

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CONTROLE RÁPIDO DA EFICIÊNCIA E SEGURANÇA DO
PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO* DO LEITE.
(*HTST – High Temperature Short Time)**

Adriana Oliveira de Almeida
Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CONTROLE RÁPIDO DA EFICIÊNCIA E SEGURANÇA DO
PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO* DO LEITE.
(*HTST – High Temperature Short Time)**

Adriana Oliveira de Almeida

Orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Prata

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, *Campus* de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Novembro de 2006

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ADRIANA OLIVEIRA DE ALMEIDA - nascida em 06 de Julho de 1979, na cidade de Salvador - BA. Em outubro de 2003 apresentou trabalho de graduação intitulado “Considerações sobre *Listeria monocytogenes* em alimentos lácteos e aplicação de biossensores para sua detecção e quantificação”. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Bahia – Salvador - BA em outubro de 2003. Iniciou em agosto de 2004, o curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva) ao nível de Mestrado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – *Campus* de Jaboticabal.

"A vida é uma oportunidade, aproveite-a...

A vida é beleza, admire-a...

A vida é felicidade, deguste-a...

A vida é um sonho, torne-o realidade...

A vida é um desafio, enfrente-o...

A vida é um dever, cumpra-o...

A vida é um jogo, jogue-o...

A vida é preciosa, cuide dela...

A vida é uma riqueza, conserve-a...

A vida é amor, goze-o...

A vida é um mistério, descubra-o...

A vida é promessa, cumpra-a...

A vida é tristeza, supere-a...

A vida é um hino, cante-o...

A vida é uma luta, aceite-a...

A vida é aventura, arrisque-a...

A vida é alegria, mereça-a...

A vida é vida, defenda-a..."

(Madre Teresa de Calcutá)

DEDICO...

*Aos meus queridos pais, José e Maria da Conceição e aos meus irmãos, Luciano e Leandro, minha família, minha fortaleza, meu porto seguro! Minha principal fonte de amor, compreensão, doação, sabedoria e força. Vocês são as razões da minha vida! Sem vocês ao meu lado, eu não conseguiria. Muito obrigada por me amarem tanto e por fazer de mim um ser humano feliz! **Eu amo muito vocês!***

Ao meu noivo Max, meu amor, amigo e companheiro que, durante essa longa caminhada, esteve ao meu lado me ajudando, me apoiando e compartilhando todos os momentos, sempre tão compreensivo e amoroso. Muito obrigada por todo seu carinho e dedicação durante os nossos 8 anos de convivência feliz! Você é e sempre será fundamental para o meu sucesso!

"A maior felicidade é a certeza de sermos amados, apesar de ser como somos."

(Vitor Hugo)

OFEREÇO...

*Às minhas queridas tias, **Célia Maria** e **Maria Regina**, por todo amor que vocês me deram na vida, por participarem da minha criação e por contribuírem para minha formação pessoal. Muito obrigada por serem como dedicadas mães para mim!*

*Às minhas grandes amigas, **Maria Cleydi Milanezi** e **Andréa Furlan Saraiva**, minhas irmãs do peito! A amizade, o companheirismo, o apoio e o carinho que vocês me deram foram ingredientes essenciais para a conquista desse trabalho. Muito obrigada por tudo, em especial, a você **Cleydi**, por ter me proporcionado uma grande felicidade, durante a realização do mestrado: o nascimento da minha linda afilhada, minha princesa **Júlia**.*

"Amigo é uma parte de nós que não está em nós. É alguém que nos conhece e ainda assim é capaz de nos amar. É soma de amor, multiplicação de carinho, divisão de respeito. Subtrai os defeitos, compreende os mal feitos. Nunca diz bem feito, e só nos enxerga o lado perfeito".

(Legrand)

HOMENAGEM ESPECIAL...

Ao Prof. Luiz Francisco Prata,

Meu orientador, meu mestre, meu amigo! Pela lição do saber, pela orientação constante, pela dedicação, por confiar na minha capacidade, por repartir suas experiências de vida e por me auxiliar a trilhar este caminho. O senhor me ensinou muito mais que teorias, preparando - me também para a vida, através dos seus conselhos e até "puxões de orelha". Receba, então, todo o meu carinho, minha admiração e meus sinceros agradecimentos.

"Ser mestre é, antes de tudo, saber ensinar e aprender a cada dia. É transmitir, além da sabedoria, confiança e entusiasmo. É deixar lições de vida, das quais dificilmente nos esqueceremos. É permitir que alcemos vôos, cada vez mais definitivos, em direção ao futuro".

(Giselle Rocha)

AGRADEÇO...

A Deus e a Nossa Senhora, por conduzirem a minha vida, dando-me força e saúde para continuar seguindo em frente e iluminando os meus caminhos por meio da Fé e do Amor. Eles são os meus guias que me amparam em todos os momentos da vida;

*Ao meu querido orientador **Prof. Dr. Luiz Francisco Prata**, pela excelente orientação, por ter me aceitado como sua orientada e por ter sido tão compreensivo, tão amigo em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis;*

*À técnica do laboratório **Maria Aparecida Dias Tostes (Cidinha)**, mais que uma colega de trabalho, mas uma amiga que me acolheu com carinho e que contribuiu para a conquista desse trabalho. Obrigada por tudo e por sua família ter participado dessa minha história;*

*À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, em especial, ao **Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal**, pela oportunidade de realização deste mestrado;*

*A **Teresa Carla Ferreira Barbalho**, minha querida amiga, de todas as horas, que sempre esteve à disposição, apoiando, incentivando e aconselhando. A nossa amizade é e sempre será muito especial;*

*Ao meu irmão de coração **Rodrigo de Oliveira Vieira (Timpô)**, por ser meu melhor amigo em todos os momentos, por estar sempre presente na minha vida e pelo imenso carinho. Eu adoro você!;*

*Ao meu querido amigo mineiro, **Fábio Carvalho Dias**, que esteve ao meu lado durante a realização desse trabalho, sendo um amigo fiel, carinhoso, dedicado, muito divertido e solidário. Você é muito especial!;*

*Às minhas amigas **Profª. Drª. Maria da Glória Buzinaro** e **Profª. Drª. Adolorata Aparecida Bianco Carvalho**, por estarem por perto nos bons e maus momentos, sempre dispostas a ouvir os meus desabafos... E até os meus choros! Valeu pelo carinho e pela amizade!*

*Aos membros da banca examinadora da qualificação, **Profª. Drª. Maria da Glória Buzinaro** e **Profª. Drª. Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho**, pelas valiosas sugestões a este trabalho;*

*Aos membros da banca examinadora da defesa, **Drª. Sandra Pereira Fukuda** e, novamente, a **Profª. Drª. Ângela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho**, pelas preciosas sugestões e correções;*

*Ao **Prof. Dr. Paulo Fernando Almeida**, meu orientador do PIBIC, por ter me incentivado a seguir o caminho da pesquisa, pelos ensinamentos, pelos seus conselhos e preocupações em relação a minha vida pessoal e profissional;*

*Aos **professores da Escola de Medicina Veterinária da UFBA**, pelos conhecimentos transmitidos ao longo dos anos e **aos funcionários** pelo carinho e atenção;*

*Aos meus grandes amigos de Salvador: **Junior, Daniel, Eliane, Cristiane, José Pinheiro, Tia Neuza e seus filhos, André, Felipe e Flávio.** Apesar da distância, vocês estavam ao meu lado através do pensamento e do sentimento, torcendo por mim! Valeu meus amigos por tudo, especialmente pela amizade, pelas palavras de apoio e de encorajamento!*

*A minha amiga mineira, **Nilce Maria Soares Queiroz Gama,** que com seu carinho e sua animada presença me proporcionou muitos momentos de alegria a cada reencontro;*

*Aos meus queridos amigos nordestinos, **Amélia Lizziane, Aurélio, Diego, Fagner, Frankin, Katyane, Marcelo e Michelle,** pela amizade maravilhosa que construímos. Não tenho palavras para agradecer o apoio e o carinho que vocês me deram, especialmente no final do mestrado. Inesquecíveis serão os momentos que passamos juntos!*

*Aos colegas **Mario Lúcio Novat e José Antônio Batista Rosa,** que foram muito atenciosos, prestativos e que colaboraram muito para a realização desta pesquisa;*

*À colega **Hinig Isa G. Vicente (Tuti),** pelo carinho, pela atenção e por ter sido tão prestativa na etapa final deste trabalho. Muito obrigada!*

*Aos amigos **Arnudson, Paulo Victória Soares, Flávia Fernanda Simili e Paulo Jorge,** pelos momentos felizes que passamos juntos e pelo ótimo relacionamento que construímos durante esse tempo;*

*Aos **professores da pós-graduação,** pelos conhecimentos transmitidos durante as aulas da pós-graduação, por serem atenciosos em todos os momentos que*

estiveram à disposição esclarecendo as minhas dúvidas e por contribuírem para o meu aperfeiçoamento;

*Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva: **Andréa, Assis, Conceição, Diba, Dona Adelina, Hermes, Lila, Mariza, Zé**, por me receberem com muito carinho desde a primeira vez quando fui fazer estágio curricular, no ano de 2003;*

*Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal, **Ivo Luiz de Almeida Junior e Roberta Vantini**, pelo carinho durante todos esses anos de convivência;*

*A todos os **colegas da pós-graduação** pelo ótimo convívio e companheirismo nesses 2 anos, em especial, a **Bruna Alexandrino, Claus Hellwig, Daniela Fuentes, Elizabete R. L. Pelicano, Fernanda Malva R. Costa, Fernanda C. Malavolta, Leonel Augusto M. Almeida, Luciano Menezes e Thais M. Martineli**, e aos colegas que não citei fica aqui o meu agradecimento;*

*A **CAPES**, pela concessão da bolsa de mestrado que possibilitou a execução desta pesquisa;*

*À **minha terrinha, Salvador!** Minhas raízes mais profundas! Essa linda cidade sustenta as minhas lembranças mais felizes! Que saudade dessa cidade maravilhosa!*

A todas as pessoas que contribuíram, diretamente e indiretamente, para a conquista dessa importante etapa da minha vida deixo aqui meus eternos agradecimentos;

Muito obrigada!

"Amo a liberdade, por isso, deixo as coisas que amo livres. Se elas voltarem é porque as conquistei. Se não voltarem, é porque, nunca as possuí."

(John Lennon)

SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas	iv
Lista de figuras	vi
Resumo	viii
Summary	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 – Cenário atual da indústria leiteira no Brasil	06
2.2 – Métodos de pasteurização do leite	13
2.2.1 – Pasteurização lenta	15
2.2.2 – Pasteurização rápida (HTST – High Temperature Short Time)	16
2.3 – Ocorrência de surtos associados ao consumo de leite pasteurizado e seus derivados	18
2.4 – Presença de patógenos no leite pasteurizado	22
2.5 – Qualidade do leite pasteurizado	24
2.6 – A Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na indústria (APPCC ou HACCP)	26
2.6.1 – Origem do APPCC	26
2.6.2 – Conceituação e implementação do APPCC	28
2.6.3 – Princípios do APPCC	29
2.6.3.1 – Princípio 1: Análise dos perigos potenciais e suas medidas preventivas	29
2.6.3.2 – Princípio 2: Identificação dos Pontos Críticos de Controle (PCCs)	30

2.6.3.3 – Princípio 3: Estabelecer limites críticos para as medidas preventivas para cada PCC	31
2.6.3.4 – Princípio 4: Estabelecer monitoramento dos PCCs	31
2.6.3.5 – Princípio 5: Determinar e executar ações corretivas	32
2.6.3.6 – Princípio 6: Estabelecer procedimentos de verificação	32
2.6.3.7 – Princípio 7: Manter procedimentos efetivos de registros e documentação	33
2.7 – APPCC na indústria de leite	33
2.8 – Controle do processo de produção do leite pasteurizado	37
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 – Preparo das amostras	45
4.2 – Prova rápida de redução em tubos para estimar a presença total de microrganismos	46
4.3 – Pesquisa das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina	47
4.4 – Análises microbiológicas	47
4.4.1 – Contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios e facultativos viáveis	47
4.4.2 – Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais	48
4.5 – Teste confirmatório para a prova rápida de redução em tubos	49
4.5.1 – Primeira fase: Redução em tubos do TTC pelos coliformes totais	49
4.5.2 – Segunda fase: Redução em tubos do TTC pelos coliformes fecais	50
4.6 – Análise estatística	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52

5.1 – Fase preliminar	52
5.2 – Comparação de métodos	54
5.3 – Avaliação da qualidade dos leites pasteurizados pelo método rápido de redução do TTC	64
5.4 – Redução do TTC em relação às enzimas peroxidase e fosfatase alcalina	68
5.5 – Qualidade do leite pasteurizado por área de competência dos Serviços de Inspeção	70
5.6 – Avaliação da metodologia padronizada na eficiência dos controles	71
5.7 – Proposição do teste	73
5.8 – A prova de redução do TTC no controle de processo	74
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS	78

LISTA DE TABELAS

	Página
1 – Resumo das características dos três tipos de leite definidos pelo RIISPOA	07
2 – Requisitos microbiológicos para leite cru refrigerado a serem atingidos em diferentes regiões do Brasil	09
3 – Resumo das características microbiológicas dos leites tipos A, B, C e pasteurizado recém-criado definidos pela Instrução Normativa nº51	10
4 – Determinação de pontos críticos de controle (PCCs) na produção de leite pasteurizado	36
5 – Total de amostras de leite pasteurizado dos tipos A, B e C que reduziram o TTC, considerando 8 horas de leitura como o ponto de corte	65
6 – Relação entre o tempo de redução do TTC com a contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis das amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C, considerando os padrões estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51	66
7 – Relação entre o tempo de redução do TTC com os resultados da contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis associados à contagem de coliformes pelo NMP, das amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C, considerando-as como dentro e fora dos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51	67
8 – Relação entre os resultados da prova da peroxidase com os do tempo de redução do TTC	69

9 – Total de amostras dentro e fora dos padrões de acordo com o tipo de fiscalização sanitária que as controla (SIM, SISP e SIF)	70
10 – Interpretação prática do método da prova rápida de redução em tubos	71
11 – Comparação entre as propriedades dos testes – contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis, contagem de coliformes pelo NMP e prova rápida de redução em tubos	73

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 – Fluxograma básico do processamento do leite pasteurizado	35
2 – Comparação entre a contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo no leite pasteurizado, em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%	55
3 – Comparação entre a contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo no leite pasteurizado, em log UFC/mL, e o tempo em até 8 horas necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%	56
4 – Comparação entre a contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo no leite pasteurizado, em log UFC/mL, em função da multiplicação exponencial do número de microrganismos, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%	58
5 – Relação entre a média aritmética da contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo, em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%	59
6 – Relação entre a média geométrica da contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo, em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%	60
7 – Comparação entre a contagem de coliformes (total e fecal), em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%	61

- 8 – Comparação entre a contagem de coliforme fecal (cepas *Escherichia coli* patogênica entero-hemorrágica e de *Escherichia coli* não patogênica), em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5% 62
- 9 – Comparação entre a contagem de *Escherichia coli* patogênica entero-hemorrágica, em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5% 63
- 10 – Amostras de leite pasteurizado, submetidas à prova rápida de redução em tubos, apresentando desenvolvimento da coloração a partir da redução do TTC 64

CONTROLE RÁPIDO DA EFICIÊNCIA E SEGURANÇA DO PROCESSO DE PASTEURIZAÇÃO* DO LEITE (*HTST – High Temperature Short Time)

RESUMO – Este trabalho buscou definir e padronizar uma metodologia simples e rápida para ser utilizada na indicação da segurança de consumo de leite pasteurizado. Foram analisadas 261 amostras de leite recém-pasteurizado de diferentes marcas comerciais, as quais foram submetidas à prova rápida de redução em tubos, aos métodos microbiológicos oficiais de controle (contagem padrão em placas de mesófilos, determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais) e às pesquisas de atividade enzimática (peroxidase e fosfatase alcalina). Padronizou-se a prova rápida em tubos partindo de diluições decimais das amostras, misturando-as ao Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) e a um meio nutritivo à base de leite desnatado. As leituras foram realizadas a cada 30 minutos até completar 8 horas de incubação, observando-se a formação de cor pela redução do TTC. Comparou-se os resultados da prova rápida com os da contagem padrão em placas de mesófilos e com o NMP de coliformes (total e fecal), demonstrando uma elevada correlação linear ($r = -0,85$). A maioria das amostras que se encontrava fora dos padrões regulamentares tinha peroxidase positiva classificadas como reações P++ e P+++ . Do total, 134 amostras (51,3%) foram consideradas dentro dos padrões regulamentares para ambos os métodos microbiológicos oficiais, embora oito dessas tenham reduzido o TTC em até 8 horas. Dentre as 127 amostras (49,7%) que estavam fora dos padrões regulamentares, 93 reduziram o TTC em até 8 horas de leitura. A prova rápida de redução em tubos foi capaz de detectar carga bacteriana a partir de 10^4 UFC/mL de amostra testada, com uma sensibilidade de 72,2%, especificidade de 94,0% e acurácia de 83,9%. Com isso, a atual inexistência de alternativas de controle do processo em tempo hábil deixa de ser um problema que, aliado à redução do tempo para obtenção de uma resposta objetiva e confiável, permite sugerir a adoção e utilização do método padronizado como uma ferramenta prática, rápida e econômica para controlar e monitorar a segurança do leite recém-pasteurizado, coadjuvando o gerenciamento do sistema APPCC.

Palavras-chave: pasteurização rápida, método de controle, TTC, segurança, gerenciamento, APPCC.

A NOVEL FAST METHOD FOR THE CONTROL OF EFFICIENCY AND SECURITY OF MILK PASTEURIZATION PROCESS* (*HTST – High Temperature Short Time)

SUMMARY – The objective of this study was to define and to standardize a simple and rapid methodology to be used in the indication of the security of pasteurized milk consumption. In this work, 261 fresh-pasteurized milk samples, of different commercial brands, were submitted to a rapid test of reduction in tubes and to the official microbiological methods of control (standard plate count of mesophilic aerobic bacteria, determination of the most probable number (MPN) of total and fecal coliforms) and to the research of enzymatic activity (peroxidase and alkaline phosphatase). It was standardized rapid test in tubes leaving of decimal dilutions of the samples, mixing them it the Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) and to a nutritional medium containing skimmed milk. The readings were realized to each 30 minutes until completing 8 hours of incubation, observing themselves it formation of color for the reduction of the TTC. The results of the fast test were compared with the ones of the standard plate count of mesophilic and with the MPN of coliforms (total and fecal), demonstrating a high degree of linear correlation ($r = -0,85$). Most of the samples that was found outside of established pattern had peroxidase positive as reactions P++ and P+++ . Of the total, 134 samples (51.3%) were considered inside of the established limits for both the official microbiological methods, even so eight of these have reduced the TTC in up to 8 hours. Amongst the 127 samples (49.7%) that were over the established pattern, 93 had reduced the TTC in up to 8 hours of reading. The fast reduction test in tubes was able to detect bacterial counts loading from 10^4 UFC/mL of tested sample, with 72,2% of sensitivity, specificity of 94,0% and accuracy of 83,9%. In this way, the current inexistence of control alternatives and the reduction of the time for obtainment of an objective and trustful reply give support to its adoption and use as a practical, fast and economic tool to process control and to monitor the security of fresh-pasteurized milk, improving the management of APPCC system.

Keywords: rapid pasteurization, method of control, TTC, food safety, management, APPCC.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de leite cresceu a uma taxa média de 4,5% ao ano na última década, passando de 15,6 bilhões de litros, em 1993, para 22,6 bilhões, em 2003. Atualmente, o Brasil é o sexto maior produtor, com um volume que corresponde a aproximadamente 4,5% da produção mundial. O setor é um dos mais importantes do agronegócio brasileiro, ocupando o sexto lugar em valor bruto da produção agropecuária (CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA, 2003).

Nas últimas décadas surgiram no Brasil profundas transformações em todos os elos da cadeia produtiva do leite, associadas às várias mudanças na legislação. Houve o restabelecimento dos diferentes níveis de inspeção (Federal, Estadual e Municipal), o advento do código de defesa do consumidor, estabelecendo obrigações e responsabilidades, além de mudanças no modo de execução do controle de qualidade, passando por inúmeras transformações tentando eliminar sua subjetividade, amparando-se em maior objetividade e na racionalização de custos. Isso permitiu uma síntese mais efetiva na preservação da segurança dos alimentos, privilegiando técnicas gerenciais de Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) e Procedimentos Padronizados de Higiene Operacional (PPHO), Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Análise de Riscos (AR).

