válvula retorno pasteurizador	5	3	5
5 Tubulação saída pasteurizador	8	3	8
6 Tubulação entrada tanque de equilíbrio entre pasteurizador e empacotadeira	8	3	8
7 Tanque de equilíbrio entre pasteurizador e empacotadeira	9	50	9
8 Tubulação entrada tanque pulmão da empacotadeira ou tubulação entrada empacotadeira	5	3	5
9 Tanque pulmão empacotadeira	5	50	5
10 Tubulação saída tanque pulmão empacotadeira	1	3	1
11 Embalagem antes da passagem pela luz ultravioleta	8	3	NR
12 Embalagem após passagem pela luz ultravioleta	8	3	NR
13 Espelho de dobra do filme na empacotadeira	8	3	8
14 Tubulação da guia interna da empacotadeira	1	3	1
15 Guia interna da empacotadeira (espeto)	1	Toda a superfície	1
16 Superfície de apoio da solda da empacotadeira	1	3	1
Total	86	...	70

**Figura 1** – Circuito de beneficiamento, pontos e áreas de amostragem com swabs microbiológicos e testes *Clean-Trace*™, aplicados em 9 rastreamentos em 8 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011.

NR = Não realizado

Em pontos próximos de onde se realizou os *swabs* microbiológicos, foi aplicado o teste *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™*, de acordo com as instruções do fabricante (3M Health Care, St. Paul, MN, USA). A utilização ideal do *Clean-Trace™* é depois da limpeza e antes da sanitização, uma vez que a remoção de resíduos é objetivo da limpeza e em caso da necessidade de repeti-la, economiza-se a sanitização. No entanto, devido à dinâmica das indústrias, isso não foi possível, sendo colhidas todas as amostras após a sanitização e enxágue. Os testes foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos antes do uso, e aplicados em uma área de 10 cm por 10 cm utilizando moldes plásticos estéreis. No caso de tubulações de passagem de leite, foi amostrada toda a superfície interna da tubulação, até o limite de alcance da haste do teste *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™*. Quando a superfície a ser amostrada estava seca, foi utilizado o umidificador fornecido pelo fabricante, aplicando-se 4 gotas na ponta do teste. Após aplicar os testes em todas as superfícies da sala de pasteurização, eles foram ativados empurrando a parte superior do suporte até que esta estivesse nivelada com a parte superior do tubo do dispositivo. Os testes foram agitados rapidamente de lado a lado durante 5 segundos para misturar a amostra ao reagente, mantidos na posição vertical e incubados a temperatura ambiente até a leitura, 10 minutos depois.



**Figura 2** – Testes para detecção de resíduos de proteína *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™* prontos para leitura, Londrina, 2011.



**Figura 3** – *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™* sendo aplicado na tubulação de entrada de leite no tanque de equilíbrio antes da empacotadeira, no laticínio A, 2011.



**Figura 4** – Utilização do *Quick Swab 3M™* em tanque de equilíbrio antes do pasteurizador, no laticínio B, 2011.

As amostras de leite foram colhidas após o início do processo de pasteurização nos pontos indicados no quadro 1, após agitação do leite com o auxílio de concha de aço inoxidável esterilizada e utilizando bolsas plásticas estéreis (Nasco<sup>®</sup>, Estados Unidos). Além disso, foram colhidas duas amostras do produto beneficiado (saquinhos de leite), uma do início da embalagem, e outra colhida entre a metade e o final do processo, dependendo do volume de leite beneficiado.

Descrição das amostras	n	Volume amostrado mL
Leite cru do tanque equilíbrio antes pasteurizador	8	250
Leite pasteurizado saída do pasteurizador	7	250
Leite pasteurizado antes de cair tanque equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	7	250
Leite pasteurizado do tanque equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	8	250
Leite pasteurizado tanque pulmão empacotadeira	5	250
Leite pasteurizado embalado no início do processo (1ºsaquinho)	9	1000
Leite pasteurizado embalado no final do processo	9	1000
Total	53	...

**Quadro 1** – Pontos de amostragem de leite, total de amostras colhidas e volume amostrado em 9 rastreamentos em 8 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011.

As amostras foram transportadas refrigeradas em caixa térmica contendo gelo reciclável até o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

## Preparo das Amostras

Ao chegarem ao laboratório, as amostras de leite foram homogeneizadas e diluídas em escala decimal seriada com solução salina peptonada estéril 0,85%. As amostras de leite ainda cru foram diluídas até se obter a diluição  $10^{-7}$  e as amostras de leite pasteurizado até  $10^{-3}$ . Quanto às amostras de superfície, os dois *swabs* de cada superfície foram homogeneizados formando um *pool*, e em seguida diluídos em solução salina estéril 0,85% até a diluição  $10^{-3}$ .

## Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos (AM)

A partir das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , das amostras de superfícies de equipamentos e leite pasteurizado, realizou-se a semeadura em Ágar Padrão de Contagem (PCA). Para as amostras de leite cru, semeou-se 1 mL das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-7}$  em profundidade. Todas as amostras foram semeadas em duplicata, sendo em seguida incubadas a 35°C por 48 horas (BRASIL, 2003). Após esse período, fez-se a contagem do número de colônias em cada placa, multiplicou-se a média aritmética das duplicatas pelo respectivo fator de diluição e, no caso das amostras de superfícies, foi dividido o valor encontrado pela área amostrada, expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL para leite e UFC/cm<sup>2</sup> para superfícies.

## Enumeração de coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC)

Coliformes totais e *E. coli* foram enumerados utilizando-se placas *Petrifilm*<sup>TM</sup> EC de acordo com as instruções do fabricante (3M Company, St. Paul, MN, USA). Para as amostras de leite pasteurizado foram semeadas a amostra integral e as diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , para o leite cru as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ , e para os *swabs*, a amostra integral e diluição  $10^{-1}$ . As placas foram incubadas a 35°C por

48 horas conforme as orientações do fabricante. Foram considerados coliformes totais as colônias vermelhas e azuis com formação de gás, e as colônias azuis com gás foram enumeradas como *E. coli*. Os resultados foram expressos em UFC de CT/mL ou cm<sup>2</sup> e EC/mL ou cm<sup>2</sup>.

#### ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Foram realizadas análises de acidez pelo método Dornic, índice crioscópico, peroxidase e fosfatase em todas as amostras de leite. As provas de densidade e gordura foram realizadas apenas nas amostras do produto beneficiado (saquinhos de leite). Todas as análises seguiram as metodologias indicadas na IN 68, que oficializa os métodos analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos (BRASIL, 2006).

#### AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados das análises microbiológicas e de resíduos de proteína das superfícies foram avaliados independentemente, uma vez que, segundo o manual do *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™*, o teste tem a finalidade de detectar resíduos de proteína, e bactérias influenciam no resultado apenas quando presentes em contagens superiores a 10<sup>7</sup> UFC por teste.

Os resultados das análises de leite foram comparados aos padrões existentes na IN 51 (BRASIL, 2002) (Quadro 2).

Requisitos	Integral	Padronizado	Semidesnatado	Desnatado
Gordura, (g/100g)	Teor Original	3,0	0,6 a 2,9	máx. 0,5
Acidez, (g ác. Láctico/100mL)	0,14 a 0,18 para todas as variedades quanto ao teor de gordura			
Índice Crioscópico máximo	-0,530 °H (-0,512° C )			
Contagem Padrão em Placas (UFC/mL)	n = 5; c = 2; m = 4,0x10 <sup>4</sup> M = 8,0x10 <sup>4</sup>			
Coliformes, NMP/mL (30/35°C)	n = 5 ; c = 2 ; m = 2 M = 4			
Coliformes, NMP/mL(45°C)	n = 5; c = 1; m = 1 M = 2			

**Quadro 2** – Padrões físico-químicos e microbiológicos para leite pasteurizado.  
**Fonte:** BRASIL (2002)

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste *in vitro* do *swab Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™* demonstrou que ele foi capaz de detectar, de forma eficaz, concentrações de até 0,35 g de proteína na superfície da placa (Tabela 1). Concentrações de 0,035 g por superfície resultaram em leitura inconclusiva (cinza na escala do *swab*), porém, de acordo com o fabricante, esse resultado deve ser interpretado como alerta.

**Tabela 1** – Avaliação *in vitro* da sensibilidade de detecção de proteína do *swab Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™*.

Diluição	[ ] proteína na placa (g)	Série I		Série II			
		Fita	<i>swab</i>	Fita	<i>swab</i>		
I	3,5	++/ +++	roxo xx	roxo xx	++/ +++	roxo xx	roxo xx
-1	$3,5 \times 10^{-1}$	+/ ++	cinza	roxo x	+/ ++	cinza	roxo x
-2	$3,5 \times 10^{-2}$ <sup>a</sup>		cinza			cinza	
-2	$3,5 \times 10^{-2}$	traços	-	-	traços	-	-
-3	$3,5 \times 10^{-3}$	-	-	-	-	-	-
-4	$3,5 \times 10^{-4}$	-			-		
-5	$3,5 \times 10^{-5}$	-			-		

<sup>a</sup> Resultado obtido gotejando 100 µL da diluição diretamente sobre o *swab*.

+ = 0,3 g/L.

++ = 1 g/L.

+++ = 3 g/L.

X = Concentração de proteína de 1 a 3 g/L.

XX = Concentração de proteína > 5 g/L.



**Figura 5** – Escala de cores obtidas no teste *in vitro* comparada com a escala do rótulo do *Clean-Trace™*, Londrina, 2011.

Os resultados dos rastreamentos serão apresentados da seguinte forma: os três rastreamentos cujos produtos finais embalados apresentaram contagens de AM acima do permitido para leite pasteurizado serão discutidos separadamente dos outros seis laticínios e serão tratados como laticínios A, B e C.

Em todos os laticínios, como não podemos deixar de avisar sobre a visita, houve uma preparação para nos receber, que se refletiu numa higienização, provavelmente, mais rigorosa do que realizam habitualmente. Em alguns deles o cheiro de cloro era facilmente perceptível. Estes sanitizantes em excesso prejudicam tanto a localização de contaminações como interferem na detecção da proteína, que tende a ser negativa, conforme alerta o fabricante (3M Company, St. Paul, MN, USA). Esse fato foi provavelmente responsável pelas baixas contagens de microorganismos obtidas das superfícies dos equipamentos nestes laticínios e também pelo grande número de resultados negativos para resíduos de proteína (Tabelas 2, 3 e 4).

Quanto à contaminação do leite nos seis laticínios em que o produto final ficou dentro dos padrões estabelecidos pela legislação para AM, a contaminação média por AM do leite cru colhido do tanque de equilíbrio antes do pasteurizador foi de  $1,8 \times 10^6$  UFC/mL (Tabela 2), com uma variação de  $3,8 \times 10^5$  a  $4,0 \times 10^6$  UFC/mL, sendo que 3 (50%) amostras apresentaram contagens acima de

$7,5 \times 10^5$  UFC/mL, limite estabelecido pela IN 51. Altas contagens destes micro-organismos são indicativas da má qualidade da matéria-prima, resultado de procedimentos higiênicos inadequados na ordenha, má conservação do leite na propriedade ou no transporte até o laticínio (FAGAN et al., 2005).

**Tabela 2** – Contagens médias de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e *E. coli* encontradas nas amostras de leite de 6 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011.

Amostras de leite	AM UFC/mL	CT UFC/mL	<i>E. coli</i> UFC/mL
Leite cru do tanque equilíbrio do pasteurizador	$1,8 \times 10^6$	$5,5 \times 10^4$	$5,3 \times 10^3$
Leite pasteurizado na saída do pasteurizador	$2,7 \times 10^3$	<1	<1
Leite pasteurizado antes de cair no tanque equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	$1,4 \times 10^4$	1	<1
Leite pasteurizado do tanque equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	$2,6 \times 10^3$	1	<1
Leite pasteurizado do tanque pulmão empacotadeira	$1,7 \times 10^3$	4	2
Leite pasteurizado embalado no início do processo (1ºsaquinho)	$3,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	6
Leite pasteurizado embalado no final do processo	$3,6 \times 10^3$	1	< 1

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

Da mesma forma, as contagens de coliformes totais no leite cru destes seis laticínios variaram de  $3,0 \times 10^3$  UFC/mL a  $1,1 \times 10^5$  UFC/mL. Esses resultados indicam que as condições higiênicas de obtenção do leite foram insatisfatórias pois, embora não haja padrão, é recomendado que estas contagens não excedam a  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL (CHAMBERS, 2002). As contagens de *E. coli* variaram de  $< 1,0 \times 10^1$  UFC/mL a  $2,8 \times 10^4$  UFC/mL, reforçando a ideia de falta de

higiene na ordenha e contaminação fecal. Com esta contaminação, é frequente que patógenos se desenvolvam no leite cru.

A pasteurização tem como objetivo principal eliminar os micro-organismos patogênicos que podem contaminar o leite, tornando-o um produto inócuo ao consumo humano. A pasteurização confere segurança ao leite, no entanto, contaminações pós-pasteurização podem ocorrer. Assim, a higiene de todas as superfícies em contato com o leite é fundamental para evitar recontaminações pós-pasteurização.