A partir da década de 90, surgiu um consumidor mais bem informado. Deixou de ser um agente passivo que simplesmente aceitava o que a indústria decidia produzir e transformou-se em personagem ativo, que atualmente determina o que, quanto e onde produzir. Em síntese, o consumidor brasileiro está cada vez mais exigente. Qualquer fato que abale sua confiança no produto e diferenças de preços, por menores que sejam, provocam constantes migrações.

Entretanto, também no setor lácteo, houve uma inversão de tendência de consumo a partir da década de 90. Nesse período, estabeleceu-se o desenvolvimento de uma nova tecnologia para o tratamento térmico de matérias-primas cruas visando sua conservação, com a adoção e popularização do processo UAT (processo de pasteurização em temperatura ultra-elevada ou leite longa-vida). Assim, para o consumidor nacional, tratava-se de uma revolução de hábitos e facilidades tais como estabilidade de preços e da moeda, aliada à possibilidade da estocagem em temperatura ambiente, permitindo a inclusão do leite na compra mensal, retirando-o da tarefa escravizante da aquisição diária do produto. Esse crescimento gradativo do consumo de leite UAT chega hoje a mais de 70%, enquanto que o leite submetido à pasteurização rápida detém menos de 30% da comercialização formal de leite pela população brasileira.

Atualmente, em função dessas mudanças, decorrem dois problemas maiores: só as grandes indústrias têm recursos para investir em processo por UAT, que exige um custo elevado para sua implantação. Conseqüentemente, apenas essas indústrias possuem estrutura e corpo técnico capaz de atender preceitos dos métodos gerenciais de qualidade e segurança. Em decorrência, a maioria dos leites pasteurizados (HTST – pasteurização rápida) passou a ser produzida por pequenas e médias indústrias, as quais apresentam uma série de dificuldades, dentre elas, uma estrutura simples e ausência de corpo técnico qualificado. A maioria dessas empresas está vinculada aos sistemas de inspeção Estadual ou Municipal, funcionando com equipamentos de baixo custo e de qualidade duvidosa, sem recursos operacionais que confirmam garantias de segurança ao alimento que está sendo processado.

Todavia, apesar de todos esses problemas, as pequenas e médias indústrias são legais e estão autorizadas a funcionar, fornecendo constantemente produtos para consumo sem qualquer controle objetivo de segurança, visto que grande parte das técnicas gerenciais constitui pura utopia para essas empresas no estágio atual. Associadas a esses fatores, muitas delas, pela proximidade e facilidades, participam mais freqüentemente de abastecimento de instituições locais como escolas, hospitais, asilos, pequenos mercados, entre outros.

Portanto, só o tempo será capaz de modificar significativamente tal situação. Enquanto isso, essas dificuldades podem ser minimizadas por meio da transferência de conhecimentos técnicos e de cunho social das universidades, centros de pesquisa, órgãos governamentais de fiscalização, para os responsáveis e funcionários das médias e pequenas indústrias, melhorando, assim, a qualidade de seus produtos. Esse é o intento deste trabalho, que se propõe a disponibilizar uma nova metodologia, rápida e eficiente, para a sistematização dos controles, facilmente aplicável na rotina diária do controle de cada lote ou partida processada, possibilitando garantias mais efetivas à saúde do consumidor.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Segundo a Instrução Normativa nº 51, do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas leiteiras sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002).

Desde os primórdios da civilização, o leite tem sido usado como alimento básico na dieta humana em todas as faixas etárias, por ser um dos produtos mais completos do ponto de vista nutricional e de indiscutível valor biológico. Possui alta digestibilidade, conferindo ao ser humano uma rica fonte em nutrientes, principalmente em relação aos seus teores de proteínas, carboidratos, gorduras, aminoácidos essenciais, vitaminas, sais minerais e água (PASCHOA, 1997; HOFFMANN et al., 1999; PONSANO et al., 1999; GARCIA et al., 2000).

Do ponto de vista da saúde pública, o leite ocupa lugar de destaque na nutrição humana. É considerado como o alimento mais próximo da perfeição, o que o torna componente essencial na alimentação de todas as espécies de mamíferos, incluindo o próprio ser humano, sendo indispensável ao desenvolvimento saudável de crianças, importante na alimentação de enfermos e convalescentes e complemento ideal na dieta de adultos em geral. A aceitação e popularidade do leite fluido estão diretamente relacionadas ao seu valor nutritivo, características organolépticas e versatilidade como alimento (HOFFMANN et al., 1999; OLIVEIRA et al., 1999; PRATA, 2001; GUIMARÃES, 2002).

Por ser um fluido altamente nutritivo, é um dos alimentos mais populares e de fácil obtenção para as classes menos favorecidas. Contudo, devido a suas características intrínsecas, como riqueza em nutrientes, alta atividade de água e pH próximo ao neutro, torna-se susceptível ao ataque de um grande número de

microrganismos, provenientes do meio ambiente, do próprio animal, do homem e dos utensílios utilizados na ordenha. Dessa forma, há o permanente risco do leite servir como veiculador de microrganismos patogênicos ou de ser alvo de fraudes durante o processamento. Em ambas as circunstâncias, o produto passa a ser prejudicial para a saúde do consumidor (GONÇALVES & FRANCO, 1998; OLIVEIRA et al., 1999; FRANCO & LANDGRAF, 1999; FRANCO et al., 2000; LEITE et al., 2002).

A elevada disponibilidade de nutrientes permite que o leite seja considerado como um meio de cultura natural, bastante favorável à rápida proliferação de microrganismos contaminantes, tornando-o altamente perecível. Uma vez que esses microrganismos tenham acesso ao leite, encontrarão condições nutritivas e ambientais favoráveis à sua adaptação e multiplicação. Em consequência disso, o crescimento bacteriano no leite será sempre prejudicial, pelas alterações que pode acarretar, pelo possível desenvolvimento de patógenos ou produção e acumulação de toxinas, promovendo doenças infecciosas ou toxinfecções alimentares que colocarão em risco a saúde do consumidor (GONÇALVES & FRANCO, 1998; FRANCO et al., 2000; PRATA, 2001).

Os animais domésticos apresentam, como parte de sua microbiota, diversos microrganismos patogênicos ao homem. Animais clinicamente normais podem excretar, pelas fezes, germes importantes como *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophyla*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e outros, contaminando o leite. Assim, qualquer falha na obtenção, beneficiamento ou industrialização, o leite pode constituir um risco à saúde pública (CERQUEIRA & LEITE, 1995).

A venda de leite e produtos derivados, diretamente do produtor ao consumidor, sem qualquer tratamento prévio, notadamente a pasteurização, expõe a população ao risco de doenças como tuberculose e brucelose, entre outras, além de não assegurar a distribuição de um produto integral. Diante dos riscos sanitários, inerentes à ingestão do leite obtido e processado em condições insatisfatórias, faz-se necessária a aplicação de um tratamento térmico eficiente para a destruição dos microrganismos patogênicos e que não produza alterações significativas quanto à qualidade nutricional do produto, como degradação de gordura, proteína ou carboidrato. O controle de qualidade físico-

químico e microbiológico do leite pasteurizado deve ser uma das prioridades dos órgãos que cuidam da saúde pública, dada a importância desse alimento (SILVEIRA et al., 1988; OLIVEIRA et al., 1999; LEITE et al., 2002; MENDES et al., 2005).

2.1 Cenário atual da indústria leiteira no Brasil

A indústria leiteira mundial atravessa um período de intensas transformações em sua estrutura, podendo-se identificar como principais tendências a diferenciação do pagamento ao produtor, o aumento nas exigências de qualidade por parte das indústrias, assim como uma maior preocupação dos consumidores com relação à segurança alimentar. Nesse cenário, os produtores precisam se adequar de forma a manter a atividade de produção como uma operação rentável e eficaz (PRATA, 2001; GUERREIRO et al., 2005).

A legislação que estabelece condições mínimas da produção, identidade e qualidade do leite brasileiro foi publicada inicialmente em 1952, no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), representando um avanço para a época (Tabela 1).

Entretanto, sofreu poucas emendas ou acréscimos até quase recentemente, quando em meados da década de 90, o Ministério da Agricultura do Brasil iniciou uma discussão nacional, envolvendo os setores científicos e econômicos do setor leiteiro, buscando alternativas para melhorar a qualidade do leite produzido no país. Desde 1996, um grupo encarregou-se desse desenvolvimento, resultando no Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), cuja versão definitiva deu origem às novas normas de produção leiteira, a qual foi publicada sob a forma da Instrução Normativa nº 51, em 18 de setembro de 2002. Essa instrução determina novos critérios na produção, identidade e qualidade de leites tipos A, B, C, pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. A principal razão de todas essas medidas foi a necessidade de adequação das normas publicadas no RIISPOA às atuais realidades de produção e consumo de leite no Brasil (BRASIL, 1952, 2002; MARTINS, 2004).

Tabela 1: Resumo das características dos três tipos de leite definidos pelo RIISPOA.

Tipo A	Tipo B	Tipo C
Granja leiteira	Estábulo leiteiro	Fazenda leiteira
Vacas controladas permanentemente por Veterinários	Vacas controladas por Veterinário	Sem obrigatoriedade de controle Veterinário
Animais identificados e fichados	Animais identificados e fichados	Sem necessidade de identificação dos animais
Leite Integral	Leite Integral	Pode ser padronizado
Beneficiado na própria granja, sem mistura com leites de outras procedências	Pode ser ou não beneficiado no próprio local. Mais comum é ser enviado para a usina de beneficiamento	Usinas de beneficiamento
Ordenha mecânica, em circuito fechado	Ordenha mecânica ou manual	Ordenha mecânica ou manual
Beneficiado no próprio local, logo após a ordenha	Não resfriado, chegar à plataforma da usina de beneficiamento até às 9 h. quando resfriado, pode ser recebido até às 11 h	Chegar à plataforma de recepção até às 12 h
Leite cru – máximo 10.000 UFC/mL	Leite cru – máximo 500.000 UFC/mL	Não tem padrão
Redutase = 5h	Redutase = 3h30min	Redutase = 1h30min
Pasteurizado - máximo 500 UFC/mL	Pasteurizado - máximo 40.000 UFC/mL	Pasteurizado - máximo 150.000 UFC/mL
Coliformes totais = ausência	Coliformes totais – máximo 2 coliformes / mL	Coliformes totais – máximo 5 coliformes / mL
Coliformes fecais = ausência	Coliformes fecais = ausência	Coliformes fecais = ausência
Distribuído até 12 h após a pasteurização	Distribuído até 24 h após a pasteurização	Distribuído até 24 h após a pasteurização

Fonte: adaptada de PRATA (2001)

Dentre as modificações introduzidas pela Instrução Normativa nº 51, estão a permissão de comercialização de leites pasteurizados tipos A e B com diferentes percentagens de gordura (integral, padronizado, semi-desnatado e desnatado) e as alterações que dizem respeito ao leite tipo C. Até então, sua matéria-prima de origem não possuía parâmetros microbiológicos específicos. De acordo com as novas normas, esse leite deve ser refrigerado já na propriedade e possuir uma contagem de aeróbios mesófilos máxima de 1.000.000 UFC / mL, objetivo esse a ser atingido em diferentes

prazos de acordo com a localização geográfica da região produtora (BRASIL, 2002; NERO et al., 2005). Assim, para as regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, os padrões microbiológicos para Contagem Padrão em Placa máxima de 1.000.000 UFC / mL deveriam ter sido alcançados já em 01 de julho de 2005, como medida opcional para estabelecimentos que antecipassem sua habilitação, sendo obrigatória a partir de 01 de julho de 2008, sendo então reduzido para 750.000 UFC / mL dessa data até 01 de julho de 2011, e então reduzido para 100.000 UFC / mL a partir de 01 de julho de 2011 (Tabela 2). Esses padrões devem ser alcançados com certa facilidade por propriedades rurais que mantiverem as vacas com boa saúde, boa higiene e resfriamento abaixo de 4°C em menos de duas horas após a ordenha (BRASIL, 2002).

Ainda, a denominação "leite tipo C" vigora até a data determinada, variável de acordo com a localização geográfica da região produtora (01 de julho de 2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e 07 de julho de 2007 nas regiões Norte e Nordeste), quando será então classificado apenas como leite pasteurizado. Restarão somente os leites tipo A, o leite tipo B e o leite refrigerado (sem classificação). O leite pasteurizado tipo B provavelmente será também extinto pelo próprio mercado devido a sua proximidade com o leite pasteurizado recém-criado (Tabela 3). As diferenças entre o tipo A e o refrigerado passam a ser limites de população microbiana mais rigorosa para o tipo A, higiene e saúde animal controlada e a obrigatoriedade de industrializar o leite na própria propriedade rural (BRANDÃO, 2002; BRASIL, 2002; NERO et al., 2005).

Outra importante norma descrita na Instrução Normativa nº 51 é a regulamentação de conservação, coleta e transporte de leite cru refrigerado, independente do tipo, que deve ser feito a granel. Também é prevista a permissão de tanques resfriadores comunitários, que visa atender pequenos produtores (BRASIL, 2002; NERO et al., 2005). A coleta de leite a granel é um procedimento que reduz os custos de captação da matéria-prima, elimina postos de resfriamento, aumenta a produtividade na fazenda (notadamente para produtores que podem introduzir uma segunda ordenha diária) e aumenta sensivelmente a qualidade do leite que chega para processamento nas indústrias. Ele consiste em recolher o produto "in natura" resfriado nas fazendas produtoras para os caminhões-tanque isotérmicos através de mangueira flexível e bomba especial. Isso possibilita que o leite recolhido na propriedade conserve

suas propriedades pelo resfriamento imediato. Na recepção dos laticínios, o leite desses tanques não deverá apresentar temperatura superior a 4°C (REZENDE & BORGES JÚNIOR, 1998).

Outro importante objetivo a ser alcançado é a redução da contagem de células somáticas (CCS), em prazos similares aos estabelecidos para a contagem de aeróbios mesófilos (Tabela 2). Todas essas normas representam um importante passo do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite na busca da adequação desse produto nobre às necessidades de consumo (NERO et al., 2005).

Tabela 2: Requisitos microbiológicos para leite cru refrigerado a serem atingidos em diferentes regiões do Brasil.

ÍNDICE mensurado	ATÉ 01/07/2005 (S, SE, CO)	DE 01/07/2005 ATÉ 01/07/2008 (S, SE, CO)	DE 01/07/2008 ATÉ 01/07/2011 (S, SE, CO)	A PARTIR DE 01/07/2011 (S, SE, CO)
	ATÉ 01/07/2007 (NE, N)	DE 01/07/2007 ATÉ 01/07/2010 (NE, N)	DE 01/07/2010 ATÉ 01/07/2012 (NE, N)	A PARTIR DE 01/07/2012 (NE, N)
CPP	1.000.000 UFC/mL (Estabelecimento já habilitado)	1.000.000 UFC/mL	750.000 UFC/mL	100.000 UFC/mL (individual) 300.000 UFC/mL (conjunto)
CCS	1.000.000 (Estabelecimento já habilitado)	1.000.000	750.000	400.000

CPP = Contagem Padrão em Placas, CCS = Contagem de Células Somáticas, S = Sul, SE = Sudeste, CO = Centro-Oeste, NE = Nordeste, N = Norte. Fonte: BRASIL (2002)

Tabela 3: Resumo das características microbiológicas dos leites tipos A, B, C e pasteurizado recém-criado definidos pela Instrução Normativa n° 51.

Tipo A	Tipo B	Tipo C	Pasteurizado RECÉM-CRIADO
Leite cru tipo A Integral 10.000 UFC/mL	Leite cru tipo B Integral 500.000 UFC/mL	Leite cru tipo C 1.000.000 UFC / mL	Leite cru refrigerado
Pasteurizado m = 500 UFC/mL M = 1.000 UFC/mL	Pasteurizado m = 40.000 UFC/mL M = 80.000 UFC/mL	Pasteurizado m = 150.000 UFC/mL M = 300.000 UFC/mL	Pasteurizado m = 40.000 UFC/mL M = 80.000 UFC/mL
Fosfatase negativa / Peroxidase positiva	Fosfatase negativa / Peroxidase positiva	Fosfatase negativa / Peroxidase positiva	Fosfatase negativa / Peroxidase positiva
Coliforme total m = 1 / mL	Coliforme total m = 2 / mL M = 5 / mL	Coliforme total m = 2 / mL M = 4 / mL	Coliforme total m = 2 / mL M = 4 / mL
Coliforme fecal m = ausência	Coliforme fecal m = 1 / mL M = 2 / mL	Coliforme fecal m = 1 / mL M = 2 / mL	Coliforme fecal m = 1 / mL M = 2 / mL
<i>Salmonella</i> spp /25mL ausência	<i>Salmonella</i> spp/25mL ausência	<i>Salmonella</i> spp/25mL ausência	<i>Salmonella</i> spp/25mL ausência

m = limite microbiológico definido para a qualidade aceitável do produto, M = limite microbiológico superior tolerável para amostras de qualidade marginal. Fonte: BRASIL (2002)

O grande impacto na cadeia leiteira do Brasil ocorreu quando houve a liberação do preço do leite, no início dos anos 90, inicialmente com os preços regionalizados. Posteriormente, o leite longa vida começou sua ascensão, o que permitiu que o produto fosse produzido num lugar e vendido em outro, bem distante. Isso provocou uma revolução no setor, pois o produto mais consumido na cadeia dos lácteos é o leite fluido, pasteurizado e longa vida, sendo que, atualmente, o leite longa vida detém mais de 70% do mercado, com tendência de se consolidar cada dia mais, atingindo os 80% (CARVALHO, 2001).

No início, a industrialização de leite longa vida era reservada a algumas grandes empresas e multinacionais do setor. No entanto, o processo foi gradativamente adotado por outras empresas até que, com a estabilidade da moeda e abertura de mercados,

verificou-se uma explosão, com adoção do leite longa vida pela maioria das indústrias de laticínios do país, despejando no mercado consumidor uma infinidade de marcas e produtos (PRATA, 2001). A tecnologia empregada para sua obtenção consiste na aplicação de tratamentos baseados em temperaturas ultra-elevadas (140 - 150°C) por curtíssimo tempo (2 a 4 segundos), seguido de resfriamento imediato a uma temperatura inferior a 32°C. Além disso, o desenvolvimento de um novo sistema de embalagem, de fechamento hermético e impermeável à luz e ao oxigênio, permitiu a difusão dessa tecnologia na preservação de muitos alimentos de origem animal e vegetal, assim como ampliou o prazo de validade do produto, sem a necessidade de refrigeração enquanto fechados na embalagem original (PRATA, 2001; GUIMARÃES, 2002; MEIRELES & ALVES, 2006).

Antes do advento do leite longa vida, o consumidor era obrigado a ir diariamente ao pequeno varejo para adquirir o seu produto, visto que o leite pasteurizado possui uma curta vida de prateleira, em torno de 2 a 3 dias após o seu processamento. Tanto para o consumidor quanto para a indústria, esse conjunto de facilidades oferecido pelo leite UAT resultou na mais recente revolução na indústria de alimentos, com enorme aceitação e difusão mundial. Contudo, por se tratar de uma tecnologia que exige um alto investimento, somente as grandes indústrias conseguiram adotá-la, enquanto que as pequenas e médias indústrias passaram a produzir a maioria dos leites pasteurizados do mercado. Para se ter uma idéia, o custo de embalagem do leite longa vida é, em média, 10 vezes maior que o do leite pasteurizado (GOMES, 2006; MEIRELES & ALVES, 2006; PRATA, 2001).

A cadeia do leite no Brasil, por estar vulnerável às oscilações de mercado e de políticas econômicas, nem sempre voltadas aos interesses do setor, tem sofrido instabilidades freqüentes. Como via alternativa, têm surgido, nos últimos anos, em várias regiões do país, pequenas e micro-indústrias destinadas ao processamento de pequenos volumes de leite, as quais têm buscado e ocupado determinados nichos de mercado (TIMM et al., 2003).

Após a publicação da Lei nº 7.889 de 23 de novembro de 1989, que devolveu aos Estados e Municípios a competência para a realização da inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal, verificou-se, especialmente no Estado de São

Paulo, uma rápida propagação das chamadas mini ou micro-usinas de beneficiamento de leite, embora esses sistemas de inspeção sofram com a falta de estrutura e de recursos para enfrentar a demanda (NADER FILHO et al., 1997).

A Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), em várias oportunidades, manifestou-se preocupada com o aumento da venda informal de leite. Na tentativa de reverter esse panorama, institucionalizou o Centro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (CIPOA) que, entre tantas outras atribuições, vem promovendo a regularização da expansão e instalação de pequenas usinas no interior do Estado, como forma de oferecer leite de melhor qualidade às populações regionais. Desta forma, a Resolução SAA n° 24 de 2 de agosto de 1994 da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, define a mini-usina como sendo o estabelecimento industrial que produz e/ou recebe, beneficia e empacota leite, sendo que a produção não deve exceder a 3.000 litros diários (NADER FILHO et al., 1997; SAVITCI et al., 1998).

As indústrias de laticínios, onde se incluem as micro-indústrias, necessitam produzir alimentos com melhor qualidade. Isto ocorre em função da maior exigência dos consumidores e principalmente devido à legislação mais rígida. Aspectos nutricionais e de segurança alimentar são fundamentais para a comercialização dos produtos. Assim, preocupados com a qualidade dos alimentos oferecidos ao consumidor, alguns Estados da Federação têm regulamentado o funcionamento destes estabelecimentos (TIMM et al., 2003; CARELI et al., 2005).

Por falta de visão empresarial ou dificuldade em absorver novas tecnologias, os micro-empresários laticinistas estão atravessando períodos difíceis que ameaçam a sobrevivência de suas atividades. Grande parte das micro-indústrias, no Brasil, sob Inspeção Estadual e Municipal, apresenta problemas relacionados a instalações, precárias condições de conservação e funcionamento de equipamentos e utensílios, bem como uma deficiência de corpo técnico qualificado. Essas preocupações em relação à micro-usinas tornam-se cada vez maiores, visto que até mesmo nas grandes usinas de beneficiamento, subordinadas à fiscalização do Serviço de Inspeção Federal, não raramente podem surgir problemas relativos à qualidade do leite pasteurizado distribuído ao consumo (CARELI et al., 2005).

Nas micro-indústrias, em relação às condições de conservação e funcionamento, observam-se diversos problemas, tais como: presença de solda, ranhuras, ferrugem, equipamentos velhos e desgastados e com funcionamento inadequado. Associados a isso, algumas apresentam espaço físico inadequado para a fabricação de produtos lácteos, assim como oferecem condições bastante variadas em relação aos manipuladores, à utilização e limpeza de uniforme, de controle do estado de saúde do corpo funcional, constatando-se que poucas delas realizam o afastamento de pessoas do trabalho de manipulação de alimentos, quando as mesmas encontram-se afetadas por enfermidades infecto-contagiosas. Dessa forma, aumenta a possibilidade de falhas do processo de pasteurização e de contaminação pós-pasteurização, dificultando o fornecimento de um alimento inócuo, isento de perigos e livre de riscos à saúde do consumidor (CARELI et al., 2005).

2.2 Métodos de pasteurização do leite

Desde a descoberta do fogo, o emprego de altas temperaturas na segurança ou conservação dos alimentos está fundamentado nos efeitos deletérios do calor sobre os microrganismos. O controle do crescimento microbiano visa eliminar riscos à saúde do consumidor e prevenir ou retardar as alterações indesejáveis nos alimentos (GUIMARÃES, 2002).

O médico francês Luis Pasteur foi o primeiro cientista a compreender o papel dos microrganismos nos alimentos. Em 1837, ele demonstrou que o azedamento do leite era provocado por microrganismos e, em 1860, empregou o calor para destruir microrganismos indesejáveis nos alimentos. Esse processo, muito utilizado atualmente, denomina-se pasteurização (ROQUE et al., 2003).

Após as descobertas de Pasteur sobre fermentação e pasteurização, outras combinações tempo - temperatura de aquecimento foram investigadas e propostas para o processo de pasteurização do leite. Segundo PELCZAR et al. (1996) as relações originais de tempo e temperatura de pasteurização foram obtidas para o *Mycobacterium tuberculosis*, por ser considerado, entre os patógenos em potencial encontrados no

leite, o mais resistente ao calor. Essa bactéria é destruída quando exposta a uma temperatura de 60°C durante 10 minutos. Mais tarde verificou-se que a *Coxiella burnetii*, agente etiológico da febre Q, transmissível pelo leite, pode sobreviver em alimento aquecido a 61,7°C durante 30 minutos. Como resultados dessas descobertas, foram estabelecidas as atuais temperaturas de pasteurização.

A comissão do *Codex Alimentarius*, da Organização Mundial da Saúde, define como pasteurização o processo aplicado com o objetivo de reduzir ao mínimo os possíveis perigos para a saúde, proveniente dos microrganismos patogênicos associados ao leite, mediante tratamento térmico que provoque as mínimas alterações químicas, físicas e organolépticas do produto. Ainda que não destrua todos os potenciais patógenos presentes, reduz seu número a um nível que não constitua notável perigo à saúde (BARROS et al., 1984).

A pasteurização também age como um fator higienizante que aumenta a conservação, tendo em vista que reduz os microrganismos que deterioram o produto. Portanto, a utilização correta da temperatura tem dois objetivos básicos: a) a destruição da flora patogênica, sendo o bacilo da tuberculose e a *Coxiella burnetii* os organismos não esporulados de referência, por serem os de maior termorresistência e b) inviabilizar a maior parte das células vegetativas de bactérias normalmente presentes no leite cru, mas sem alterar suas propriedades ou características. Com isso, consegue-se uma eficiência bactericida geralmente superior a 98%, muito provavelmente em função da desnaturação parcial ou total das enzimas necessárias à subsistência ou ao desenvolvimento dos microrganismos, restando apenas algumas espécies termodúricas ou termorresistentes, muitas delas em sua forma de resistência, ou seja, os esporos (BARROS et al., 1984; PRATA, 2001).

No processo de pasteurização é fundamental que só se permita a utilização de aparelhagem convenientemente instalada e em perfeito funcionamento, provida de dispositivos de controle automático, de termorregulador, de registradores de temperatura (termógrafos de calor e de frio), válvula de derivação e outros que venham a ser considerados necessários para o controle técnico-sanitário da operação e, assim, consigam satisfazer os objetivos da pasteurização (GUIMARÃES, 2002).

Antes do advento da pasteurização era freqüente a transmissão, através do leite, de enfermidades como tuberculose, brucelose e outras. Embora seja considerada efetiva para a eliminação de patógenos de origem alimentar e outras bactérias do leite, não possui a capacidade de recuperar um leite de má qualidade, permanecendo uma flora banal em torno de 0,1% a 0,5% da quantidade que existia no leite cru antes da pasteurização. Assim, o leite pasteurizado deve ser consumido em curto espaço de tempo e quanto maior a população microbiana do leite antes da pasteurização, tanto maior será a flora residual. O aumento do número de casos na detecção de patógenos de origem alimentar em leite pasteurizado e produtos lácteos prontos para o consumo indica claramente que apenas a pasteurização não é a solução definitiva para o controle de patógenos do leite (PASCHOA, 1997; WENDPAP & ROSA, 1995; OLIVER et al., 2005).

A pasteurização do leite, de forma sistemática e obrigatória, contribui e reforça a segurança no aspecto sanitário, sendo um importante recurso industrial, uma vez que praticamente a totalidade dos patógenos não resiste ao binômio tempo - temperatura a que esta é processada, podendo ser lenta (63°C / 30 minutos), rápida (72°C / 15 segundos) ou ultra-rápida (UHT – 140 a 150°C / 2 a 4 segundos) (PRATA, 2001).

2.2.1 Pasteurização Lenta

Desde o final do século XIX até meados do século XX, esse tratamento, aplicado ao leite, foi responsável por enorme avanço no controle de algumas doenças importantes transmissíveis ao homem e possibilitou a evolução verificada no beneficiamento e industrialização do leite. Inicialmente, em função das dificuldades tecnológicas, utilizou-se, mundialmente, o processo lento que consiste em aquecer o leite a 63 – 65°C por 30 minutos, seguido de resfriamento. Durante o tempo de aquecimento, o leite é moderadamente agitado para evitar aderências às paredes do recipiente, promover aquecimento uniforme de todas as suas partículas e, ao mesmo tempo, evitar a formação de espuma (PRATA, 2001; LEITE et al., 2006).

Na pasteurização lenta, mesmo com aquecimento brando, consegue-se uma eficiência superior a 98%, contudo, apresenta a desvantagem de ser um processo demorado, descontínuo e com operação manual. É utilizado apenas em pequenas indústrias, nas quais o volume de produção não justifica a aquisição de um pasteurizador de placas (LEITE et al., 2006).

Sabe-se que grande parte das micro-indústrias no Brasil ainda utiliza a pasteurização lenta, com a agravante de que, em algumas delas, a pasteurização é realizada de maneira inadequada devido às falhas no controle do binômio tempo - temperatura. De acordo com a Instrução Normativa nº 51, do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado, em estabelecimentos de laticínios de pequeno porte pode ser adotada a pasteurização lenta para a produção de leite pasteurizado para abastecimento público ou para a produção de derivados lácteos, desde que o equipamento de pasteurização a ser utilizado cumpra com os requisitos operacionais ditados pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2002; CARELI et al., 2005).

2.2.2 Pasteurização Rápida (HTST – High Temperature Short Time)

A “pasteurização rápida” do tipo HTST (High Temperature Short Time) consiste em aquecer o leite a 72 - 75°C por 15 a 20 segundos em um equipamento com trocadores de calor de placas, seguido de choque térmico através do resfriamento imediato até temperatura igual ou inferior a 5°C. Esse sistema é mais usado em indústrias de médio e grande porte, apresentando como desvantagens o alto custo de aquisição e manutenção do equipamento, mas tem as vantagens de ser um processo contínuo, de controle mais eficaz, de maior rapidez, menor área para instalação, menos perdas por evaporação, maior eliminação de termófilos e economia de mão-de-obra (LEITE et al., 2006).

Na pasteurização rápida, a utilização da tecnologia de placas para o aquecimento, manutenção e até resfriamento, é em sistema de fluxo bidirecional, isto é, o leite em sentido progressivo e a água quente em contra corrente, proporciona ao

sistema maior eficiência e rapidez. Desse modo faz também uma auto-economia térmica, na medida em que o leite frio que está adentrando ao sistema troca calor com o que está saindo, aquecendo o primeiro e resfriando o segundo (PRATA, 2001).

A circulação do leite pelas placas alternadas, em camadas extremamente delgadas, faz com que a troca de calor seja muito rápida e eficiente, de modo que a unidade de retardamento, na qual o leite permanece pelo tempo necessário à temperatura de processamento, não necessite ser excessivamente grande, permitindo um fluxo contínuo e um procedimento industrial rápido que pode ser adequado a quantidades variadas de leite a processar. Nessa fase, o processo deve ser monitorado através de um registro termográfico, podendo acusar possíveis falhas, como temperaturas inferiores às necessárias. Completando esse aspecto de segurança há, à saída do leite, uma válvula de derivação automática de fluxo que, se a temperatura necessária não for alcançada, força o retorno do leite ao circuito para que seja reprocessado (PRATA, 2001).

A legislação brasileira estabelece que a pasteurização deva ser realizada submetendo o leite a temperaturas entre 72°C a 75°C por 15 a 20 segundos. Para verificar se a temperatura e tempo utilizados na pasteurização foram adequados, são realizadas pesquisas de duas enzimas encontradas no leite cru, a fosfatase e a peroxidase. Durante a correta pasteurização do leite, a fosfatase é inativada e a peroxidase deve permanecer ativa, já que esta só consegue ser totalmente destruída em temperaturas superiores a 80°C (BRASIL, 2002; TIMM et al., 2003).

Atualmente, com base na literatura, sabe-se que a pasteurização é muito eficaz contra bactérias tais como *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Campylobacter* sp., e *Escherichia coli*. Logo, surtos de origem alimentar associados com estes microrganismos no leite pasteurizado ou derivados lácteos, quando ocorrem, é tipicamente o resultado de técnicas impróprias de pasteurização ou contaminação pós-pasteurização, a partir do contato do produto com equipamentos contaminados ou com manipuladores (D'AOUST et al., 1988; BOOR, 2001; VAN KESSEL et al., 2004).

As bactérias formadoras de esporos, incluindo os gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, estão entre os organismos termorresistentes que podem ser isolados do leite pasteurizado, visto que a pasteurização não é capaz de destruir formas esporuladas.

Além disso, alguns estudos sugerem a possibilidade do *Mycobacterium paratuberculosis* sobreviver ao processo de pasteurização rápida. Essa bactéria é responsável pela doença de Johne (enterite infecciosa granulomatosa crônica) em ruminantes e pode estar associada à doença de Crohn (inflamação do intestino delgado e grosso) em humanos. Dessa forma, vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de se estabelecer o melhor binômio tempo-temperatura, com uma adequada margem de segurança, para a destruição desse microrganismo, caso esteja presente no leite (GRANT et al., 1996, 1998, 2001).

De qualquer modo, é essencial que a pasteurização seja planejada e operada de tal maneira que todo o leite seja aquecido à temperatura exigida e durante o tempo estabelecido. Precauções devem ser tomadas para prevenir a recontaminação após a pasteurização, assim como o produto deve ser armazenado a baixas temperaturas para retardar o crescimento dos microrganismos que sobreviveram à pasteurização (PELCZAR et al., 1996).

2.3 Ocorrência de surtos associados ao consumo de leite pasteurizado e seus derivados

Desde, aproximadamente, 1880 se reconhece a contaminação dos alimentos por microrganismos produtores de enfermidades, sendo que, a partir de então, tem-se notificado a ocorrência de numerosos casos de enfermidades transmitidas por alimentos, comumente denominadas toxinfecções alimentares (PRATA, 2001).

Apesar do leite fluido e seus derivados serem mais intensamente regulados pelos órgãos fiscalizadores Estaduais e Federais do que outros produtos alimentícios, nos últimos anos têm sido relatados, em vários países, a ocorrência de surtos de toxinfecções alimentares provocadas pelo consumo de leite e derivados contaminados por bactérias patogênicas (BOOR, 2001). A ingestão de leite cru ou inadequadamente pasteurizado tem sido associado com surtos de infecções entéricas causadas por patógenos tais como *Escherichia coli* (KEENE et al., 1997), *Salmonella* spp. (D'AOUST et al., 1985), *Listeria monocytogenes* (FLEMING et al., 1985; LINNAN et al., 1988;

MASCOLA et al., 1989), *Campylobacter jejuni* (POTTER et al., 1983; EVANS et al., 1996) e *Yersinia enterocolitica* (ACKERS et al., 2000). No entanto, a maioria dos surtos refere-se ao Reino Unido ou aos Estados Unidos da América, mais precisamente pela falta de pesquisas, relatos e estatísticas nos demais (BRYAN, 1983; LOPES & STAMFORD, 1997; JAYARÃO & HENNING, 2001).

Na Inglaterra e no País de Gales, entre janeiro de 1992 e dezembro de 2000, ocorreram 27 surtos de infecções entéricas associados ao consumo de leite e derivados lácteos. Embora esses surtos representem uma fração de 2% em relação a todos os surtos de origem alimentar, foram caracterizados por morbidade significativa. O leite cru (52%) foi o produto mais comumente relatado como veículo de infecção em surtos provenientes da ingestão de leite e derivados, enquanto o leite vendido como pasteurizado foi responsável pela maior parte dos outros surtos (37%) (GILLESPIE et al., 2003).

No período de 1973 a 1987, os produtos lácteos foram responsáveis por 2,8% dos surtos de salmonelose nos Estados Unidos (JAY, 1992). Em 1985, um surto envolvendo 16.000 casos confirmados ocorreu em seis estados americanos e foram causados por leite integral parcialmente desnatado de um laticínio de Chicago, configurando-se no maior surto de salmonelose registrado nos Estados Unidos. Descobriu-se que o equipamento de pasteurização havia sido modificado para facilitar a passagem de leite cru, resultando em contaminação do leite já pasteurizado com leite cru (PRATA, 1999).

A publicação de um artigo no *The New England Journal of Medicine*, em fevereiro de 1985, descreveu um surto de listeriose associado ao sorotipo 4b ocorrido entre junho e agosto de 1983 em Boston, Massachussets (EUA). Esse surto envolveu 49 indivíduos, sendo 42 adultos imunocomprometidos e 7 crianças, ocasionando 14 óbitos. O surto foi devido ao consumo de leite pasteurizado submetido a tratamento térmico inadequado. Vários sorotipos de *Listeria monocytogenes* foram isolados do leite cru e casos de listeriose foram observados nas vacas produtoras de leite, embora não tenha sido possível fazer a confirmação microbiológica no leite pasteurizado, sendo este o responsável pela origem do surto (FLEMING et al., 1985; DONNELLY, 1990).

Em Los Angeles, Califórnia (EUA), ocorreu um dos maiores episódios de listeriose humana no período de janeiro a agosto de 1985, envolvendo 142 casos, com 48 mortes. A epidemia atingiu 65% da população de risco, incluindo, mulheres grávidas e seus filhos e o alimento responsável foi o queijo macio tipo mexicano contaminado com *Listeria monocytogenes* 4b. As investigações realizadas na indústria revelaram que a origem da contaminação foi provavelmente a utilização de volumes superiores à capacidade do pasteurizador, ocasionando, dessa forma, um tratamento térmico insuficiente ou ainda a introdução de leite cru após a pasteurização inicial (LINNAN et al., 1988; MASCOLA et al., 1989).

Numa escola primária dos Estados Unidos, em 1986, após a ocorrência de diarreia sanguinolenta isolou-se *Campylobacter jejuni*. Esse surto envolveu 172 alunos e o alimento implicado foi o leite inadequadamente pasteurizado. A fazenda fornecedora de leite para a escola utilizava a pasteurização lenta em tanque e, nesse dia, verificou-se que o tempo de pasteurização foi inferior a 30 minutos. Esse surto é interessante ao evidenciar a necessidade de seguir-se corretamente o padrão da pasteurização (PRATA, 1999).

Um surto de *Yersinia enterocolitica* associada ao consumo de leite pasteurizado ocorreu nas cidades de Arkansas, Tennessee e Mississippi (EUA), nos meses de junho e julho de 1982. De acordo com a investigação realizada pelo “Food and Drug Administration (FDA)”, verificou-se que a contaminação foi externa, na embalagem (PRATA, 1999). Em outubro de 1995, outro surto de *Yersinia enterocolitica* sorogrupo O:8 foi registrado entre residentes do Vale de Vermont e New Hampshire. Foram identificados 10 pacientes e a infecção foi atribuída ao consumo de leite pasteurizado. No entanto, não foram registradas deficiências nos equipamentos e nos procedimentos de pasteurização, assim como não foi determinada a rota de contaminação. Segundo estudo epidemiológico, acredita-se que houve contaminação pós-pasteurização a partir de garrafas retornáveis mal higienizadas ou contaminadas pelo ambiente que foram, em seguida, utilizadas no envasamento do leite pasteurizado (ACKERS et al., 2000).

Um grande surto de *Escherichia coli* O:157 ocorreu no norte da Cumbria, em março de 1999, envolvendo o consumo de leite pasteurizado de uma fazenda. Foram acometidos 114 indivíduos, sendo que três eram crianças que apresentaram a

Síndrome Hemolítica Urêmica (GOH et al., 2002). Recentemente, entre junho e julho de 2000, pelo menos 14.000 pessoas, no Japão, adoeceram ao consumirem leite fluido processado contendo enterotoxina de *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus cereus* ou de ambos (BOOR, 2001).

Não há, no Brasil, um trabalho sistemático que obrigue a notificação de surtos e casos diagnosticados, nem qualquer análise epidemiológica que contribua para seus esclarecimentos. Uma das poucas exceções é configurada pelo trabalho da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, a qual disponibiliza uma série histórica dos casos e surtos ocorridos e notificados no estado de São Paulo, de 1998 a 2005. Apesar da confirmação dos diagnósticos, não há a identificação ou indicação do possível produto envolvido, mas, segura e possivelmente, muitos deles envolveram leite e seus derivados. Apenas a título de ilustração, nesse período foram notificados 1.591.457 casos de Doença Diarréica Aguda, 1.458 surtos de Diarréia Aguda, 71 casos de Enterite Hemorrágica que desenvolveram Síndrome Hemolítico-urêmica com três óbitos, 108 casos de Febre Tifóide e 11 casos de Botulismo, entre outros (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2006).

O leite fluido processado termicamente tem sido considerado como uma fonte proeminente de doenças humanas em que a pasteurização inadequada e a contaminação pós-pasteurização foram os principais fatores que contribuíram para a ocorrência desses incidentes. Dessa forma, a redução do grau de contaminação de matérias-primas e um programa adequado de higiene e sanificação, consistem em medidas básicas de prevenção da presença de microrganismos patogênicos na linha de produção dos alimentos. Outrossim, é preciso alertar as autoridades de saúde e o público em geral para o risco de doenças de origem alimentar, particularmente para gestantes, recém-nascidos, imunodeprimidos e idosos que constituem a população mais vulnerável (D'AOUST et al., 1988; BARBALHO, 2002).