Imediatamente após a pasteurização, foram colhidas amostras de leite da saída do pasteurizador, nos seis laticínios. Dessas amostras, todas estavam dentro dos parâmetros microbiológicos para leite pasteurizado, com contagens inferiores a  $8,0 \times 10^4$  UFC/mL de AM. A redução média na contagem de AM quando comparada ao o leite cru foi de 99,85%, mostrando que a pasteurização foi eficiente. O resultado foi semelhante ao encontrado por Lopes e Stamford (1998), que obtiveram uma redução de 99,99% de AM ao utilizarem o processo de pasteurização rápida em leite com uma contagem inicial  $>10^7$  UFC/mL. Para este ponto a legislação determina que a contagem de coliformes a 30°C no leite seja  $<0,3$  NMP/mL de coliformes, parâmetro atendido por todos os laticínios.

Quanto ao leite pasteurizado embalado destes seis laticínios, a contagem de AM teve uma variação de  $8,7 \times 10^2$  a  $1,2 \times 10^4$  UFC/mL, com média de  $3,6 \times 10^3$  tanto nas amostras de leite pasteurizado embaladas no início do processamento quanto nas amostras de leite pasteurizado no final do processo. Quanto às contagens de coliformes e *E. coli*, as amostras apresentaram contagens médias de  $1,2 \times 10^2$  UFC/mL nas primeiras embalagens e 1 UFC/mL no final. Já para *E. coli* as contagens médias foram de 6 UFC/mL no início e  $<1$  UFC/mL no final da pasteurização. Considerando os padrões estabelecidos pela IN 51 para leite pasteurizado (quadro 2), nenhuma amostra estava acima do limite para AM, 2 (33,33%) amostras estavam acima do limite para CT, com  $6,9 \times 10^1$  e  $6,5 \times 10^2$  UFC de coliformes/mL representando 2 laticínios, e 1 (16,66%) amostra apresentou 30 UFC/mL de *E. coli*. As diferenças de contagem entre o leite embalado no início e no final do processo de pasteurização se devem provavelmente a um arraste de micro-organismos que acontece no início do processamento (Tabela 2).

Quanto à avaliação das superfícies dos equipamentos nos seis laticínios em que a contaminação por aeróbios mesófilos do produto final não

excedeu os limites estabelecidos pela legislação, os resultados expostos na Tabela 3 demonstram que a tubulação/mangueira de entrada de leite cru, que apresentou  $3,6 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> de AM foi o ponto de maior contaminação. De acordo com Gill (1998) e Eisel et al. (1997), superfícies visivelmente limpas podem apresentar contagens totais entre 10 e  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>. O mesmo ponto foi responsável pelas maiores contagens de CT e *E. coli*. A contagem média de CT foi de  $1,9 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>, enquanto que a contagem média encontrada de *E. coli* foi de 40 UFC/cm<sup>2</sup>.

**Tabela 3** – Contagens médias de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e *E. coli* encontradas nas superfícies do equipamento de beneficiamento do leite em 6 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011.

Superfícies amostradas	AM UFC/cm <sup>2</sup>	CT UFC/cm <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> UFC/cm <sup>2</sup>
Tubulação / mangueira entrada leite cru	$3,6 \times 10^4$	$1,9 \times 10^2$	40
Tanque equilíbrio do pasteurizador	$1,2 \times 10^2$	<0,1	<0,1
Tubulação entrada pasteurizador	24	<0,3	<0,3
Tubulação válvula retorno pasteurizador	22	<0,3	<0,3
Tubulação saída pasteurizador	33	<0,3	<0,3
Tubulação entrada tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	$4,0 \times 10^2$	<0,3	<0,3
Tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	3	<0,1	<0,1
Tubulação entrada tanque pulmão da empacotadeira ou tubulação entrada empacotadeira	48	<0,3	<0,3
Tanque pulmão empacotadeira	1	<0,1	<0,1
Embalagem antes da passagem pela luz ultravioleta	31	<0,3	<0,3
Embalagem após passagem pela luz ultravioleta	36	<0,3	<0,3
Espelho de dobra do filme na empacotadeira	36	<0,3	<0,3

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

Resíduos de proteína foram detectados em 33,33% dos 6 laticínios, na tubulação de entrada de leite cru, enquanto 16,66% foram suspeitos para presença desses resíduos na mesma superfície.

A tubulação de entrada de leite cru, embora evidencie a ineficiência da higienização, tem menor importância para a segurança por estar antes da pasteurização propriamente dita. A matéria-prima ruim é perigosa porque os micro-organismos remanescentes do leite cru acabam colonizando os equipamentos e recontaminando o leite pasteurizado quando não há higienização adequada.

Nas demais superfícies amostradas nestes seis laticínios, as contagens de AM foram baixas e coliformes ausentes (Tabela 3).

Foram encontrados resíduos de proteína, em superfícies de equipamentos pós-pasteurização, em apenas um laticínio, demonstrando que a higienização não foi suficiente para eliminar completamente os resíduos de leite, embora não se tenha detectado contaminação. O número de testes aplicados, de acordo com o resultado e local amostrado está representado na Tabela 4.

**Tabela 4** – Resultado de testes aplicados para detecção de resíduos de leite após higienização utilizando o *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™*, de acordo com a superfície testada, em 9 rastreamentos em 8 laticínios do Paraná entre 2010 e 2011.

Superfícies amostradas	Ausência de resíduos	Possível presença de resíduos	Presença de resíduos
	n	n	n
Tubulação / mangueira entrada leite cru	3	1	2
Tanque equilíbrio do pasteurizador	6	2	0
Tubulação entrada pasteurizador	3	1	0
Tubulação válvula retorno pasteurizador	4	0	1
Tubulação saída pasteurizador	6	2	0
Tubulação entrada tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	5	2	1
Tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	8	0	1
Tubulação entrada tanque pulmão da empacotadeira ou tubulação entrada empacotadeira	3	1	1
Tanque pulmão empacotadeira	4	1	0
Tubulação saída tanque pulmão empacotadeira	0	1	0
Espelho de dobra do filme na empacotadeira	8	0	0
Superfície de apoio da solda da empacotadeira	0	1	0
Tubulação da guia interna da empacotadeira	0	1	0
Guia interna da empacotadeira (espeto)	0	1	0

Os principais pontos onde se detectou aumento da contaminação no leite já pasteurizado dos seis laticínios foram as amostras de leite colhidas no tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e a empacotadeira, que mostrou elevação da contagem de AM e CT do leite em 50% dos laticínios. No tanque pulmão da empacotadeira, a contaminação do leite por CT aumentou em 33,33% dos laticínios e *E. coli* em 16,66% dos laticínios. As partes internas da empacotadeira elevaram a

contagem de CT do leite em 50% dos laticínios e de *E. coli* em 33,33%. Isso demonstra que os principais pontos de contaminação estão relacionados à empacotadeira.