Atualmente, a indústria leiteira tem adotado diversas iniciativas para controlar a presença de microrganismos patogênicos no leite e derivados lácteos. Um tratamento térmico efetivo é essencial, bem como o processo de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC ou HACCP) durante a produção e o beneficiamento do

leite e seus derivados. Além disso, é importante que sejam tomadas precauções extras para evitar que a contaminação pós-pasteurização ocorra, permitindo que um alimento seguro chegue até as mãos dos consumidores (VASAVADA, 1988; GILLESPIE et al., 2003).

2.4 Presença de patógenos no leite pasteurizado

O leite, ao ser sintetizado e secretado nos alvéolos da glândula mamária, é praticamente estéril. Porém, durante o seu percurso em direção ao exterior do úbere contamina-se com microrganismos saprófitas componentes da microbiota normal do animal. O leite também poderá apresentar uma variedade de microrganismos patogênicos em decorrência de processos inflamatórios do úbere ou de enfermidades no rebanho. Em função disso, o controle higiênico-sanitário dos rebanhos é um requisito fundamental para se garantir sua composição ideal e reduzir o risco de transmissão de doenças como brucelose, tuberculose, salmonelose, colibacilose, infecções estreptocócicas, intoxicação estafilocócica, entre as mais comuns (PONSANO et al., 1999, OLIVEIRA et al., 1999, PONSANO et al., 2001).

Os microrganismos contaminantes do leite após a ordenha, provenientes de equipamentos e utensílios, do meio ambiente e mesmo dos responsáveis por sua obtenção e manipulação, são os mais importantes sob o ponto de vista tecnológico, pois podem causar alterações indesejáveis ao leite, comprometendo sua qualidade e de seus derivados podendo, inclusive, chegar ao ponto de torná-lo impróprio para o consumo. Por este motivo, deve ser obtido com a máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até a ocasião de seu beneficiamento, visando garantir as características físicas, químicas e nutricionais do produto final (PONSANO et al., 1999; OLIVEIRA, 2001).

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido em más condições higiênico-sanitárias, apresentando elevados números de microrganismos, constituindo-se um risco à saúde pública, principalmente quando consumido sem tratamento térmico (CERQUEIRA & LEITE, 1995). Entretanto, praticamente são raros os levantamentos epidemiológicos

que demonstrem a incidência e a gravidade das toxinfecções de origem alimentar. Apenas trabalhos científicos têm evidenciado a ocorrência de elevado número de amostras de leite pasteurizado fora dos padrões microbiológicos brasileiros, em função das deficiências tecnológicas no setor de produção e industrialização, principalmente no que diz respeito aos cuidados higiênico-sanitários e ao inadequado uso da refrigeração (LOPES & STAMFORD, 1997).

Nos últimos anos, frequentemente têm sido levadas ao público, inúmeras denúncias sobre a qualidade do leite pasteurizado distribuído e destinado ao consumo. Embora alguns autores questionem os objetivos e a validade de determinadas denúncias, os trabalhos até então publicados em nosso meio, têm evidenciado a ocorrência de elevado número de amostras fora dos padrões microbiológicos legais para mesófilos aeróbicos, coliformes totais e coliformes fecais. Para tal situação, tem-se atribuído às falhas ocorridas durante o processo de beneficiamento e às inadequadas temperaturas de conservação do produto que, normalmente, é mantido sob temperaturas relativamente altas nos entrepostos, locais de revenda e distribuição ao consumidor (ROSSI JÚNIOR et al., 1982; NADER FILHO et al., 1988, 1989ab, 1990; WENDPAP & ROSA, 1995; WENDPAP et al., 1997; FRANCO et al., 2000).

De acordo com WENDPAP et al. (1997), ao analisarem 50 amostras de leite pasteurizado tipo C comercializado em Cuiabá - MT, durante os meses de abril e maio de 1995, verificaram que 18% foram defeituosas para coliformes totais, 30% para coliformes fecais e 16 % para contagem padrão em placas. Dentre as cinco marcas selecionadas, quatro apresentaram contagens elevadas de bactérias mesófilas, coliformes totais e fecais, microrganismos esses que deveriam ter sido eliminados durante o processo tecnológico.

Ao avaliarem a qualidade higiênico-sanitária de 142 amostras de leite pasteurizado integral comercializado no Estado de Goiás no período de janeiro a junho de 2000, VIEIRA et al. (2001b) obtiveram 38 (26,76%) amostras consideradas fora dos padrões legais para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e/ou facultativos viáveis e 36 (25,35%) amostras consideradas fora dos padrões legais vigentes na determinação do número mais provável de coliformes fecais. Esses dados sugerem falhas nas diversas etapas de produção e processamento do leite, sendo esse um

produto de alta perecibilidade, necessitando, portanto, de uma campanha de esclarecimento, assistência técnica e monitoramento, desde a ordenha até que o produto chegue à mesa do consumidor, com boa qualidade e sem alteração de seu valor nutritivo.

Na região sul do Rio Grande do Sul, durante o período de julho de 2000 a maio de 2001, 88 amostras de leite pasteurizado integral, produzido em dez micro-usinas, foram analisadas. Segundo TIMM et al. (2003), 12 (13,64%) amostras apresentaram pelo menos um resultado fora do padrão estabelecido pela legislação brasileira. Uma amostra (1,14%) ultrapassou o limite para mesófilos aeróbios, enquanto que 11 (12,50%) e uma (1,14%) amostras apresentaram resultados acima dos padrões estabelecidos para coliformes totais e coliformes fecais, respectivamente. Todas as amostras apresentaram fosfatase negativa e peroxidase positiva, sugerindo que a ocorrência de 11,36% das amostras com contagem de coliformes totais acima dos padrões esteja associada à contaminação após a pasteurização, ressaltando a necessidade de uma ação mais corretiva no controle de microrganismos no leite.

A contaminação do leite está geralmente associada às falhas no processo de pasteurização, enquanto que a contaminação pós-pasteurização está relacionada à limpeza inadequada dos equipamentos para embalagem ou contaminação através do ar. Essas situações, quando ocorrem, podem reduzir a vida de prateleira do produto, geram perdas econômicas, além de representarem um risco à saúde do consumidor. A preocupação, portanto, deve ocorrer durante as etapas de pasteurização, embalagem, transporte e comercialização, sendo muito importante a implementação de programas de qualidade que garantam um controle efetivo das condições higiênico-sanitárias das indústrias durante todo o processo até a distribuição e comercialização, para obtenção de um produto de melhor qualidade para a população (GONÇALVES & FRANCO, 1998; LEITE et al., 2002).

2.5 Qualidade do leite pasteurizado

A pasteurização pode garantir a qualidade do leite. No entanto, o leite pasteurizado deve ser consumido em curto espaço de tempo, ainda mais que a sua qualidade está intimamente relacionada com a do leite cru, a qual por sua vez é diretamente proporcional ao grau de contaminação inicial e com o tempo e temperatura de armazenamento, desde a ordenha até o instante do processamento. Portanto, a qualidade microbiológica do leite pasteurizado depende da seleção da matéria-prima, da adequada pasteurização, das boas práticas de fabricação e controle após o tratamento térmico (LOPES & STAMFORD, 1997; VIEIRA et al., 2001a; LEITE et al., 2002; GUSMÃO et al.; 2005).

O leite cru refrigerado não possui, ainda, um padrão microbiológico definido antes da pasteurização, podendo apresentar até 150.000 ufc/mL após a pasteurização. Com raras exceções, é obtido, estocado e transportado em precárias condições, com prejuízo sensível e deterioração irreversível enquanto matéria-prima e alimento. Essa situação não se modificará significativamente para melhor em curto espaço de tempo e sem esforços. Inevitavelmente, ainda durante muito tempo os consumidores serão obrigados a conviver com sua má qualidade. Num país sujeito a todo tipo de carência, inclusive alimentar, não se pretende a sua exclusão do consumo, porquanto, apesar de todas as características negativas, ainda é um alimento básico e necessário. Pretende-se, isso sim, o seu aproveitamento como alimento seguro através da aplicação de processos tecnológicos capazes de garantir ao menos sua inocuidade, não expondo a riscos desnecessários a saúde do consumidor (PRATA, 2001).

Em todas as cidades brasileiras, algumas escolas de primeiro grau, inclusive hospitais, estão sendo abastecidas com o leite “pasteurizado” no saquinho, sem o mínimo de controle exigido pela legislação. Porém, se esse leite “pasteurizado” não oferece o mínimo de garantia prevista por lei, para assegurar sua qualidade, ele pode não estar realmente pasteurizado, tornando-se um veículo carreador de doenças. Portanto, torna-se fundamental a avaliação da qualidade do leite, constituindo-se um dos parâmetros mais importantes para se conhecer: as condições de higiene com que foi preparado, os riscos que pode oferecer à saúde do consumidor, a vida útil pretendida e se está de acordo com os limites estipulados pela legislação específica para o seu controle (BRANDÃO, 1994; GUSMÃO et al.; 2005).

2.6 A Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na Indústria (APPCC ou HACCP)

Modernamente observa-se, em todo o mundo, um rápido desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos meios e métodos de detecção de agentes de natureza biológica, química e física causadores de moléstias nos seres humanos e nos animais, passíveis de veiculação pelo consumo de alimentos, motivo de preocupação de entidades governamentais e internacionais voltadas à saúde pública. Ao mesmo tempo, avolumam-se as perdas de alimentos e matérias-primas em decorrência de processos de deterioração de origem microbiológica, infestação por pragas e processamento industrial ineficaz, com severos prejuízos financeiros às indústrias de alimentos, à rede de distribuição e aos consumidores (BRASIL, 1998).

Em face desse contexto, às novas exigências sanitárias e aos requisitos de qualidade, ditados tanto pelo mercado interno quanto pelos principais mercados internacionais, o governo brasileiro, juntamente com a iniciativa privada, vem desenvolvendo, desde 1991, a implantação em caráter experimental do Sistema de Prevenção e Controle, com base na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC (do inglês *Hazard Analysis and Critical Control Points – HACCP*). Esse sistema é uma abordagem científica e sistemática para o controle de processos, elaborado para prevenir a ocorrência de problemas, assegurando que os controles são aplicados em determinadas etapas no sistema de produção de alimentos nos quais possam ocorrer perigos ou situações críticas (BRASIL, 1998).

2.6.1 Origem do APPCC

O termo “alimento seguro” é um conceito que está se generalizando na conjuntura global, não somente pela sua importância para a saúde pública, mas também pelo seu importante papel no comércio internacional. O sistema APPCC foi desenvolvido no início dos anos 60, pela Companhia *Pillsbury*, em resposta aos

requisitos de inocuidade impostos pela NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) para os alimentos espaciais produzidos para seus primeiros vôos tripulados. A partir de então, a Companhia *Pillsbury* foi escolhida para desenvolver melhores procedimentos de controle do processamento dos produtos alimentícios, de modo a assegurar um suprimento de alimentos confiável para o programa espacial da NASA. Em 1971, o programa de qualidade foi apresentado ao público pela primeira vez, durante a Conferência Nacional sobre Proteção de Alimentos, realizada nos Estados Unidos e serviu como base para a FDA (*Food and Drug Administration*) desenvolver a regulamentação para os produtos de baixa acidez (ALMEIDA, 1998; BARENDZ, 1998; ATHAYDE, 1999; BENNET & STEED, 1999).

Em 1993, o comitê sobre higiene dos alimentos do *Codex Alimentarius* estabeleceu as diretrizes de implantação do sistema APPCC. Outras organizações internacionais têm estabelecido o sistema APPCC como ferramenta eficaz na garantia da segurança alimentar como o ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*), NACMCF (*National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods*), IAMFES (*International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians*) e ILSI (*International Life Sciences Institute*) (HAJDENWURCEL, 1998).

A legislação de segurança alimentar é geralmente entendida como um conjunto de procedimentos, diretrizes e regulamentos elaborados pelas autoridades, direcionados para a proteção da saúde pública. Entretanto, o APPCC foi uma ferramenta desenvolvida originalmente pelo setor privado para garantir a segurança do produto e atualmente está sendo introduzida na legislação de vários países. No Brasil, apesar de existirem alimentos com padrões de excelência comparáveis aos produzidos nos países do Primeiro Mundo, ainda existem problemas que comprometem a qualidade e apresentam riscos à saúde humana. Nas pequenas indústrias, podem ser apontadas como questões ainda não resolvidas a falta de aplicação das Boas Práticas (sejam as de Produção e/ou Obtenção e as Boas Práticas de Fabricação). Apesar das BPF e do APPCC estarem estabelecidos na legislação por meio de leis, decretos e portarias (Portaria nº 326 / 97 e 46 / 98 do Ministério da Agricultura), sua aplicação apesar de notáveis exceções, é quase inexistente (JOUVE, 1998; FIGUEIREDO & COSTA NETO, 2001).

2.6.2 Conceituação e implementação do APPCC

A Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é um sistema de análise que identifica perigos específicos e medidas preventivas para seu controle, objetivando a segurança e a qualidade dos alimentos, baseando-se na prevenção, eliminação ou redução dos perigos em todas as etapas da cadeia produtiva. O APPCC não é um método de inspeção, mas sim um sistema dinâmico de controle e gerenciamento da segurança que fornece valiosas informações ao sistema clássico de inspeção. O Ministério da Agricultura adotou esse sistema de gerenciamento do processo industrial porque, além de assegurar os objetivos propostos, torna mais eficaz o Serviço de Inspeção Federal (BRASIL, 1998; VIALTA et al., 2002).

Uma etapa muito importante considerada como pré-requisito fundamental na implementação do Sistema APPCC traduz-se na implementação das “Boas Práticas”. Neste sentido foram publicadas duas portarias: a 326 de 30 de julho de 1997 da Secretaria da Vigilância Sanitária e a portaria 368 de 4 de setembro de 1997 do Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Essas portarias praticamente abordam os mesmos conceitos e estabelecem os requisitos gerais e essenciais de higiene e de boas práticas de fabricação para alimentos produzidos para o consumo humano (BRASIL, 1997ab).

As Boas Práticas de Fabricação (BPF), do inglês GMP (*Good Manufacturing Practices*), são um conjunto de regras que definem formas ideais de fabricação, abrangem critérios a serem estabelecidos, como higiene pessoal, higiene e sanificação de utensílios e equipamentos, edificações, controle de pragas e roedores, recebimento e estocagem de matérias-primas e produtos acabados, abastecimento de água, comportamento das pessoas envolvidas, buscando eliminar as fontes genéricas de possíveis contaminações de um produto (CARBALLIDO et al., 1994).

Quando o programa BPF não é eficientemente implantado e controlado, pontos críticos de controle adicionais são identificados, monitorados e mantidos sob a égide do Plano APPCC. Portanto, a implantação das BPF irá viabilizar e simplificar o Plano APPCC, assegurando a sua integridade e eficiência. Em 2003, entrou em vigor a

Resolução DIPOA / DAS n° 10, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que instituiu o Programa Genérico de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), o qual, juntamente com as BPF, constituiu em pré-requisito essencial à implementação do APPCC (BRASIL, 2003a; TIMM et al., 2006).

2.6.3 Princípios do APPCC

Uma vez atendidos os pré-requisitos, a elaboração de um Plano APPCC segue sete princípios básicos adotados pelo NACMCF (*National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods*) que são: (1) Identificar e avaliar perigos potenciais e estimar os riscos relacionados aos perigos durante o processo de produção; (2) Determinar os pontos críticos de controle no processo de produção nos quais esses perigos possam ser identificados e controlados; (3) Especificar os limites críticos para garantir que a operação esteja sob controle nos pontos críticos de controle; (4) Estabelecer e implementar procedimentos de monitoração dos pontos críticos de controle; (5) Determinar e executar as ações corretivas para situações quando os limites críticos não forem atendidos; (6) Estabelecer procedimentos de verificação de que o sistema está funcionando; (7) Manter procedimentos efetivos de registros e documentação (CULLOR, 1997; FIGUEIREDO & COSTA NETO, 2001; LIEVARRT et al., 2005).

2.6.3.1 Princípio 1: Análise dos perigos potenciais e suas medidas preventivas

Os perigos são definidos como uma propriedade biológica, química ou física que pode determinar que o alimento deixe de ser inócuo para o consumidor, ou seja, podem configurar-se como “causa” de um agravo ou dano à saúde do consumidor. Dessa forma, o termo “perigo” está limitado somente ao aspecto de inocuidade. Os perigos microbiológicos devem receber prioridade na implantação do Sistema APPCC por

apresentarem uma maior ameaça à saúde do consumidor. Além disso, a equipe deve conduzir a análise de perigos e identificar as etapas do processo nas quais os perigos de potencial significado podem ocorrer. Esses perigos, que em função de sua natureza poderão ser prevenidos, eliminados ou reduzidos a níveis aceitáveis para assegurar a produção de alimentos seguros, devem ser definidos pela equipe de APPCC, assim como medidas preventivas devem ser aplicadas para cada perigo (ALMEIDA, 1998; HAJDENWURCEL, 1998).

O termo “risco” refere-se à estimativa da probabilidade de ocorrência de um perigo à saúde pública, associando elementos matemáticos de probabilidade de ocorrência com estimativa de severidade ou gravidade de suas conseqüências, de perda da qualidade de um produto ou alimento ou de sua integridade econômica. Assim, a análise de risco (AR) consiste na avaliação sistemática de todas as etapas envolvidas na produção de um alimento específico, desde a obtenção das matérias-primas até o uso pelo consumidor final, visando estimar a probabilidade da ocorrência dos perigos, levando-se também em consideração como o produto será consumido (BRASIL, 1998).

2.6.3.2 Princípio 2: Identificação dos Pontos Críticos de Controle (PCCs)

Um PCC pode ser definido como uma etapa, ponto ou procedimento no qual se possam aplicar medidas de controle para prevenir, eliminar ou reduzir um perigo a nível aceitável. Os pontos críticos de controle podem incluir: controle de formulação do alimento, prevenção de contaminação cruzada, procedimentos específicos de higiene, processamento térmico com tempo e temperatura especificados como necessários para destruir um determinado microrganismo patogênico, a cocção, a refrigeração com objetivo de prevenir a multiplicação de microrganismos patogênicos ou ajuste do pH necessário para prevenir a formação de toxinas. Os PCCs devem ser descritos e documentados em todos os seus detalhes, bem como devem ser usados somente como o propósito de conseguir-se a produção de alimentos inócuos (ALMEIDA, 1998).

2.6.3.3 Princípio 3: Estabelecer limites críticos para as medidas preventivas para cada PCC

O limite crítico é um critério que deve ser estabelecido para cada medida preventiva associada a um PCC. Os limites críticos podem ser obtidos de fontes tais como guias e padrões de legislação, publicações científicas especializadas, experiência prática, levantamento prévio de dados, estudos experimentais, normas internas de cada empresa, entre outros. Cada medida preventiva está associada com limites críticos que são as fronteiras de segurança para que cada PCC possa variar sem que se perca o controle sobre ele. Existem limites críticos para medidas preventivas como temperatura, tempo, dimensões físicas, atividade de água (A_w), pH, acidez titulável, concentração de sal, cloro, viscosidade, conservadores, resíduos de antibióticos, carga microbiana, ou informação sensorial como textura, aroma e aparência visual (ALMEIDA, 1998; HAJDENWURCEL, 1998).

2.6.3.4 Princípio 4: Estabelecer monitoramento dos PCCs

O monitoramento é uma seqüência planejada de observações ou medições devidamente registradas para avaliar se um PCC está sob controle. O monitoramento produz um registro preciso para futuro uso durante a verificação e é utilizado fundamentalmente para três propósitos. Primeiro, o monitoramento é essencial para a inocuidade dos alimentos, já que, por meio dele é possível seguir todos os passos das operações; segundo, é utilizado para determinar quando há perda de controle e ocorrem desvios em um PCC; e, em terceiro lugar, o monitoramento proporciona documentação escrita que vai ser utilizada durante a verificação do Plano APPCC (ALMEIDA, 1998; BRASIL, 1998).

A escolha da pessoa responsável pelo monitoramento é uma consideração importante para cada PCC. Essa escolha dependerá do número de PCCs e medidas preventivas, bem como da complexidade do monitoramento. Para isso, os indivíduos

escolhidos para monitorar os PCCs devem ser treinados na técnica utilizada para monitorar cada medida preventiva, estar ciente dos propósitos e importância do monitoramento, ter acesso rápido e fácil à atividade de monitoramento, ser imparcial, além de proceder corretamente o registro da atividade de monitoramento (HAJDENWURCEL, 1998).

2.6.3.5 Princípio 5: Determinar e executar ações corretivas

Ações corretivas específicas devem ser criadas para cada PCC identificado, a fim de que possam trazer o PCC sob controle, definir o que fazer com o produto que saiu enquanto o PCC estava fora de controle e descobrir porque o PCC estava fora de controle. Os desvios e procedimentos para disposição dos produtos devem estar documentados. Assim, a definição do destino do produto em desacordo com a especificação, a correção da causa de não conformidade para assegurar que o PCC está sob controle e a rejeição do lote de matéria-prima são exemplos de medidas corretivas (CULLOR, 1997; FIGUEIREDO & COSTA NETO, 2001).

2.6.3.6 Princípio 6: Estabelecer procedimentos de verificação

A aplicação de métodos de verificação e auditoria, procedimentos e testes, incluindo amostragem e análises aleatórias, podem ser utilizados para testar se o sistema APPCC está funcionando corretamente. De maneira regular ou não planejada, a informação disponível no sistema APPCC deve ser sistematicamente analisada. Além disso, o plano APPCC aprovado pelas mais altas autoridades do estabelecimento, bem como seus registros, deverão estar arquivados em local de fácil acesso, preferencialmente no próprio estabelecimento (ALMEIDA, 1998; FIGUEIREDO & COSTA NETO, 2001).

2.6.3.7 Princípio 7: Manter procedimentos efetivos de registros e documentação

Os registros utilizados no sistema APPCC devem geralmente incluir a equipe de APPCC e definições de responsabilidades, descrição do produto e sua utilização, fluxograma do processo com os PCCs, perigos associados com cada PCC e medidas preventivas, limites críticos, sistema de monitoramento, ações corretivas para os desvios dos limites críticos, registros de todos PCCs e procedimentos para verificação do sistema APPCC. Dessa maneira, os arquivos devem ser mantidos para demonstrar a produção segura do produto, sendo que todas as informações devem ser mantidas para acompanhamento e revisões subseqüentes (HAJDENWURCEL, 1998; BRUM, 2004).

2.7 APPCC na indústria de leite

Trabalhos sobre a aplicação desse sistema no processamento do leite pasteurizado não têm sido encontrados na literatura. No entanto, a ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*) descreve a aplicação do método *HACCP* no processamento do leite cru e certos derivados do leite, como leite *UHT*, leite em pó e queijo Cheddar (LOPES & STAMFORD, 1997).

No plano APPCC é fundamental a construção do fluxograma da produção, que corresponde a uma esquematização seqüencial e um memorial descritivo detalhando as etapas de elaboração do produto. O propósito desse diagrama é ser útil à equipe APPCC, fazendo uma descrição clara, simples e prática de todas as etapas relacionadas com o processamento do produto. Certos tipos de informações podem ser consideradas, como: ingredientes utilizados, procedimentos em cada estágio do processamento, equipamentos usados, fontes de contaminação e condições de tempo e temperatura às quais os alimentos são submetidos. Deve incluir todas as condições de temperatura e duração de cada fase do processo (ALMEIDA; 1998; BRASIL, 1998; HAJDENWURCEL, 1998).

Na pequena indústria de laticínios, o fluxograma básico de processamento do leite pasteurizado consiste nas seguintes etapas: produção e obtenção do leite cru na fazenda leiteira, estocagem refrigerada, coleta e transporte até a indústria de beneficiamento, recepção e seleção do leite cru na indústria, filtração, resfriamento e armazenamento do leite cru, mais uma etapa de filtração, clarificação e padronização do leite, pasteurização, armazenamento do leite pasteurizado, com etapas posteriores de envase, estocagem e distribuição do leite pasteurizado no comércio (Figura 1).

No momento da chegada do leite cru na indústria, é imprescindível uma criteriosa seleção do produto, devendo o mesmo ser conservado em tanque de armazenamento a 5°C ou menos. Como essa temperatura não é capaz de eliminar perigos microbiológicos, mas controlá-los a níveis aceitáveis, evita-se apenas a multiplicação da maioria das bactérias patogênicas. A conservação do leite no tanque de estocagem é considerada um ponto crítico de controle parcialmente eficaz. O processo de pasteurização, por sua vez, é um ponto crítico de controle totalmente eficaz, pois destrói as bactérias patogênicas, eliminando o perigo microbiológico. O conhecimento de que a pasteurização não é capaz de eliminar todas as toxinas, enzimas e esporos microbianos que podem estar presentes no leite cru, leva a propor outros PCCs antes e após esse tratamento térmico, devendo-se controlar principalmente a temperatura de refrigeração durante a estocagem do produto (Tabela 4) (LOPES & STANFORD, 1997).

Na indústria de laticínios, a presença dos perigos microbiológicos, químicos e, em menor intensidade, os físicos devem sempre ser levados em consideração. Perigos microbiológicos incluem os agentes clássicos das zoonoses e os microrganismos contaminantes como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Spretooccus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* e outros, enquanto que os bolores, vírus e parasitas não apresentam muita importância. Dentre os perigos químicos no leite, podem ser citados aqueles originários de práticas alimentares (aflatoxinas, nitratos), práticas agrícolas (pesticidas), terapia veterinária (antibióticos), poluição (elementos radioativos, chumbo) ou acidentes (HAJDENWURCEL, 1998). Dessa forma, torna-se evidente que, para assegurar a qualidade microbiológica do leite pasteurizado, durante o processamento industrial, é necessário que sejam controlados os perigos microbiológicos em cada PCC através da

monitoração da higienização dos equipamentos que entram em contato com o leite, do binômio tempo – temperatura de pasteurização e, principalmente, da temperatura de conservação nos tanques de um produto de boa qualidade e que não represente um risco a saúde do consumidor (LOPES & STANFORD, 1997).

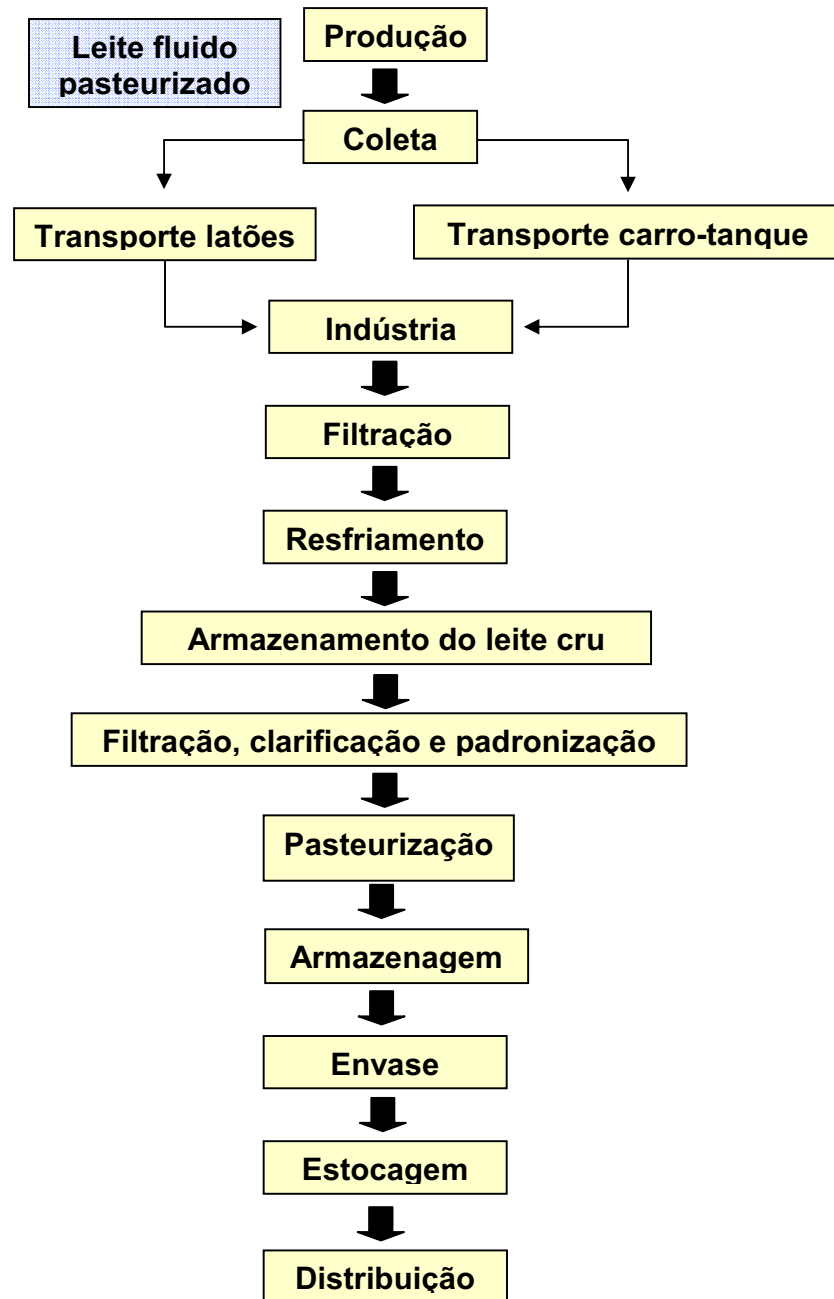


Figura 1: Fluxograma básico do processamento do leite pasteurizado em microusinas de leite.
Fonte: adaptada de HAJDENWURCEL (1998).

Tabela 4: Determinação de pontos críticos de controle na produção de leite pasteurizado.

ETAPA	PERIGO	MEDIDAS PREVENTIVAS	MONITORAMENTO
Produção de leite (PCC)	Antibióticos, pesticidas, micotoxinas (Q), microrganismos patogênicos (B)	Assistência técnica ao produtor, higiene da ordenha e controle de antibióticos no leite, pagamento do leite pela qualidade	Análise de antibióticos e testes microbiológicos
Transporte (PCC)	Multiplicação de bactérias patogênicas (<i>S. aureus</i>)	Manutenção da refrigeração, menor tempo de transporte entre a coleta na fazenda e a indústria, higiene e sanitização adequada dos latões e tanques	Medida da temperatura e tempo, observação visual da proteção contra contaminações, teste de swabs (medição de ATP) nos latões e caminhões-tanque
1° Filtração (PC)	Sujidades e corpos estranhos (F)	Filtros em boas condições, nova filtração em etapa subsequente	
Resfriamento (PC)	Multiplicação de microrganismos patogênicos (B), toxinas (B), acidez (Q)	Manutenção da temperatura igual ou inferior a 4°C	Controlar temperatura
Armazenamento do leite cru (PCC)	Multiplicação de microrganismos patogênicos (<i>S. aureus</i>) (B)	Manutenção da temperatura a 4°C, higiene e sanitização adequada dos tanques	Inspeção visual dos tanques, swabs dos tanques (medição de ATP), controle da temperatura e tempo de estocagem
2° Filtração (PC)	Sujidades e corpos estranhos (F)	Filtros em boas condições	Inspeção visual dos filtros a cada turno
Pasteurização (PCC)	Sobrevivência de microrganismos patogênicos (B)	Manutenção, limpeza e manuseio correto do pasteurizador, situação adequada e funcionamento correto da válvula de desvio de fluxo	Registro contínuo de tempo e temperatura, teste das enzimas fosfatase e peroxidase
Armazenamento (PC)	Recontaminação microbiana (B), multiplicação das bactérias que sobrevivem à pasteurização (B); acidez (Q)	Manutenção da temperatura de refrigeração abaixo de 4°C, higiene e sanitização adequada das tubulações e tanques	
Envasamento (PC)	Recontaminação microbiana (B)	Higiene e sanitização adequada dos operadores, tubulações, máquinas de envase e local, manutenção adequada das máquinas de envase e manutenção da temperatura de refrigeração do leite	
Distribuição (PC)	Multiplicação microbiana (B)	Temperatura de refrigeração adequada e curto tempo de estocagem, higiene no transporte	

B= perigo biológico; F= perigo físico; Q= perigo químico; PCC= ponto crítico de controle; PC= ponto de controle. Os pontos de controle são prevenidos com Boas Práticas de Fabricação (BPF). Tabela: adaptada de HAJDENWURCEL (1998) e TIMM et al. (2006).

2.8 Controle do processo de produção do leite pasteurizado

A análise do leite, seja qual for sua finalidade, sempre abrange os caracteres organolépticos (cor, cheiro, sabor e aspecto), temperatura, lactofiltração e as provas de rotina como densidade a 15°C, acidez Dornic, gordura pelo método de Gerber; extrato seco total e desengordurado, considerando-se como provas complementares a da cocção, da resistência ao álcool ou ao alizarol. As provas consideradas de precisão abrangem a determinação do índice de refração no soro cúprico e a determinação do índice crioscópico. Dada a imprecisão das provas de rotina só poderá ser considerado anormal e, desse modo, descartado do consumo ou considerado fraudado, o leite que se apresente fora do padrão no mínimo em três provas de rotina ou em uma de rotina e uma de precisão (BRASIL, 1952).

De acordo com o RIISPOA, o leite pasteurizado para ser exposto ao consumo como integral, deveria apresentar-se com caracteres organolépticos normais do leite cru, com teor de gordura original (integral), acidez não inferior a 15°D (graus Dornic) nem superior a 20°D, extrato seco desengordurado e extrato seco total não inferior a 8,5% e a 12,2% respectivamente, densidade a 15°C entre 1028 e 1033 g/L, ponto crioscópico a menos 0,55°C e índice refratométrico no soro cúprico a 20°C não inferior a 37° Zeiss (BRASIL, 1952). Entretanto, com a publicação da Instrução Normativa n° 51, em 18 de setembro de 2002, novos critérios de produção, identidade e qualidade do leite pasteurizado foram estabelecidos, trazendo algumas modificações.

De acordo com essas novas normas, o leite pasteurizado passou a ser definido quanto ao teor de gordura como integral, padronizado a 3%, semi-desnatado ou desnatado; com uma faixa de acidez entre 14°D a 18°D, extrato seco desengordurado com mínimo de 8,4%, densidade a 15°C entre 1028 e 1034 g/L, ponto crioscópico a menos 0,512°C e índice refratométrico no soro cúprico a 20°C não inferior a 37° Zeiss. Quanto aos procedimentos específicos para o controle de qualidade da matéria-prima, estabelece, dependendo do tipo de leite (A, B e C), a medição da temperatura do leite cru refrigerado, a contagem padrão em placas, a contagem de células somáticas, a pesquisa de resíduos de antibióticos, de indicadores de fraudes e adulterantes, pesquisa das enzimas fosfatase e peroxidase e os testes da redutase ou de redução do

azul de metileno, além das provas de rotina (acidez titulável, densidade relativa, teor de sólidos totais e desengordurado, teor de gordura), complementares (prova do álcool ou do alizarol) e de precisão (índice crioscópico e índice de refração ao soro cúprico), sendo que a periodicidade de realização dessas análises varia de acordo com o tipo de leite que será beneficiado (BRASIL, 2002).

Só pode ser beneficiado leite considerado normal, proibindo-se o beneficiamento de leite que provenha de propriedade interdita, que revele presença de germes patogênicos, esteja adulterado ou fraudado, revele presença de colostro ou leite de retenção, apresente modificações em suas propriedades organolépticas, inclusive impurezas de qualquer natureza, acidez inferior a 14°D ou superior a 18°D, que na prova de redutase revele contaminação excessiva, com descoramento em tempo inferior a cinco horas para o tipo A, três horas e meia para o tipo B e uma hora e meia para o tipo C e que não coagule pela prova do álcool ou do alizarol (BRASIL, 2002).

Após o controle da qualidade da matéria-prima, deve-se atentar para o controle do processo de beneficiamento do leite, envolvendo monitoramento e medidas preventivas para todos os pontos críticos de controle (PCCs) – em verdade, um único PCC existe em todo o processo, que é a própria pasteurização, capaz de salvaguardar alguma segurança, e pontos de controle (PCs) relacionados ao processo. Os procedimentos de monitoramento devem ser efetuados rapidamente porque se relacionam com o produto em processo e não existe tempo suficiente para a realização de métodos analíticos demorados. Os métodos microbiológicos raramente, ou quase nunca, são utilizados devido ao tempo envolvido nos procedimentos. Por isso, os métodos físicos e químicos são os preferidos, porque podem ser realizados rapidamente e em caráter contínuo, indicando a situação durante o processo (HAJDENWURCEL, 1998).

Na pasteurização, por ser um PCC, devem ser fielmente observados os limites quanto à temperatura e ao tempo de aquecimento, respectivamente de 72° a 75°C por 15 a 20 segundos. Na refrigeração subsequente, a temperatura de saída do leite não deve ser superior a 4°C. Um cuidado especial deve ser dispensado para a correta observação do tempo de sangria do pasteurizador, de forma que a água acumulada no seu interior seja totalmente eliminada, assim como os gráficos de registro das

temperaturas do pasteurizador devem ser rubricados e datados pelo encarregado dos trabalhos. Imediatamente após a pasteurização devem ser realizadas as pesquisas das enzimas peroxidase e fosfatase, para verificar a eficiência do processo, sendo que o leite pasteurizado deve apresentar-se negativo para fosfatase alcalina, positivo para peroxidase e, ainda, ausência de coliformes a 30 – 35°C (menor que 0,3NMP/mL (Número Mais Provável / mL da amostra) (BRASIL, 2002).

Após a pasteurização, os pontos de controle (PCs), tais como armazenamento, empacotamento e distribuição, precisam ser também controlados e monitorados freqüentemente, para garantir a qualidade e segurança do produto. Entretanto, isso dependerá do gerenciamento da indústria, de sua estrutura interna e do número de funcionários capacitados para os procedimentos de monitoramento de cada medida preventiva. A monitoração contínua é sempre preferível, mas quando não for possível é necessário estabelecer uma freqüência de controle para cada ponto crítico de controle e para cada ponto de controle (HAJDENWURCEL, 1998).

Durante o armazenamento do leite pasteurizado, deve ser controlada e monitorada a temperatura do tanque de refrigeração, devendo manter-se em 4°C. Na etapa de empacotamento, quando o processo de envase empregar lactofilme, a máquina deve possuir lâmpada ultravioleta em funcionamento e, antes de iniciar-se a operação, deve-se assegurar de que o sistema de alimentação esteja esgotado. O leite envasado, então, deve ser imediatamente depositado em câmara frigorífica e mantido em temperatura máxima de 4°C. Durante as etapas de distribuição e comercialização é preciso monitorar a temperatura de refrigeração em seu curto tempo de estocagem (BRASIL, 2002).

A responsabilidade pelo controle de qualidade do produto elaborado é exclusiva do estabelecimento beneficiador, mesmo durante a sua distribuição. Sua verificação deverá ser feita periodicamente ou permanentemente, a critério do Serviço de Inspeção Federal, de acordo com procedimentos oficialmente previstos, em função do resultado das Auditorias de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e dos Sistemas de Análise de Perigos e de Pontos Críticos de Controle (APPCC) de cada estabelecimento e segundo a classificação que o estabelecimento vier a ter como conclusão da Auditoria realizada (BRASIL, 2002).

O aspecto sanitário assume um papel decisivo na qualidade e segurança do leite e seus derivados. Sob esse ponto de vista, investigações microbiológicas são imprescindíveis, visto que esses alimentos são perecíveis e vulneráveis. A análise microbiológica de produtos lácteos pode ter várias finalidades, podendo ser conduzida para estimar a quantidade dos microrganismos presentes, para investigar a presença ou ausência de microrganismos indesejáveis e, também, para identificar as diferentes espécies microbianas presentes. Dessa forma, inúmeros métodos laboratoriais podem ser utilizados em cada uma dessas circunstâncias, sendo comum que esses métodos sejam classificados em convencionais e rápidos (FRANCO, 1999; CARVALHO et al., 2002).

A partir da década de 70 surgiu uma série de métodos alternativos de análise microbiológica, visando principalmente reduzir o tempo de análise, aumentar a produtividade do trabalho e serem mais sensíveis e/ou específicos, quando comparados aos métodos convencionais. Métodos rápidos para a avaliação da contaminação microbiológica são cada vez mais necessários nas indústrias de alimentos e, principalmente, na de laticínios onde o leite deve ser rapidamente processado (FRANCO, 1999; BARANCELLI et al., 2004; SAKATE et al., 2004).