Farias et al. (2005), na Zona da Mata em Minas Gerais, também observaram recontaminação do leite pasteurizado tipo B ao coletarem amostras do tanque de recepção de leite cru, saída do pasteurizador e do leite envasado. Apesar de estarem dentro dos padrões para contagem de micro-organismos mesófilos, as amostras do leite envasado apresentaram contagens de coliformes a 45°C acima do permitido.

Quanto aos três laticínios onde foram encontradas contagens de AM acima do permitido nas amostras de leite pasteurizado embalado, o laticínio A apresentou contagem de AM no leite cru de  $6,0 \times 10^5$  UFC/mL (Tabela 5). Esta contagem praticamente não se alterou na amostra de leite colhida na saída do pasteurizador, indicando que o pasteurizador apresentou baixa eficiência na redução da contaminação proveniente da matéria-prima. O leite embalado continuou apresentando altas contagens com valores de  $4,3 \times 10^5$  UFC/mL para AM e 91 UFC/mL para CT. O aparecimento de elevadas contagens de CT (32 UFC/mL) e AM ( $4,2 \times 10^5$  UFC/mL) no leite do tanque pulmão da empacotadeira (Tabela 5), mostram que a empacotadeira também está relacionada à contaminação encontrada no leite embalado e que a limpeza dos equipamentos não foi eficiente.

**Tabela 5 –** Rastreamento da contaminação do leite utilizando-se contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e *E. coli*, no laticínio A, entre 2010 e 2011.

Amostras de leite	AM UFC/mL	CT UFC/mL	<i>E. coli</i> UFC/mL
Leite cru do tanque equilíbrio do pasteurizador	$6,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	30
Leite pasteurizado na saída do pasteurizador	$6,0 \times 10^5$	<1	<1
Leite pasteurizado antes de cair no tanque equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	$9,5 \times 10^5$	3	<1
Leite pasteurizado do tanque equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	$5,6 \times 10^5$	5	<1
Leite pasteurizado do tanque pulmão empacotadeira	$4,2 \times 10^5$	32	<1
Leite pasteurizado embalado no início do processo (1ºsaquinho)	$4,3 \times 10^5$	91	<1
Leite pasteurizado embalado no final do processo	$4,6 \times 10^5$	78	<1

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

**Tabela 6 –** Resultado das contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT), *E. coli* e resíduos de proteína nas superfícies de equipamentos em rastreamento no laticínio A, entre 2010 e 2011.

Superfícies amostradas	AM UFC/cm <sup>2</sup>	CT UFC/cm <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> UFC/cm <sup>2</sup>	Resíduos de proteína*
Tubulação / mangueira entrada leite cru	1,6 x 10 <sup>3</sup>	<0,3	<0,3	Negativo
Tanque equilíbrio do pasteurizador	1	<0,1	<0,1	Negativo
Tubulação entrada pasteurizador	NR	NR	NR	NR
Tubulação válvula retorno pasteurizador	NR	NR	NR	NR
Tubulação saída pasteurizador	<0,3	<0,3	<0,3	Negativo
Tubulação entrada tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	5	<0,3	<0,3	Negativo
Tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	1	<0,1	<0,1	Negativo
Tubulação entrada tanque pulmão da empacotadeira ou tubulação entrada empacotadeira	NR	NR	NR	NR
Tanque pulmão empacotadeira	1,8 x 10 <sup>2</sup>	<0,1	<0,1	Suspeito
Embalagem antes da passagem pela luz ultravioleta	7	<0,3	<0,3	NR
Embalagem após passagem pela luz ultravioleta	5	<0,3	<0,3	NR
Espelho de dobra do filme na empacotadeira	40	<0,3	<0,3	Negativo

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

\* Os resíduos de proteína foram detectados utilizando-se o *Clean-Trace™ Surface Protein Plus*.

NR = Não realizado

Quanto à contaminação das superfícies dos equipamentos do laticínio A, apesar do leite já estar altamente contaminado por AM desde a saída do pasteurizador, e por alguns CT antes mesmo de cair no tanque de equilíbrio antes da empacotadeira, a superfície em que se detectou maior contaminação foi a do tanque pulmão da empacotadeira, que apresentou a maior contagem de AM entre as superfícies pós-pasteurização, além de um resultado suspeito para presença de proteína no teste de resíduo de alimento.

**Tabela 7 –** Rastreamento da contaminação do leite utilizando-se contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e *E. coli*, no laticínio B, entre 2010 e 2011.

Amostras de leite	AM UFC/mL	CT UFC/mL	<i>E. coli</i> UFC/mL
Leite cru tanque equilíbrio do pasteurizador	$4,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$
Leite pasteurizado na saída do pasteurizador	$2,0 \times 10^3$	<1	<1
Leite pasteurizado antes de cair no tanque equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	$5,1 \times 10^4$	1	<1
Leite pasteurizado do tanque equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	$4,4 \times 10^4$	1	<1
Leite pasteurizado do tanque pulmão empacotadeira	$5,7 \times 10^4$	1	1
Leite pasteurizado embalado no início do processo (1ºsaquinho)	$2,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	80
Leite pasteurizado embalado no final do processo	$8,5 \times 10^4$	2	<1

UFC = Unidades Formadoras de Colônia

No laticínio B a contagem de AM do leite cru foi de  $4,5 \times 10^6$  UFC/mL (Tabela 7). O leite apresentou contagens baixas de AM na saída do pasteurizador, que promoveu uma redução de 99,95% dessa contaminação quando comparada ao leite cru, mas antes de cair no tanque de equilíbrio entre pasteurizador e empacotadeira o leite já apresentava  $5,1 \times 10^4$  UFC/mL de AM. O leite do tanque pulmão da empacotadeira apresentou contagens de  $5,6 \times 10^4$  UFC/mL de AM, e 1 UFC/mL de CT. No primeiro saquinho de leite embalado a contagem chegou a  $2,4 \times 10^5$  UFC/mL e  $1,4 \times 10^3$ , respectivamente, além de 80 UFC/mL de *E. coli*. Esse aumento na contagem, somado ao resultado de  $-0,517^\circ\text{H}$  na crioscopia do leite indica que o responsável por essa contaminação pode ter sido, a água residual do

equipamento que não foi totalmente retirada e acabou sendo incorporada ao leite, carreando também uma elevada contaminação. A água utilizada no laticínio B, assim como todos os outros laticínios visitados, utiliza a cloração como forma de tratamento da água utilizada na limpeza do equipamento, mas na água residual dos equipamentos com resíduos do leite, o efeito do cloro pode se perder.