Em relação a qualquer método novo, os convencionais apresentam a vantagem de serem utilizados há muito tempo como métodos de rotina, sendo reconhecidos como oficiais. Por outro lado, têm desvantagens, as mais evidentes aquelas relacionadas com o tempo longo para obtenção de resultados, com o volume de trabalho, tempo envolvido na execução e com o custo de vidraria e equipamentos de laboratório necessários (CHAIN & FUNG, 1991; BARANCELLI et al., 2004).

A contagem padrão em placas, ou estimativa de mesófilos aeróbios, é empregada rotineiramente com diversos propósitos, desde o controle da matéria prima até o produto pronto, embora seus resultados, via de regra, só estão disponíveis quando o processo já foi finalizado e, na maioria das vezes, quando o produto já se encontra no mercado (SANT'ANA et al., 2002; SAKATE et al., 2004).

A contagem de microrganismos em placas de Petri é o método convencional mais utilizado para enumeração de microrganismos, em função da precisão de sua estimativa e versatilidade, visto que vários grupos de microrganismos diferentes podem

ser quantificados, variando-se apenas o meio de cultivo ou as condições de incubação. Sua execução é bem simples, consistindo no plaqueamento de alíquotas da amostra, homogeneizada e diluída, em meio de cultura padrão como o *Plate Count Agar* (PCA), com incubação na temperatura e tempo adequados e conseqüente formação de colônias visíveis que podem ser enumeradas (SILVA et al., 1996; TORTORA et al., 2000; SANT'ANA et al., 2002). No entanto, apesar da aparente simplicidade, essa técnica é bastante trabalhosa e podem ocorrer erros quando muitas diluições precisam ser efetuadas e quando o número de amostras é grande. Além disso, algumas partículas de alimentos podem ser confundidas com colônias, levando a um falso resultado positivo, a leitura e interpretação dos resultados podem ser difíceis e subjetivas, variando de acordo com o analista, bem como algumas colônias denominadas invasoras podem se espalhar pela placa dificultando a contagem e a expressão do resultado final. Outra desvantagem é que a alta temperatura do ágar fundido (48°C) pode causar destruição ou injúria de algumas colônias sensíveis ao calor, deixando de ser estimadas (CHAIN & FUNG, 1991; FRANCO, 1999).

Quanto à determinação do número mais provável (NMP) de microrganismos por tubos múltiplos, essa apresenta inconvenientes como a necessidade de grande quantidade de vidraria, a impossibilidade de observação da morfologia das colônias e a falta de precisão, por ser de natureza estatística. Mesmo assim, tem se popularizado por ser relativamente simples, determinar grupos específicos de microrganismos por meio do uso de meios seletivos e ser o método de eleição para determinação do número de coliformes totais e fecais em laticínios. Além de ser trabalhosa, uma análise completa por essa técnica é muito demorada (FRANCO, 1999).

O desenvolvimento tecnológico no setor alimentício, a implantação cada vez mais freqüente dos conceitos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e de Boas Práticas de Fabricação (BPF), além da ampliação dos conhecimentos sobre os microrganismos importantes em alimentos, indicam a necessidade de substituição dos métodos convencionais por métodos alternativos mais modernos (VASAVADA et al., 1993; FRANCO, 1998). Os métodos rápidos também são justificados do ponto de vista de redução de gastos decorrentes de testes de rotina, como nos programas de APPCC. Os novos métodos, apesar de inicialmente terem

custos relativamente mais altos do que os convencionais, podem tornar-se econômicos a longo prazo (VASAVADA et al., 1993).

Em qualquer método microbiológico, destacam a exatidão e a reprodutibilidade como características importantes. Além dessas, a aprovação por órgãos oficiais, a simplicidade de execução e o custo devem ser considerados para sua escolha e implantação. As técnicas que dependem da determinação de constituintes celulares são muito caras, enquanto que os métodos baseados na medida da atividade de desidrogenases, usando um corante como receptor de elétrons, parecem ser mais apropriados e menos dispendiosos. Um exemplo de tais métodos é o teste que utiliza o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), que confere uma medida direta da atividade microbiana e pode ser usado para estimar a atividade e a multiplicação microbiana (GINN et al., 1986; SILVA et al., 1997; MAHMOUD & GHALY, 2004).

O 2, 3, 5 – cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) é um corante muito utilizado para contagem de colônias de microrganismos em meios de cultura sólidos, sendo um componente-chave do sistema de filme seco rehidratável usado para análise microbiológica de alimentos. Esse corante é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido, visto que os microrganismos reduzem o TTC por ação enzimática, originando o formazan, que fica acumulado na forma de grânulos no interior das células, as quais tornam-se vermelhas (BELOTI et al., 1999).

O TTC foi sintetizado por Pechmann & Runge em 1894. Em 1941, Kuhn & Jerchel demonstraram que bactérias, leveduras e plantas são capazes de reduzi-lo. Uma das aplicações do TTC foi verificar a capacidade de germinação de sementes e, desde então, outras aplicações foram relatadas, incluindo o uso de TTC em microbiologia. Nesse caso, observou-se que colônias de diferentes espécies microbianas ou variedades da mesma espécie de microrganismo podem desenvolver diversas tonalidades de vermelho quando plaqueadas em meio com TTC. Quando o TTC é adicionado ao meio, o *Staphylococcus* sp coagulase-positivo forma colônias com um centro de coloração laranja, enquanto que as colônias do *Staphylococcus* sp coagulase-negativo são rosas. Os *Streptococcus cremoris* poderiam ser diferenciados dos *Streptococcus lactis* usando o TTC, já que são capazes de reduzir o corante e os outros não. Similarmente, a *Candida albicans* poderia ser distinguida de outras

leveduras, porque formam colônias rosas em meio com TTC, enquanto que outras colônias de leveduras são brancas (Gunz, 1949; Huddleson & Baltzer, 1950; Gershenfeld & Weber Jr, 1951; Rioux et al., 1960; Turner et al., 1963 apud BELOTI et al., 1999).

Alguns fatores como pH, temperatura, luz e concentração do corante podem interferir na redução do TTC, sendo essa mais intensa em pH elevado e temperaturas mais altas. A concentração do TTC adicionado ao meio de cultura é importante porque altos níveis podem causar efeito deletério. Conseqüentemente, sua concentração deveria ser suficientemente baixa para evitar a inibição da multiplicação microbiana, mas satisfatoriamente alta para possibilitar a redução e, portanto, o desenvolvimento da cor (BELOTI et al., 1999).

Nos sistemas modernos de gerenciamento, qualquer recurso que melhore a eficiência relativa das análises é muito valorizado, visto que os métodos clássicos para detecção, contagem e identificação de microrganismos em alimentos são efetivos, porém laboriosos e lentos para aplicação em programas de controle de qualidade e segurança microbiológica nas indústrias de alimentos. Portanto, é necessário que pesquisas sejam realizadas e possibilitem o desenvolvimento de métodos mais rápidos, simples e eficientes para detecção de microrganismos nos alimentos (BARBALHO, 2002; BARANCELLI et al., 2004).

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho, face ao exposto e considerando as dificuldades estruturais e técnicas de pequenas e médias indústrias processadoras de leite pasteurizado, são:

1) Buscar alternativa(s) metodológica(s) simples, rápida(s) e eficiente(s), que possa(m) ser utilizada(s) objetivamente na indicação da segurança de consumo ou possíveis desvios dessa, em tempo hábil que seja qualificada como controle de processo;

2) Promover possíveis associações de metodologias com as mesmas características, físico-química e microbiológica, que também de modo simples e rápido, melhor possibilitem a constatação da segurança necessária; e,

3) Finalmente, se eficazes e bem sucedidas em relação aos objetivos anteriores, sugerir sua adoção, indistintamente por mini, médias ou grandes empresas que processem leite por pasteurização rápida (HTST), visando o controle de processo, possibilitando maior controle da qualidade do produto oferecido ao consumidor, estimar mais acertadamente o prazo de validade ou vida de prateleira ("shelf-life") para esse tipo de produto e, principalmente, adequar os controles à tendência atual e universal de oferecer garantias quanto à segurança de consumo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Inspeção Sanitária de Alimentos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP, *Campus* de Jaboticabal.

Durante o período de agosto de 2004 até maio de 2006, foram analisadas 261 amostras de leite pasteurizado dos tipos A, B e C de diferentes marcas comerciais, coletadas dentro do prazo de validade, assim que chegavam ao mercado, sendo cinco amostras do tipo A, 103 amostras do tipo B e 153 amostras do tipo C, provenientes do comércio de Jaboticabal – SP e de pequenas e médias indústrias de diversas localidades do Estado de São Paulo.

Quanto à sua origem e fiscalização sanitária industrial, duas eram de estabelecimentos sob Inspeção Municipal (SIM), 93 do Serviço de Inspeção Estadual (SISP) e 166 do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Durante o transporte até o laboratório, as amostras foram mantidas em sua embalagem original e acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo, para evitar a ação do calor sobre o produto. Ao chegarem ao laboratório, a temperatura das caixas era verificada com auxílio de um termômetro.

4.1 Preparo das amostras

Cada amostra foi homogeneizada, por inversão da embalagem plástica durante 25 vezes consecutivas. O local da abertura foi higienizado com algodão embebido em álcool a 70%. Em seguida, as embalagens foram abertas com auxílio de uma tesoura previamente desinfetada e, a partir dessa abertura, foram retiradas as unidades

analíticas para as seguintes análises: prova rápida de redução em tubos, contagem de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis, determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais e pesquisa das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina.

4.2 Prova rápida de redução em tubos para estimar a presença total de microrganismos

A prova rápida em tubos, para estimar a presença total de microrganismos em leite pasteurizado, foi desenvolvida com o objetivo de verificar, de maneira rápida e simples, a qualidade das amostras e, conseqüentemente, auxiliar na estimação da vida de prateleira (“shelf-life”) do produto.

Inicialmente, foram adicionados em cada tubo, 5 mL de meio de cultura estéril, constituído de leite em pó desnatado a 11% suplementado com extrato de carne a 0,5%, peptona a 1% e cloreto de sódio a 0,5%. Em seguida, foram acrescentados 0,1 mL (100 µL) de solução de cloreto de trifeniltetrazólio (Merck – Darmstadt, Alemanha) a 5% aos tubos. Por fim, as amostras de leite foram adicionadas nos volumes de 10 mL, 1 mL e 0,1 mL, em duplicata, seguida de homogeneização por inversão. Os tubos foram incubados a 30°C durante 8 horas e a cada 30 minutos era realizada a leitura da prova.

Para a leitura da prova rápida em tubos, desenvolveu-se um protocolo de interpretação baseado na evolução da coloração observada durante a realização do teste. Dessa forma, os resultados foram diferenciados desde a presença de traços de cor até resultados positivos P(+), P(++) e P(+++). Atribuiu-se o valor de traço aos tubos com ligeira mudança da coloração branca para a rósea. Os tubos com coloração rósea foram classificados como resultado P(+). O resultado P(++) foi atribuído àqueles com coloração intermediária entre rosa e rosa intenso e aqueles com coloração rosa intensa foram classificados como P(+++).

4.3 Pesquisa das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina

As amostras de leite pasteurizado foram submetidas à pesquisa das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina com o objetivo de avaliar a eficiência do tratamento térmico. Para detectar a presença da peroxidase foram colocados 10 mL de leite pasteurizado em um tubo de ensaio e, em seguida, foram adicionados 2 mL de solução alcoólica de guaiacol a 1% e 2 a 3 gotas de água oxigenada 10 Vol. Na presença de peroxidase, forma-se um halo de coloração salmão (BRASIL, 1981).

Para a pesquisa de fosfatase alcalina foi realizado um ensaio colorimétrico para verificar a presença desta enzima, a partir da utilização do kit Fosfatase Alcalina (Labtest Diagnóstica - Lagoa Santa, Brasil).

4.4 Análises microbiológicas

As amostras foram diluídas em tampão fosfato (pH 7,2), antes de iniciar as análises microbiológicas. Para tal, foi retirado 1 mL de cada amostra e transferido para tubos de ensaio contendo 9 mL do diluente esterilizado (10^{-1}). A partir dessa diluição inicial a 10^{-1} foram preparadas diluições decimais até 10^{-3} retirando-se sempre 1 mL da diluição anterior e juntando-o a 9 mL de tampão fosfato esterilizado. Entretanto, dependendo da amostra, também foram feitas diluições sucessivas que variaram de 10^{-4} a 10^{-7} .

4.4.1 Contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios e facultativos viáveis (APHA, 2001)

A partir de três diluições sucessivas obtidas de cada amostra (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ou 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , ou ainda, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}), foram realizadas as contagens em placas empregando a técnica de semeadura em profundidade. Dessa forma, 1 mL de cada diluição da amostra foi transferida para placas de Petri esterilizadas, devidamente

identificadas. A seguir, foi adicionado a cada placa 15 a 17 mL de ágar padrão para contagem (Merck – Darmstadt, Alemanha), previamente fundido e mantido a temperatura de 45°C. Depois, as placas (contendo a amostra e o ágar) foram suavemente homogeneizadas, numa superfície plana, com movimentos circulares suaves, em forma de “8”. Após a solidificação à temperatura ambiente, as placas foram invertidas e incubadas em estufa, a 35°C, por 48±3 horas.

As colônias que cresceram na placa foram contadas com o auxílio de uma lupa no contador de colônias (modelo CP 608, Phoenix – Araraquara, Brasil). A contagem restringiu-se àquelas diluições que apresentaram crescimento no intervalo de no mínimo 25 e no máximo 250 unidades formadoras de colônias (UFC) por placa.

4.4.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais (APHA, 2001)

Para a contagem de coliformes totais, foi transferida para cada tubo 1 mL das amostras nas diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} para séries de três tubos por diluição contendo 7mL de Caldo Bile Verde Brilhante (Biolife – Milano, Itália). Em seguida, os tubos foram homogeneizados e incubados em estufa, a 32°C, por 48 horas. Após o período de incubação, observou-se a produção de gás nos tubos, a partir da fermentação da lactose.

Para verificar o desenvolvimento de coliformes fecais, uma alíquota dos tubos positivos no teste anterior foi inoculada, por meio de uma alça de platina, para séries de três tubos contendo 7 mL de Caldo EC (Merck – Darmstadt, Alemanha) e para tubos contendo 5 mL de Caldo Triptona (Oxoid – Hampshire, Inglaterra).

Por fim, os tubos foram homogeneizados e incubados em banho-maria, a 44,5°C, por 24 horas. Decorrido esse tempo, os tubos contendo Caldo Triptona foram submetidos à prova de produção de Indol adicionando-se 3 a 4 gotas do reativo de Kovacs. Foram considerados positivos, aqueles tubos que apresentaram formação de um anel vermelho escuro, e negativos, aqueles que formaram um anel amarelo. Nos tubos de Caldo EC foram observadas à produção de gás e a turvação do meio.

4.5 Teste confirmatório para a prova rápida de redução em tubos

Essa etapa experimental foi realizada com o objetivo de avaliar a capacidade de redução do indicador cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) pelas bactérias Gram-negativas. Este teste constituiu em duas fases: na primeira fase foram utilizados tubos positivos da diluição 10^0 do NMP para coliforme total e, na segunda fase, foram empregadas cepas de *Escherichia coli* patogênica entero-hemorrágica (sorogrupo O113) e de *Escherichia coli* não patogênica (sorogrupo C600), para representar o grupo dos coliformes fecais. Essas cepas de *E. coli* foram gentilmente cedidas pela Dr^a. Hinig Isa G. Vicente, sob orientação do Prof. Dr. Luíz Augusto do Amaral, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, *Campus* de Jaboticabal.

4.5.1 Primeira fase – Redução em tubos do TTC pelos coliformes totais

Nessa primeira fase, foram utilizados tubos positivos da diluição 10^0 do NMP para coliforme total. A partir dos tubos da diluição 10^0 com produção de gás, foi retirado 1mL de cada tubo e transferido para tubos de ensaio contendo 9 mL do diluente esterilizado (10^{-1}). A partir desta diluição inicial a 10^{-1} foram preparadas diluições decimais até 10^{-4} retirando-se sempre 1 mL da diluição anterior e juntando-o a 9 mL de tampão fosfato esterilizado.

A seguir, 1 mL de cada diluição (10^{-1} a 10^{-4}) do tubo positivo para coliforme total foi inoculado em frasco contendo 100 mL de leite esterilizado. Os frascos foram incubados a temperatura ambiente por 6 horas. Após esse período, as amostras de leite inoculadas foram submetidas as seguintes provas: prova rápida de redução em tubos (descrita no item 3.2) e plaqueamento em profundidade (“pour plate”) em ágar VRB (Ágar Vermelho Violeta Bile, Merck – Darmstadt, Alemanha) segundo BRASIL (2003b).

Para o plaqueamento em ágar VRB, cada amostra de leite inoculada foi submetida a uma seqüência de diluições em tubos contendo 9 mL de tampão fosfato esterilizado. A partir da diluição inicial da amostra (10^{-1}) foram preparadas diluições decimais até 10^{-8} retirando-se sempre 1 mL da diluição anterior e juntando-o a 9 mL de tampão fosfato esterilizado.

Em seguida, 1 mL de cada diluição da amostra foi transferida para placas de Petri esterilizadas, devidamente identificadas. A cada placa foram adicionados 15 a 17 mL de ágar VRB, previamente fundido e mantido a temperatura de 45°C. Depois, as placas (contendo a amostra e o ágar) foram homogeneizadas, numa superfície plana, com movimentos circulares suaves, em forma de “8”. Após a solidificação à temperatura ambiente, as placas foram invertidas e incubadas em estufa, a 35°C, por 24 horas.

Após o período de incubação, as placas foram observadas e apenas aquelas que apresentaram crescimento de colônias típicas de coliformes totais, numa faixa de 25 a 250 UFC por placa, foram contadas com o auxílio de uma lupa no contador de colônias (modelo CP 608, Phoenix – Araraquara, Brasil).

4.5.2 Segunda fase – Redução em tubos do TTC pelos coliformes fecais

Inicialmente, as culturas de ambas as cepas (*E. coli* sorogrupo O113 e *E. coli* sorogrupo C600) foram ativadas em 4 mL de caldo TSB (Caldo Trypticase de Soja, Difco – Franklin Lakes, EUA), a 35°C, durante 12 horas. Após o período de incubação, cada cultura ativada foi diluída em tampão fosfato (pH 7,2). Foi retirado 1 mL de cada cultura e transferido para tubos de ensaio contendo 9 mL do diluente esterilizado (10^{-1}). A partir desta diluição inicial a 10^{-1} foram preparadas diluições decimais até 10^{-4} retirando-se sempre 1 mL da diluição anterior e juntando-o a 9 mL de tampão fosfato esterilizado.

A partir deste ponto, os passos seguem a mesma metodologia da primeira fase tanto para a prova rápida de redução em tubos, quanto para o plaqueamento em profundidade (“pour plate”) em ágar VRB.

Após o período de incubação, as placas foram observadas e apenas aquelas que apresentaram crescimento de colônias típicas de coliformes fecais, numa faixa de 25 a

250 UFC por placa, foram contadas com o auxílio de uma lupa no contador de colônias (modelo CP 608, Phoenix – Araraquara, Brasil).

4.6 Análise Estatística

Utilizou-se o software “Statística 6.0 para Windows”, por meio do qual os dados foram analisados tanto no que se refere aos métodos estatísticos básicos, as correlações de Pearson, bem como a obtenção de sistematização dos gráficos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fase preliminar

Este trabalho foi planejado e desenvolvido a partir de uma associação de fatores relacionados à existência da linha de pesquisa no laboratório e de preocupações quanto à adequação dos controles aos novos requisitos de gerenciamento de processos e segurança de produtos, visto que, para a implantação de planos APPCC, torna-se necessário dispor de métodos capazes de fornecer respostas rápidas, quer nas atividades de monitoramento quer nas de verificação.

Em associação a esses fatores, o desenvolvimento paralelo e parcialmente simultâneo da dissertação de mestrado de SOARES (2004), trabalhando esses mesmos objetivos com a matéria-prima (leite cru), cujos resultados se mostravam promissores, e a existência, na Austrália, de uma metodologia elaborada por CRAVEN et al. (1994) com essas mesmas tendências e preocupações, padronizada e dirigida ao controle de microrganismos psicrotróficos em leite e creme pasteurizados, também forneceram parâmetros que serviram como base para o desenvolvimento deste trabalho, visto que esses autores desenvolveram métodos rápidos nos quais as amostras (leite cru ou leite pasteurizado) eram misturadas com um indicador de desenvolvimento microbiano (TTC) e um inibidor da multiplicação da flora Gram-positiva (Cloreto de Benzalcônio), permitindo assim que somente as bactérias psicrotróficas Gram-negativas se revelassem.