Lopes e Stamford (1997), avaliando a qualidade microbiológica do leite antes e após pasteurização, em 84 amostras de leite numa planta de beneficiamento em Recife – PE, encontraram um aumento de micro-organismos no tanque de estocagem de leite pasteurizado e a presença de coliformes em 60% de 21 amostras de água utilizada para lavagem e higienização dos equipamentos.

A baixa contagem de micro-organismos nas superfícies provavelmente teve relação com uma melhor limpeza dos equipamentos de pasteurização por parte dos laticínios, na véspera da colheita de material, ao saberem que passariam por um rastreamento. Apesar das baixas contagens microbiológicas nas amostras de superfície de equipamentos (Tabela 8), o principal ponto de contaminação no laticínio B foi a empacotadeira. Neste ponto houve um aumento expressivo de todos os parâmetros microbiológicos (AM, CT e EC) no leite pasteurizado embalado no início do processamento. Apesar de a contaminação ter diminuído na amostra do leite embalado no final da pasteurização e a crioscopia ter voltado a parâmetros de normalidade, a contagem de AM ainda se mostrou fora do padrão.

O teste para detecção de resíduos de proteína realizado na tubulação de entrada do tanque de equilíbrio antes da empacotadeira no laticínio B teve um resultado positivo, indicando que essa superfície apresentava resíduos de leite.

**Tabela 8** – Resultado das contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT), *E. coli* e resíduos de proteína nas superfícies de equipamentos em rastreamento no laticínio B, entre 2010 e 2011.

Superfícies amostradas	AM UFC/cm <sup>2</sup>	CT UFC/cm <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> UFC/cm <sup>2</sup>	Resíduos de proteína*
Tubulação / mangueira entrada leite cru	40	<0,3	<0,3	Negativo
Tanque equilíbrio do pasteurizador	60	<0,1	<0,1	Suspeito
Tubulação entrada pasteurizador	NR	NR	NR	NR
Tubulação válvula retorno pasteurizador	1,1 x 10 <sup>5</sup>	5,0 x 10 <sup>2</sup>	<0,3	Positivo
Tubulação saída pasteurizador	3,5 x 10 <sup>3</sup>	<0,3	<0,3	Negativo
Tubulação entrada tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	2,6 x 10 <sup>3</sup>	<0,3	<0,3	Positivo
Tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	4	<0,1	<0,1	Negativo
Tubulação entrada tanque pulmão da empacotadeira ou tubulação entrada empacotadeira	NR	NR	NR	NR
Tanque pulmão empacotadeira	1	<0,1	<0,1	Negativo
Embalagem antes da passagem pela luz ultravioleta	3	<0,3	<0,3	NR
Embalagem após passagem pela luz ultravioleta	56	<0,3	<0,3	NR
Espelho de dobra do filme na empacotadeira	85	<0,3	<0,3	Negativo

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

\* Os resíduos de proteína foram detectados utilizando-se o *Clean-Trace™ Surface Protein Plus*.

NR = Não realizado

O laticínio C teve problemas com contagens acima do padrão para CT no leite pasteurizado embalado, por isso um novo rastreamento foi realizado meses depois do primeiro. Neste novo estudo, foi permitida a desmontagem de equipamentos, o que possibilitou a coleta de amostras em pontos antes inacessíveis. O leite apresentou contagens compatíveis com os padrões para leite pasteurizado até a embalagem, onde o produto embalado apresentou coliformes acima do permitido (Tabela 9). Como no laticínio B, nos saquinhos empacotados a

crioscopia também indicou água (-0,519°H), o que significa que o leite foi embalado com restos da água do enxágue, e neste caso, possivelmente com resíduos de sanitizantes.

**Tabela 9 –** Rastreamento da contaminação do leite utilizando-se contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT) e *E. coli*, no laticínio C, entre 2010 e 2011.

Amostras de leite	AM UFC/mL	CT UFC/mL	<i>E. coli</i> UFC/mL
Leite pasteurizado antes de cair no tanque equilíbrio empacotadeira	1,2 x 10 <sup>3</sup>	<1	<1
Leite pasteurizado do tanque equilíbrio empacotadeira	1,5 x 10 <sup>3</sup>	<1	<1
Leite pasteurizado do tanque pulmão empacotadeira	5,1 x 10 <sup>3</sup>	<1	<1
Leite pasteurizado embalado no início do processo (1ºsaquinho)	4,5 x 10 <sup>3</sup>	2	<1
Leite pasteurizado embalado no final do processo	2,1 x 10 <sup>4</sup>	7	<1

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

Os *swabs* de superfícies indicaram contaminação significativa na guia interna da empacotadeira, com 1,9 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> para CT, ponto este que não foi possível de ser analisado nas outras propriedades (Tabela 10). Além disso, 77% das superfícies mostraram um resultado suspeito para presença de resíduos de proteína, o que mostra que a limpeza do equipamento não está sendo eficiente em eliminar totalmente resíduos do leite. Esses resultados indicam que é necessário fazer uma limpeza manual da tubulação onde se insere a guia da empacotadeira e da própria guia, o que implica em desmonte do equipamento.

**Tabela 10** – Resultado das contagens de Aeróbios mesófilos (AM), Coliformes a 30°C (CT), *E. coli* e resíduos de proteína nas superfícies de equipamentos em rastreamento no laticínio C, entre 2010 e 2011.

Descrição das amostras de <i>swab</i> de superfícies	AM	CT	<i>E. coli</i>	Resíduos de proteína
	UFC/ cm <sup>2</sup>	UFC/ cm <sup>2</sup>	UFC/ cm <sup>2</sup>	
Tubulação saída pasteurizador	<1	<1	<1	Suspeito
Tubulação entrada tanque equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	95	<1	<1	Suspeito
Tanque de equilíbrio entre o pasteurizador e empacotadeira	1,0 x 10 <sup>2</sup>	<1	<1	Negativo
Tubulação entrada tanque pulmão empacotadeira	20	<1	<1	Suspeito
Tanque pulmão empacotadeira	60	<1	<1	Negativo
Tubulação saída tanque pulmão empacotadeira	90	<1	<1	Suspeito
Superfície de apoio da solda da empacotadeira	<1	<1	<1	Suspeito
Tubulação da guia interna da empacotadeira	6,0 x 10 <sup>2</sup>	<1	<1	Suspeito
Guia interna empacotadeira	>1	1,9 x 10 <sup>2</sup>	<1	Suspeito

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

\* Os resíduos de proteína foram detectados utilizando-se o *Clean-Trace™ Surface Protein Plus*.

Nos três laticínios em que as contagens médias do leite pasteurizado e embalado superaram os parâmetros estabelecidos pela legislação, não foram detectadas superfícies altamente contaminadas (Tabelas 5, 7 e 9). Isso ocorreu, provavelmente, porque a contaminação estava em pontos inacessíveis à amostragem.

A dificuldade de higienização dos equipamentos pós-pasteurização, sobretudo da empacotadeira, que normalmente não faz parte da limpeza em circuito fechado e tem pontos inacessíveis à limpeza, faz com que o equipamento seja o que apresenta maiores problemas com a contaminação. Embora a coleta de amostras neste equipamento seja dificultosa e muitas vezes dependa de desmontes nem

sempre autorizados pela indústria, fica evidente que as contaminações aumentam após a passagem do leite por este equipamento.

Isso fica claro quando no retorno ao laticínio C, foi possível desmontar o equipamento para ter acesso aos pontos internos. A tabela 10 mostra que a guia interna da empacotadeira e a tubulação onde ela se encaixa e por onde passa o leite de cima abaixo, são importantes pontos de contaminação. Estes segmentos do equipamento, muitas vezes, por recomendação de técnicos, não são desmontados para limpeza porque isso implica em nova regulação do equipamento.

Quanto às provas físico-químicas realizadas nas amostras de leite, os resultados que não foram citados estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação.

Dos questionários e da observação dos procedimentos de limpeza e sanitização nos laticínios observou-se que há vários problemas com a higienização. Os laticínios utilizam concentrações e temperaturas inadequadas tanto para limpeza quanto para a sanitização. Temperaturas ou concentrações muito baixas tornam a higienização ineficiente, e quando muito elevadas comprometem o equipamento, provocando corrosão das superfícies e desgaste precoce das borrachas de vedação, que acabam permitindo o contato do leite pasteurizado com leite cru ou água dentro do pasteurizador. Existe uma falta de orientação da mão de obra utilizada nos laticínios, o que torna necessário um treinamento dos funcionários responsáveis pela pasteurização, manutenção e limpeza dos equipamentos, para que passem a realizar a higiene de forma a maximizar a eficácia dos produtos utilizados e prolongar a vida útil dos equipamentos, fornecendo assim um alimento mais seguro e evitando prejuízos.

Os equipamentos dos laticínios são precários e muitas vezes cheios de perigosos improvisos, como canos emendados, conexões soldadas e ausência de controles de temperatura. Existe realmente uma falta de opção em equipamentos adequados, que permitam fácil desmonte ou possibilidade de fácil e eficiente limpeza em circuito fechado.

## 4 CONCLUSÃO

Após a pasteurização, o ponto que mais contribuiu percentualmente para a contaminação do leite foi a empacotadeira, como indicaram as contagens de micro-organismos e a presença de resíduos de proteína.

O teste *Clean-Trace™ Surface Protein Plus 3M™* é eficiente para detecção de resíduos de proteína, e pode se constituir uma importante ferramenta para avaliar a eficiência da limpeza de equipamentos, com resultados imediatos que permitem nova limpeza dos equipamentos antes do beneficiamento, evitando descartes, autuações e garantindo a segurança do produto ao consumidor.

A conformação da maioria dos equipamentos de beneficiamento do leite dificulta a higienização e a coleta de amostras.

É necessário um treinamento de funcionários dos laticínios sobre higiene e fatores que interferem na sua eficiência.

## REFERÊNCIAS

- 3M. Petrifilm: Placas para contagem de *Escherichia coli*. **Instrução de uso**. 3M do Brasil Ltda. Microbiologia. St Paul, MN 55144-1000
- 3M – 3M HEALTH CARE US. **Microbiology**: Protein manual. St. Paul, MN, USA: 2007.
- 3M – 3M MICROBIOLOGY US. **Microbiology**: interpretation guide of plate. St. Paul, MN, USA: 2005. (Catalogue)
- 3M. *Clean-Trace™ Surface Protein Plus*. **Boletim Técnico**. 3M do Brasil Ltda. 2009.
- AJZENTAL, A.; RICCETTI, R. V.; KRUTMAN, F. K. Influência da taxa de contaminação inicial do leite sobre o resultado da pasteurização. **Leite e Derivados**, v.5, n.29, p.41-54, 1996.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n.3, p. 440-446, jun., 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Preparo da amostra para exame microbiológico. Rio de Janeiro: **ABNT**, 03 p., (NBR 10203), mar., 1988.
- BEHMER, M. L. A . **Tecnologia do leite**. 15. ed, São Paulo: Nobel, 1984.
- BELOTI, V.; SANTANA, E. H. W.; FAGAN, E. P.; BARROS, M. A. F.; PEREIRA, M. S.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; MATTOS, M. R.; NERO, L. A.; VACCARELLI, E. R.; SILVA, L. H. C.; MAGANANI, D. F.; HAGA, M. M. Principais pontos de contaminação na produção leiteira e implementação de boas práticas. In: II Congresso Panamericano de qualidade do leite e controle de mastite, 2002, Ribeirão Preto SP. **CD-Rom...** 2002.
- BELOTI, V.; TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C; MAGNANI, D. F.; MONTEIRO, A. A. ; BARROS, M. A. F.; MATTOS, M. R.; MORAES, L. B.; FAGAN, E. P. ; SILVA, W. P. ; PIRES, E. M. F. Obtenção de leite com qualidade através da implantação de Boas práticas na ordenha, em quaisquer condições de Produção. In: XVII Congresso Estadual de Medicina Veterinária, II Congresso Estadual da ANCLIVEPA, IV Encontro de Medicina de Pequenos Ruminantes do CONESUL, 2006, Gramado, RS. **CD-Rom ...** 2006. v. 1.
- BELOTI, V.; RIBEIRO JUNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; YAMADA, A. K.; SILVA, L. C. C. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 16, 2011.
- BONASSI, A. T. Métodos atuais e modernos para análise do leite e derivados. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.39 n.235,p.17-22, 1984.

BRAMLEY, A. J.; McKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. In: ROTHWELL, R. K. (Ed.). **Dairy microbiology**. London: Elsevier, 1990. v.1, cap.5, p.163-207.