O TTC é um excelente indicador, há muito utilizado em métodos microbiológicos, alguns deles com *status* de métodos oficiais ou alternativos aos oficiais, como o PetrifilmTM, capaz de identificar, com boa precisão, a atividade microbiana e caracterizando sua fase exponencial de desenvolvimento. Considerando esse aspecto,

optou-se, então, por assumir a recíproca inversa em relação ao aumento da população microbiana e à diminuição do tempo necessário à sua redução, iniciando-se uma série de experimentos preliminares com o intuito de definir as condições mais adequadas à padronização de uma metodologia alternativa que fosse rápida, prática e eficiente.

Desse modo, ao invés de, classicamente, seguir a quase totalidade dos métodos microbiológicos existentes e padronizados, os quais utilizam diluições decimais da amostra original partindo geralmente de 1 mL, nesse trabalho, como a preocupação dirigia-se à rapidez da resposta, optou-se pelo aumento proporcional da quantidade inicial da amostra a ser testada. Quanto a esse aspecto, depois de algumas tentativas e pré-testes, definiu-se, à semelhança do método estatístico de NMP e para reforçar e possibilitar as intercorrespondências com os demais métodos existentes, trabalhar com três volumes decimais do inóculo, respectivamente de 10, 1 e 0,1 mL de amostra a ser testada.

Outra definição importante para a rapidez desejada foi a definição de um meio líquido de suporte ao desenvolvimento desses inóculos. Num leite recém-pasteurizado a microbiota remanescente está, de certo modo, prejudicada ou injuriada, demandando tempo para a sua recuperação, reparação fisiológica e início de multiplicação. Em função disso, o melhor, teoricamente, era trabalhar um meio base, sendo o próprio leite a melhor opção, ao qual já estava previamente adaptada, eliminando-se possíveis fatores ou condições desfavoráveis. Entretanto, apenas isso não se traduz em suficiência porque, apesar do leite ser rico em nutrientes, esses não estão prontamente disponíveis para a maioria dos microrganismos. Assim, também em experimentos preliminares, buscou-se enriquecer esse meio à base de leite desnatado com outros possíveis ingredientes, associando substâncias nutritivas que pudessem estimular o desenvolvimento rápido da microbiota remanescente. Essa definição veio com a formulação e padronização do seguinte meio: leite em pó desnatado a 11%, extrato de carne a 0,5%, peptona a 1% e cloreto de sódio a 0,5%, com o qual foram obtidos os melhores resultados.

Em seguida, tentou-se associar ao meio uma solução de glicose a 1%, objetivando verificar se havia um aumento na velocidade de redução do indicador pela microbiota em desenvolvimento nas amostras. Os resultados obtidos com esse pré-

teste mostraram, entretanto, que não houve diferença na velocidade de redução do TTC entre as amostras em meio nutritivo suplementado com glicose a 1% e as amostras que permaneceram somente no meio nutritivo.

Após a padronização do método, elaborou-se um protocolo para leitura dos resultados da prova rápida em tubos, baseado no desenvolvimento de cor resultante da redução do TTC. Como visto anteriormente, o TTC é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido. Assim, a partir da intensidade da coloração das amostras submetidas ao teste, durante um período de incubação de 8 horas, os resultados foram diferenciados desde a presença de traços de cor (leve tonalidade rósea capaz de promover diferença visual com o branco da reação – ou controle) até resultados positivos P(+), P(++) e P(+++). Com isso, caracterizou-se o valor de traço aos tubos com discreta mudança da coloração branca para a rósea, enquanto que os tubos com coloração rósea foram classificados como resultado P(+), aqueles com coloração intermediária entre rosa e rosa intenso foram classificados como P(++) e os tubos com coloração rosa intensa foram classificados como P(+++).

5.2 Comparação de métodos

Partindo dos pressupostos que se tentou padronizar uma metodologia rápida para estimar a presença significativa de microrganismos deletérios em leite recém-pasteurizado; que essa metodologia optou por fazê-lo indiretamente, utilizando o TTC - substrato bastante conhecido e utilizado em microbiologia, capaz de estimar a atividade microbiana, mas cuja precisão está associada à fase de desenvolvimento logarítmico dos microrganismos; para avaliar sua eficiência houve a necessidade de referi-lo a uma metodologia padronizada e oficial, à qual seus resultados pudessem ser comparados, no caso, a contagem padrão em placas de mesófilos. Assim, a Figura 2 sistematiza, na forma de uma relação linear, todos os resultados obtidos na contagem padrão em placas de mesófilos com os tempos de redução do TTC para as mesmas amostras em diferentes diluições (10, 1 e 0,1 mL), para um tempo variando de 0 a 24 horas.

Inicialmente, pela elevada carga de microrganismos e conseqüente rapidez no aparecimento de reações positivas, as leituras foram realizadas com intervalos de 30 minutos para até 12 horas de incubação. Com o desenvolvimento dessa prática, posteriormente, reduziu-se esse período para 8 horas, com leituras intercaladas e espaçadas para o restante do tempo de incubação.

Esses resultados, tanto para a contagem padrão em placas de mesófilos, transformados em log UFC/mL, quanto para o tempo de redução em horas, foram submetidos à análise de correlação linear pelo método de Pearson, a qual ofereceu um coeficiente de correlação $r = -0,85$, representada na Figura 2 pela reta principal, cujo intervalo de confiança a 95% aparece em linhas tracejadas. Esse coeficiente representa a totalidade dos resultados para todos os tempos monitorados, perfazendo um coeficiente de determinação (r^2) da ordem de 72,2%.

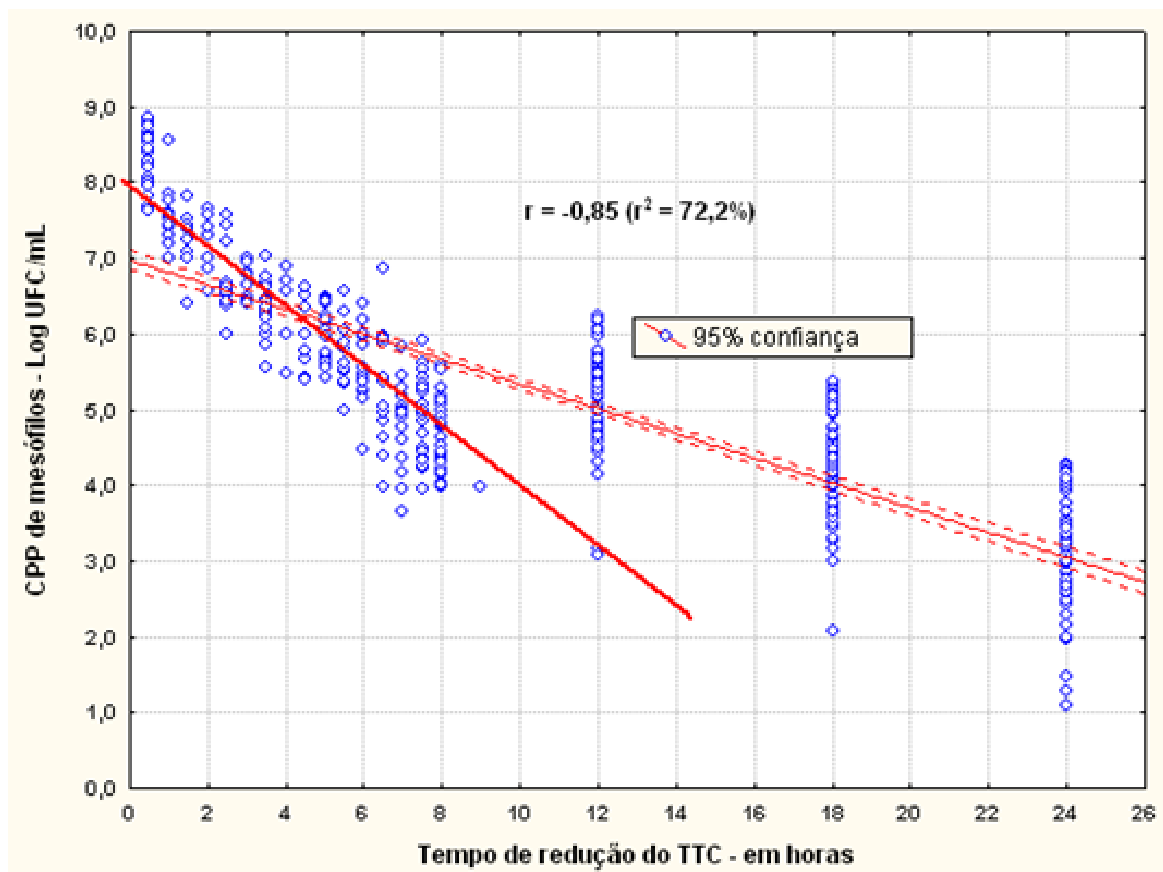


Figura 2. Comparação entre a contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo no leite pasteurizado, em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%.

Se restringirmos essa observação e a análise de dados para um período de apenas 8 horas de incubação, evidencia-se claramente que a resultante dessa correlação agora assume uma outra inclinação, mudando significativamente o valor de “b” na equação ($y = b - a.x$), conforme pode ser comprovado em detalhes na Figura 3. Nesse caso, verifica-se que o valor de r avança para $-0,92$, com r^2 na ordem de $84,6\%$.

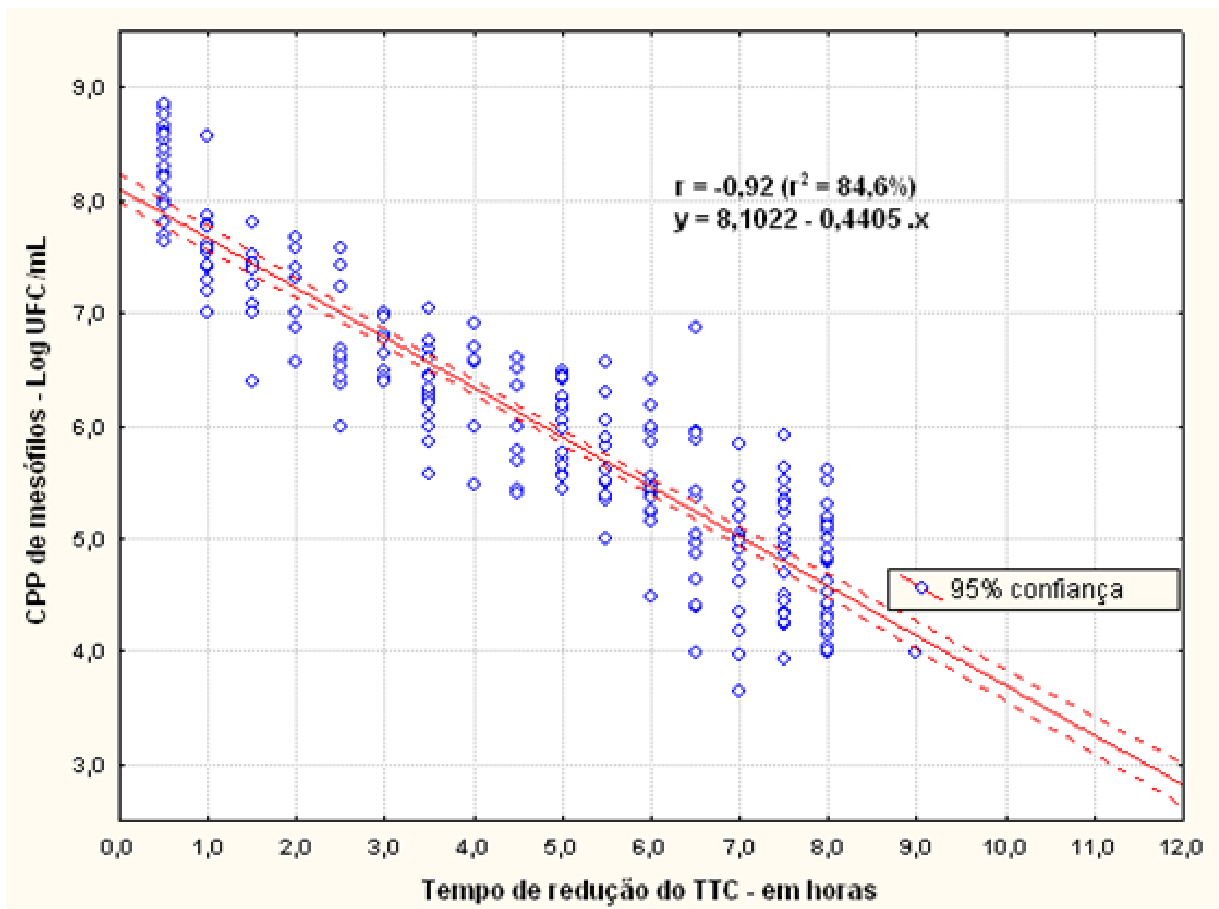


Figura 3. Comparação entre a contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo no leite pasteurizado, em log UFC/mL, e o tempo em até 8 horas necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%.

Ainda com relação à Figura 2, percebe-se, para cada tempo de incubação, uma grande dispersão para os resultados estimados pela contagem padrão em placas de mesófilos. Isso corresponde ao esperado quando se comparam métodos que utilizam princípios tão diferentes entre si, visto que a contagem padrão em placas estima a

habilidade dos microrganismos presentes em formar colônias visíveis em tempo e condições pré-definidas, enquanto que o TTC restringe-se a uma estimativa indireta por meio da capacidade desses microrganismos em reduzi-lo em um determinado período de tempo. Outrossim, da mesma forma que essas diferenças foram resumidas para a contagem padrão em placas, deve-se considerar que nem todos os microrganismos são capazes de reduzir o TTC, embora a maioria o faça, assim como esses microrganismos não o fazem com a mesma capacidade ou rapidez, havendo ainda as condições inerentes à realização da prova (meio nutritivo, tempo e temperatura) agindo diferentemente sobre diversas espécies bacterianas. Isso pode ser comprovado pelo coeficiente de determinação estimado na Figura 3, pelo qual se verifica que aproximadamente 85% das amostras testadas perfazem a correlação determinada, enquanto que cerca de 15% não o fazem, ao menos com a mesma precisão.

De acordo com BELOTI et al. (1999), analisando leite pasteurizado, encontraram diferença na contagem padrão em placas comparada ao Petrifilm[®] AC que consiste em um sistema-filme seco reidratável revestido internamente pelo corante indicador TTC, sendo neste, na maioria das vezes, menores as contagens. Tais autores atribuem ao fato de que, no Brasil, o leite pasteurizado apresenta grande quantidade de flora Gram positiva não redutora ou pouco redutora do indicador TTC. Além disso, afirmam que esse fenômeno parece ser restrito ao leite pasteurizado produzido em certas regiões do país e é decorrente de micrococcos, corineformes e alguns bacilos Gram positivos remanescentes no leite pasteurizado, e, portanto, não detectados quando são utilizados métodos laboratoriais baseados na formação de colônias vermelhas. Por outro lado, alguns fatores como pH, temperatura, luz e concentração do TTC podem também interferir na sua redução pelos diferentes grupos de microrganismos.

De outro modo, essas relações podem ser aprimoradas pela análise da Figura 4 que, ao invés de privilegiar uma relação linear entre as variáveis, elege a escala logarítmica (exponencial) para caracterizar o ponto de inflexão da curva em função da capacidade de multiplicação do número de microrganismos na amostra e, conseqüentemente, exibir resultados positivos num determinado período de tempo de incubação. Observa-se que essa inflexão ocorre aproximadamente em torno de 8 horas de incubação do método rápido nas condições em que foi realizado, mas

principalmente, determina o limite de detecção do mesmo, fixando-o na ordem de 10^4 UFC/mL. Isso, não só confere utilidade à metodologia como também a situa nos limites de qualidade ora aceitáveis para os diferentes tipos de leite pasteurizado. Essa análise foi importante para fixar o tempo máximo de leitura da prova em 8 horas, casando a abreviação do tempo com o limite de detecção, conforme anteriormente mencionado. Isso possibilita, agora, que o método possa ser utilizado dentro da tendência gerencial do APPCC, no controle desse importante ponto crítico para a segurança do produto. Trata-se simplesmente de ajustar as condições do processamento de pasteurização com a logística da distribuição do produto ao mercado.

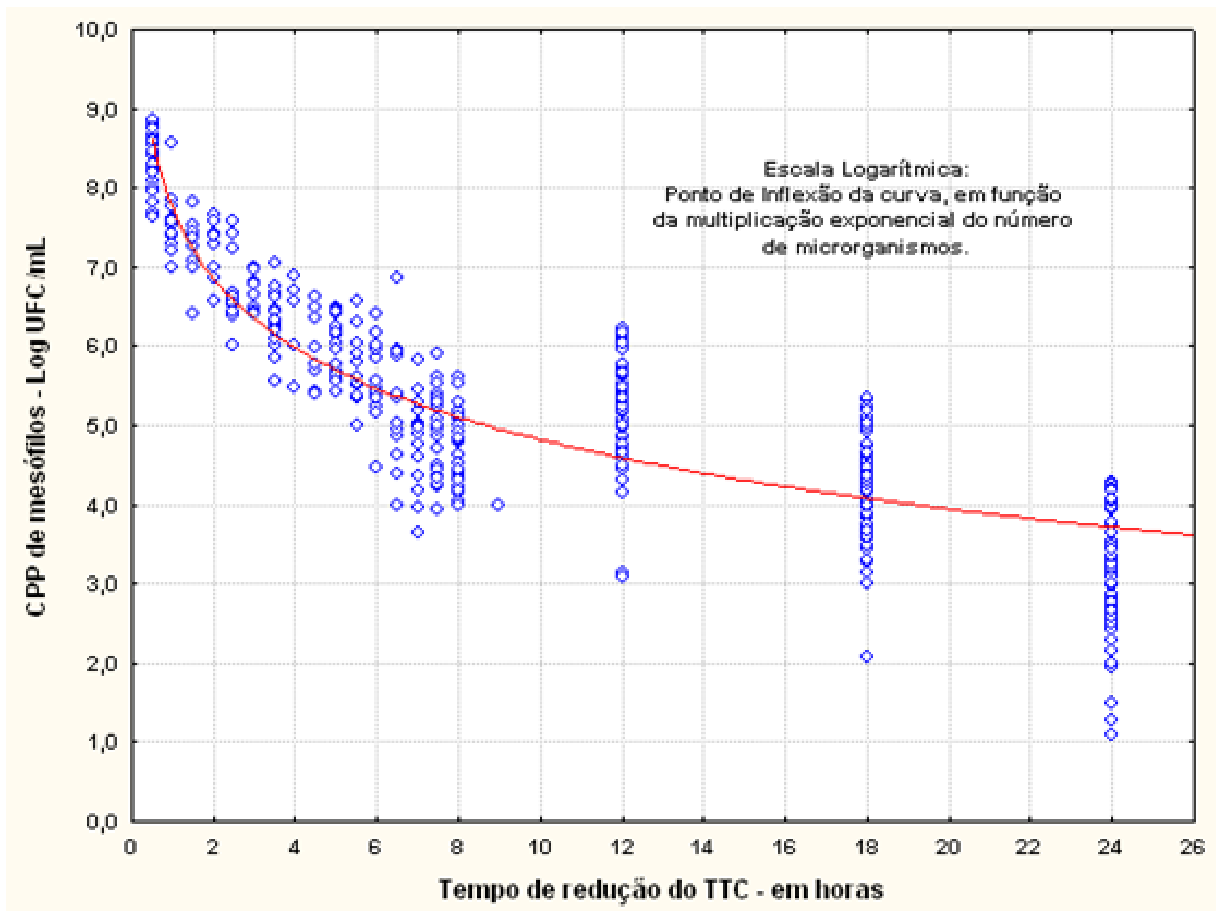


Figura 4. Comparação entre a contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo no leite pasteurizado, em log UFC/mL, em função da multiplicação exponencial do número de microrganismos, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%.

Considerando que a variabilidade natural em cada tempo de leitura se faça seguindo uma distribuição normal, os dados foram inicialmente correlacionados conforme demonstrado na Figura 2. Assumindo a linearidade, esses dados poderiam, também, ser analisados e interpretados a partir de valores que caracterizassem uma tendência central, como a média aritmética, conforme demonstrado na Figura 5. Nessa, verifica-se mais facilmente, ponto a ponto, a intercorrespondência entre os valores médios da contagem padrão em placas de mesófilos com os respectivos tempos de redução do TTC. Nesse caso, o coeficiente de correlação avança para $-0,988$, com um $r^2 = 97,6\%$.