BRASIL – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002. Dispõe sobre os regulamentos técnicos aplicados ao leite cru e pasteurizado. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

BRASIL – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2006.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em leite comercializados no Distrito Federal, no período 1997-2001. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 114-115, p. 34-40, 2003.

CASTRO, M. C. D. PORTUGAL, J. A .B.. **Perspectivas e Avanços em Laticínios**. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2000. 278 p.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínio, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 21, n. 3, p. 281-287, set./dez., 2001.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology Handbook: The microbiology of milk and milk products**. 3. ed. New York: John Wiley and Sons, 2002. p.39-90.

CITADIN, S. A.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J.; Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.10, n. 1, p. 52-59, jan./mar. 2009.

COSTA, P. D.; **Avaliação da técnica de ATP- bioluminescência no controle do procedimento de higienização na indústria de laticínios**. Viçosa, 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

EISEL, W. G.; LINTON, R. H.; MURIANA, P. M. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. **Food Microbiology**, v. 14, p.273-282, 1997.

FARIAS, A. X.; NASCIMENTO, M. G. F.; ALVARENGA, A. L. B. Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo B produzido em uma usina de beneficiamento da Zona da Mata de Minas Gerais. Juiz de Fora: **Anais doXXII Congresso de Laticínios de Cândido Tostes**, 2005.

FONSECA, L. F. L. Leite a granel: Modelo moderno de estocagem e transporte. **Leite e Derivados**, v.7,n.40, p.16-21, 1998.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. 8.ed. Arlington: AOAC, 1998. p.29-34.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

FRANCO, B. D. G. M. Inovação nos métodos de análise microbiológica de leite e derivados. **Indústria de Laticínios**, v.3, n.18. p.70-71, 1998.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 68, p. 70-77, 2000.

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P. de; SUMBO, F. D. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 10, p. 89-96, 2002.

GILL, C.O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. (Ed.). **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p. 118-157.

GONÇALVES RMS; FRANCO RM. Determinação da carga microbiana em leite pasteurizado tipos "B" e "C", comercializados na cidade do Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 53 p. 61-65, 1998.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vaca leiteiras**. Porto Alegre, UFRGS, 2001.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 102-103, p. 25-34, 2002.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998. 66p.

HAJDENWURCEL, J. R.; BRANDÃO, S. C. C.; LERAYER, A. L. S. **Nova legislação comentada de produtos lácteos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2002. 327p.

HAYES, P.R. **Food microbiology and hygiene**. 2.ed. New York: Chapman and Hall, 1995. 516p.

HOFFMAN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VENTURIM, T. M. Microbiologia do leite pasteurizado tipo "C" comercializado na região de São José do Rio Preto-SP.

**Revista Higiene Alimentar**, v.13, n.65, p.51-54, out. 1999.

HOLT, J. J. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willian & Wilkins, 1994.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

LEITE JR, A. F. S.; TORRANO, A. D. M. Variação sazonal das contagens microbiológicas do leite tipo "C" pasteurizado e comercializado em João Pessoa-PB. **Revista Higiene Alimentar**,v.11, n.48. p.41-44, mar./abr.1997.

LEITE JR, A. F. S.; TORRANO, A. D. M.; GELLI, D. S. Qualidade microbiológica do leite tipo C pasteurizado, comercializado em João Pessoa, Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 45-49, 2000.

LOPES, A. C. S.; STAMFORD, T. L. M. Efficiency of pasteurization on the microbiological quality of type C milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 1, p. 99-101, 1998.

LOPES, A. C. S.; STAMFORD, T. L. M. Pontos críticos de controle no fluxograma de beneficiamento do leite pasteurizado. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.47, n.4, p.367-371, 1997.

MARQUES, M. S.; COELHO JR, L. B.; SOARES, P. C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C processado no estado de Goiás. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO E VII BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 2, 2005, Búzios. **Anais...** Búzios, v. 19, n. 130, 2005.

MACEDO, R. E. F.; PFLANZER JR, S. B. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo "C" comercializado na região metropolitana de Curitiba. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 5, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas, 2003.

MACHADO, P. F.; CASSOLI, L. D. Novas tecnologias na avaliação da qualidade do leite. In: TEIXEIRA, J. C.; INÁCIO NETO, A.; DAVID, F. M.; ANDRADE, G. A.; TEIXEIRA, L. F. A. C. **Avanços em Produção e Manejo de Bovinos Leiteiros**. Lavras, v.1, n. 1, p. 161- 179, 2002.

MATTOS, M. R. d ; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; BARROS, M. de A. F.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, B. Qualidade do leite cru produzido na região Agreste de Pernambuco. **Semina, Ciências Agrárias** (Online), v. 81, p. 173-182, 2010.

MATNER, R. R.; FOX, T.L.; McIVER, D. E.; CURIALE, M. S. Efficacy of the Petrifilm™ *E. coli* count plates for *E. coli* and coliform enumeration. **Journal of Food Protection**, v.53, n.2, p.145-150, 1990.

McALLISTER, J. S.; RAMOS, M. S.; FOX, T. L. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (Petrifilm™ SM) method for enumerating bacteria in processed fluid milk samples. **Journal of Food Protection**, v.7, n.12, p.632-635, 1987.

MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G.; VAN DENDER, A. G. F.; MACHADO, R. C. Qualidade microbiológica de leites pasteurizados produzidos no estado de São Paulo. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.13, n. 20, p. 56-61, 1999.

MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

MUTUKURIMA, A. N.; FERESSEU, S. B.; NARVHJ, J. A.; ABRAHAMSEN, R. K. Chemical and microbiological quality of raw milk, produce by small holder farmer. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 8, p. 984-987, 1996.

NADER-FILHO, A.; AMARAL, L. A.; ROSSI JR., O. D. Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo "Integral", processado por algumas mini e macro-usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n.50. p.21-23, jul.ago.1997.

NASCIMENTO, G. G. F.; FIGUEIREDO, S. H. M.; IBISSES, O. B.; ANTONELLI, E. M. Condições microbiológicas do leite pasteurizado comercializado em Piracicaba, SP. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25,n.1,p.13-21, jan.jun. 1991.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.3, p.211-215, set. 2004.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A. F.; PINTO, J. P. A.; ANDRADES, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M.; Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.1, p. 191-195, jan./mar. 2005.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D.; BARROS, M. A. F.; PIRES, E. M. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e pesquisa de microrganismos patogênicos no leite produzido na região agreste de Pernambuco. In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.. **CD-Rom ...** São Paulo : TecArt, p. 1485-1485. 2006.

- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.2, p.386-390, jun. 2009.
- OLIVEIRA, A. J.; CARUSO, J. G. B. **Leite**: obtenção e qualidade do produto fluido e derivados. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1996. cap.3, p.27-43.
- OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 62, p. 10-21, 1999.
- OLIVEIRA, M. M. A.; NUNES, I. F. Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo “C” comercializado em Teresina, PI. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 111, p. 92-94, 2003.
- PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite tipo C comercializado no Recife-PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 105-109, 1999.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrótróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, jul./set. 2006.
- POLEGATO, E. P. S. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília-SP/Brasil. **Higiene Alimentar**, v.13, n.61, p.64-65, abr.maio 1999.
- POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo/ Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.
- PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; JORGE, A. F. L. Variação sazonal e correlação entre propriedades de leite utilizados na avaliação da qualidade. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 35-38, 1999.
- ROGICK, F. A. Produção higiênica do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.37, n.221, p.35-38, 1987.
- SANTOS, C. C. M.; PERESI, J. T. M.; LOPES, M. R. V. Avaliação microbiológica e físico-química do leite pasteurizado comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.1, n.58, p.85-89, 1999.
- SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Influência da temperatura durante o transporte, na qualidade microbiológica do leite cru. Parte I - Mesófilos Aeróbios. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, n.109, p.69-74, jun. 2003.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, 1997. 228 p.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, 1995. 159p.

SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. Pasteurização lenta e rápida: Uma avaliação de eficiência. **Leite e Derivados**, v.5, n.29, p.55-64, 1996.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo C produzido na região norte do Paraná. **Semina, Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, p.449-453, 2007.

TIMM, C. D.; GONZALEZ, H. L.; OLIVEIRA, D. S.; BÜCHLE, J.; ALEXIS, M. A.; COELHO, F. J. O.; PORTO, C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral produzido em microusinas da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 100-104, 2003.

TINOCO, A. L. A.; COELHO, M. S. L.; PINTO, P. S. A.; NOVATO, M. R. R.; BEZ, F. Estudo microbiológico comparativo de leites pasteurizados em estabelecimentos com inspeção federal e em fazendas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 88-93, 2002.

VALLIN V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R; ANGELA, H. L. ; SILVA, L. C. C. da. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina, Ciências Agrárias**, v. 30, p. 181-188, 2009.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for themicrobiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

## Questionário de rastreamento em laticínios



**LABORATÓRIO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL  
QUESTIONÁRIO DE RASTREAMENTO EM LATICÍNIOS**

Nome do Laticínio: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone/Fax: ( ) \_\_\_\_\_

Serviço de Inspeção:     SIM    SIP    SIF

SIP – quais municípios: \_\_\_\_\_

SIF – quais regiões: \_\_\_\_\_

**I) Dados da produção:**

Volume diário: \_\_\_\_\_ Litros

Frequência de pasteurização: \_\_\_\_\_

Horário de recebimento do leite: \_\_\_\_\_

Produtos comercializados:  Leite Pasteuriz.    Leite das Crianças

Integral

Padronizado

Semi-desnatado

Desnatado

Queijo

Outros: \_\_\_\_\_

OBS: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**II) Água:**

Fonte:     Encanada

Poço

Mina

Outros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tratamento:

Resfriamento: \_\_\_\_\_     Sim  Não    Forma de trat.: \_\_\_\_\_

Higienização: \_\_\_\_\_  Sim  Não Forma de trat.: \_\_\_\_\_  
 Caixa d'água: \_\_\_\_\_  Sim  Não Forma de trat.: \_\_\_\_\_  
 Análise de controle de qualidade:  Sim  Não Qual: \_\_\_\_\_  
 OBS: \_\_\_\_\_

---

### III) Matéria-prima:

Origem (municípios): \_\_\_\_\_

Forma de recebimento:  Caminhão Isotérmico  Latão  
 Resfriado  Quente  Ácido  Congelado

Análises realizadas na recepção:	Freqüência:
<input type="checkbox"/> Temperatura	_____
<input type="checkbox"/> Alizarol	_____
<input type="checkbox"/> Crioscopia	_____
<input type="checkbox"/> Dornic	_____
<input type="checkbox"/> Densidade	_____
<input type="checkbox"/> Gordura	_____
<input type="checkbox"/> Boecolac	_____
<input type="checkbox"/> CCS	_____
<input type="checkbox"/> CBT	_____
<input type="checkbox"/> Antibiótico	_____
Quais: _____	
<input type="checkbox"/> Outros: _____	

Destino dado ao leite: ácido \_\_\_\_\_  
 com antibiótico \_\_\_\_\_

OBS: \_\_\_\_\_

---

### IV) Processamento:

Fluxograma:

- Filtro
- Balança
- Tanque recepção
- Resfriador em placa
- Tanque expansão
-

- Silo
- Filtro de linha
- Tanque de equilíbrio do pasteurizador
- Pasteurizador
- Tanque de equilíbrio
- Tanque pulmão
- Empacotadeira

Pasteurização:

Controle de temperatura:

- Pré - aquecimento       Água    Leite
- 75°C                       Água    Leite
- 4°C                         Água    Leite
- Filtro depois do past.    Sim    Não

Volume diário/mensal: \_\_\_\_\_

Empacotadeira:    Automática    Semi-automática

Controle de lâmpada UV: \_\_\_\_\_ horas

Armazenamento em câmara fria:    Sim    Não

Controle de temperatura:    Sim    Não

Estado Geral: Piso \_\_\_\_\_

Teto \_\_\_\_\_

Paredes \_\_\_\_\_

Equipamentos \_\_\_\_\_

Destino dado aos resíduos (tratamento/esgoto): \_\_\_\_\_

OBS: \_\_\_\_\_

#### V) Higienização:

Protocolo de higienização:    Sim    Não

Alcalino (temp. \_\_\_\_ °C) \_\_\_\_\_

Ácido (temp. \_\_\_\_ °C) \_\_\_\_\_

Sanitizante \_\_\_\_\_

Solução de limpeza volta pela válvula de derivação:    Sim    Não

Registro para controle de higienização:  Sim  Não

Empacotadeira:

Uso de CIP (Cleaning in Place)  Sim  Não

Higienização manual  Sim  Não

Quais produtos utilizados/registro: \_\_\_\_\_

OBS: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### VI) Análise do leite pasteurizado:

temperatura

fosfatase

crioscopia

peroxidase

dornic

boecolac

densidade

microbiológico

gordura

OBS: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### VII) Sangria:

Volume descartado (unidade): \_\_\_\_\_

Justificativa: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

VIII) Prazo de Validade: \_\_\_\_\_

Obs: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

IX) Expedição: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_