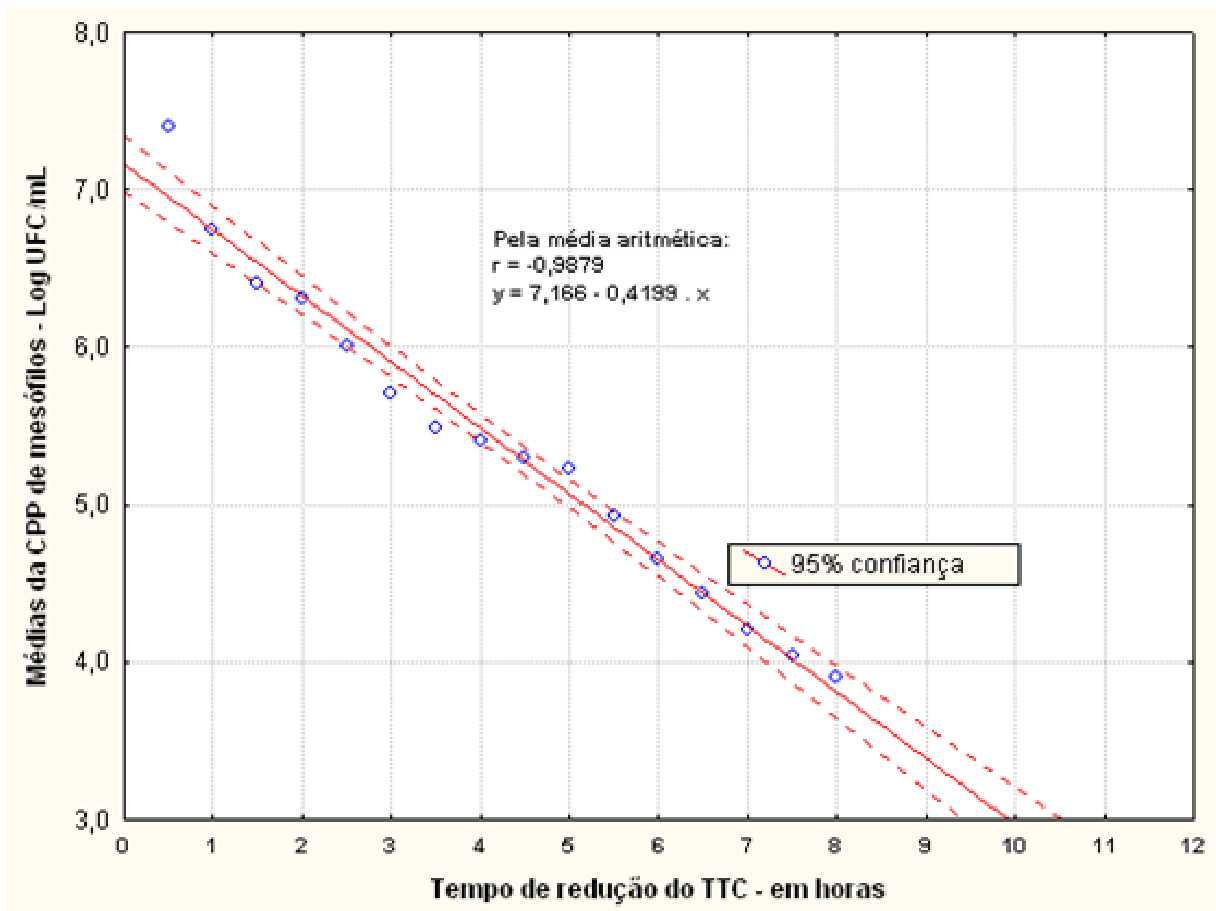


Figura 5. Relação entre a média aritmética da contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo, em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%.

Entretanto, sabe-se que a linearidade pretendida na fase exponencial do desenvolvimento microbiano é apenas aproximada, uma vez que a curva total caracteriza uma sigmóide, com dois claros pontos de inflexão. A região dessa suposta linearidade situa-se entre esses dois pontos, fazendo com que as medidas que privilegiam relações lineares não sejam as mais adequadas ou de maior precisão. Em consequência disso, os mesmos dados foram submetidos a uma correlação utilizando-se da média geométrica, conforme se verifica na Figura 6. Nesta, observa-se que o coeficiente permanece na mesma ordem de grandeza, ou seja, $r = -0,984$, confirmando as relações e interpretações previamente apresentadas.

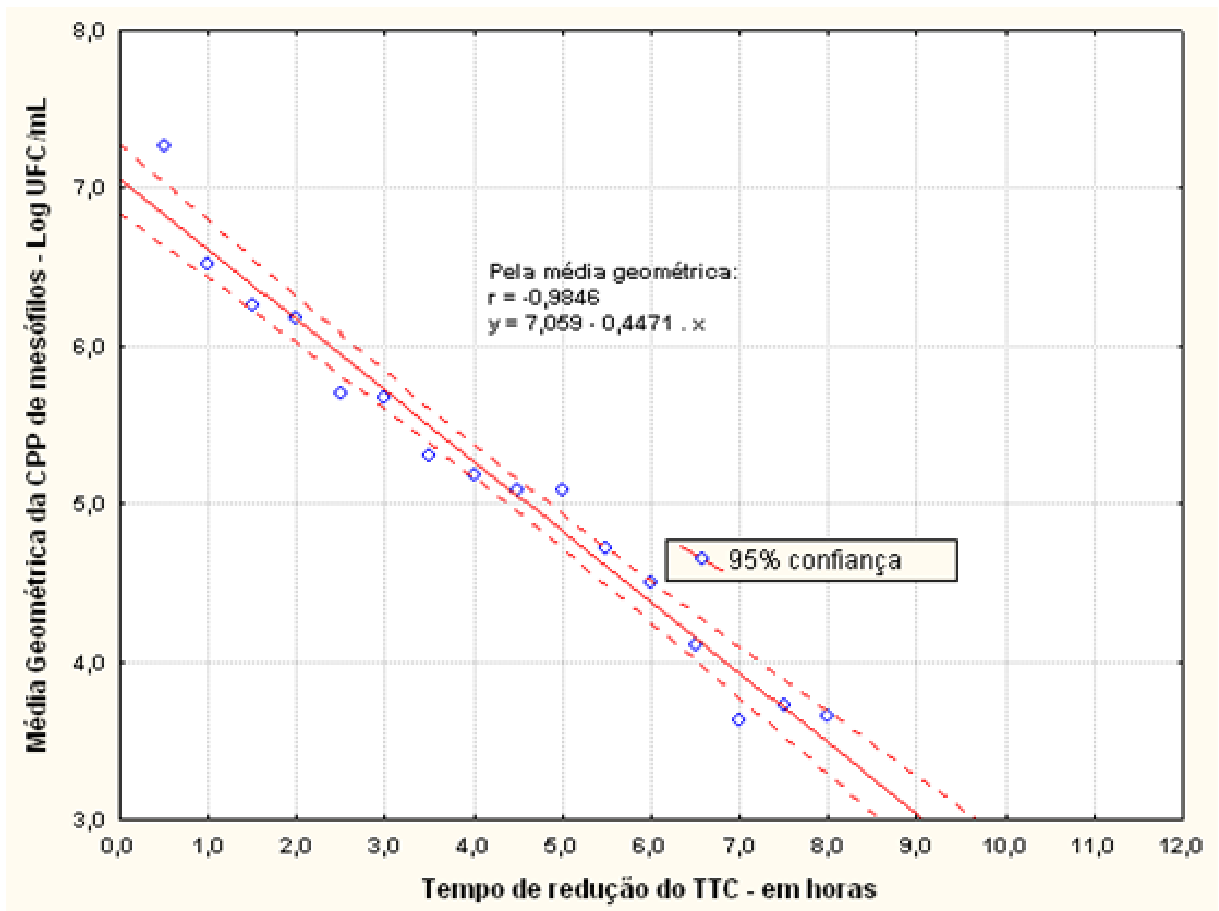


Figura 6. Relação entre a média geométrica da contagem padrão em placas de microrganismo mesófilo, em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%.

Como a avaliação da qualidade do leite recém-pasteurizado não se define somente pela contagem padrão em placas de mesófilos, mas também pela verificação da presença de coliformes totais e fecais, que utilizam técnicas de NMP em tubos múltiplos, optou-se, em seguida, verificar comparativamente o desempenho da metodologia em estudo especificamente para esse grupo de microrganismos, ao quais, pela presença e quantidade no produto, são considerados indicadores da qualidade higiênica. No caso do leite recém-pasteurizado, a presença de coliformes totais e / ou de fecais é um indicativo de tratamento térmico inadequado ou de contaminação subsequente ao tratamento, visto que esses microrganismos são sensíveis à pasteurização e, conseqüentemente, devem ser destruídos.

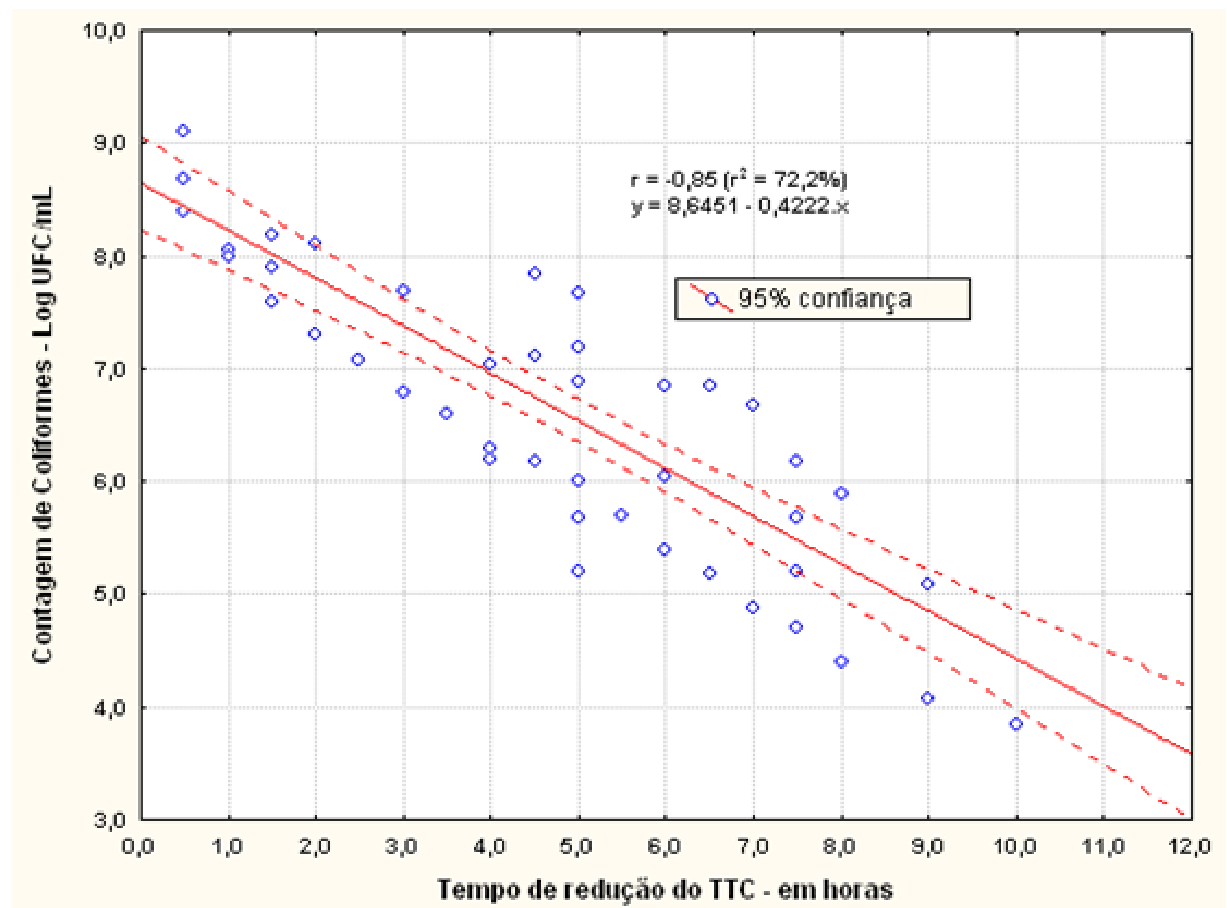


Figura 7. Comparação entre a contagem de coliformes (total e fecal), em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%.

Nesta etapa do trabalho, também foi desenvolvido um protocolo para possibilitar as comparações entre os métodos microbiológicos – a prova do NMP para coliformes totais e fecais com a prova rápida de redução em tubos. Assim, na Figura 7, estão distribuídos todos os resultados obtidos na contagem de coliformes, em log UFC/mL, em relação ao tempo de redução do TTC num período de 12 horas. Esses resultados também foram submetidos à análise de correlação linear pelo método de Pearson, demonstrando um coeficiente de correlação muito satisfatório ($r = -0,85$), com um coeficiente de determinação em torno de 72,2%, sugerindo que a prova rápida de redução em tubos também pode ser empregada para verificar a presença de coliformes em leite recém-pasteurizado, de maneira mais rápida do que a prova do NMP, a qual necessita de 24 a 48 horas para revelar a presença desses microrganismos no produto.

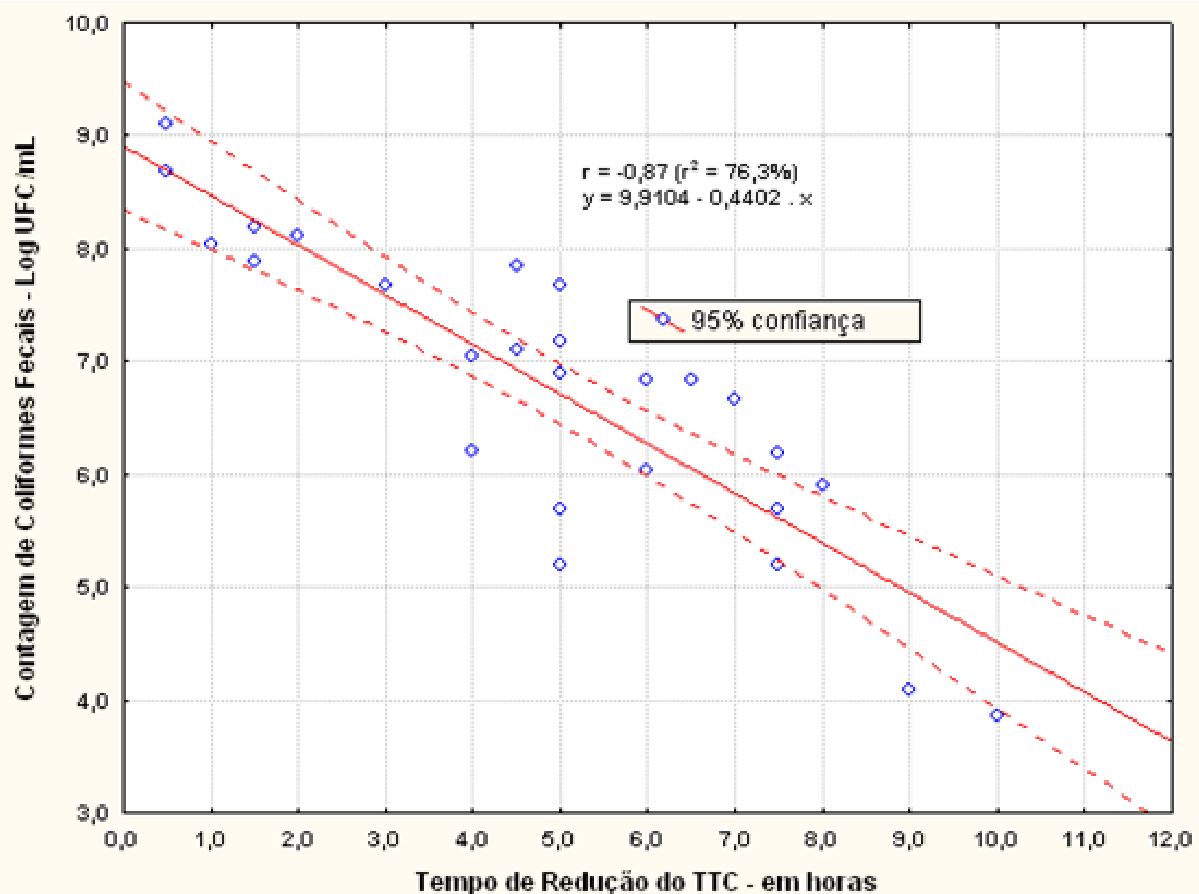


Figura 8. Comparação entre a contagem de coliforme fecal (cepas *Escherichia coli* patogênica entero-hemorrágica e de *Escherichia coli* não patogênica), em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%.

O mesmo raciocínio pode ser realizado para a Figura 8, embora nela estejam sistematizadas, também na forma de uma relação linear, todos os resultados obtidos na contagem de coliformes fecais (cepas de *Escherichia coli* patogênica entero-hemorrágica e de *Escherichia coli* não patogênica), em log UFC/mL, com os tempos de redução do TTC num período de 12 horas, apresentando um alto grau de correlação entre os dois métodos ($r = -0,87$), com um coeficiente de determinação de 76,3%.

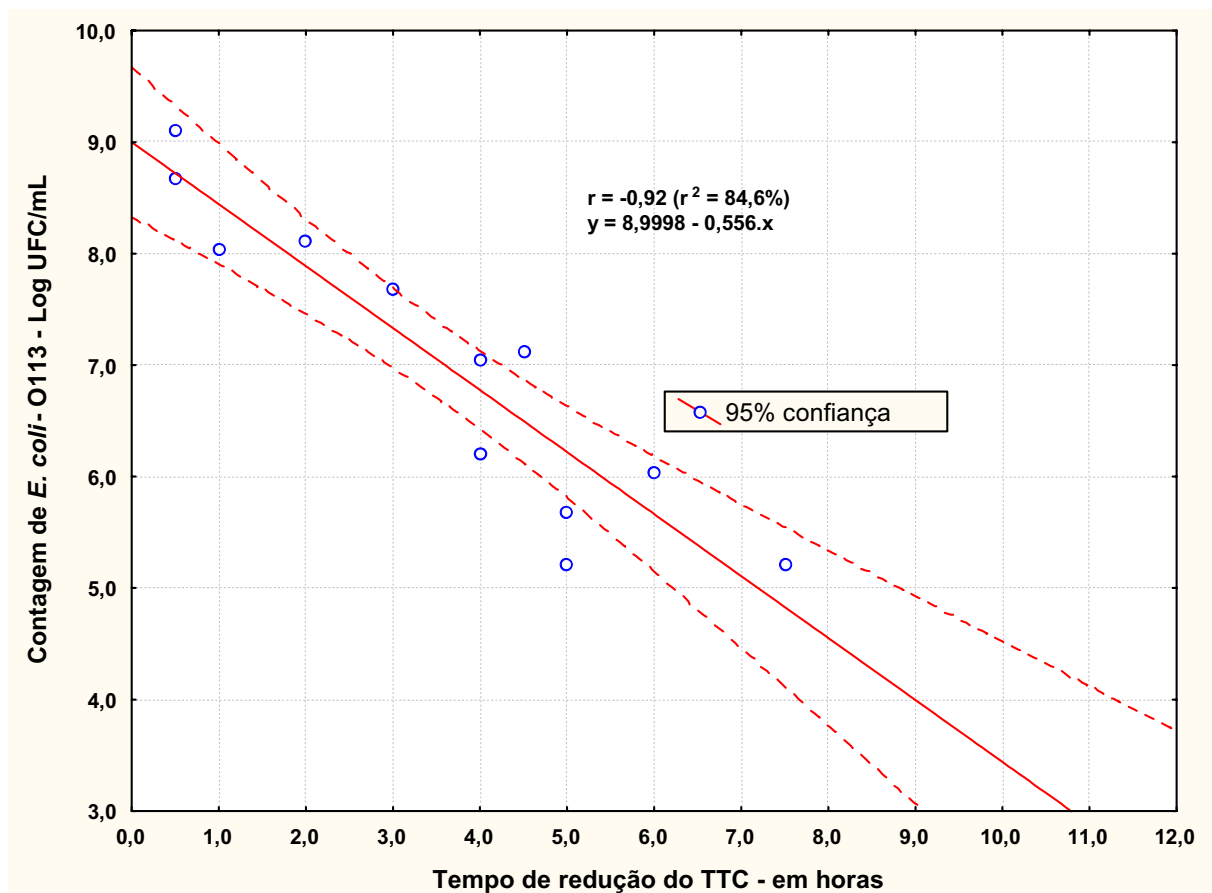


Figura 9. Comparação entre a contagem de *Escherichia coli* patogênica entero-hemorrágica, em log UFC/mL, e o tempo (em horas) necessário para o aparecimento de redução na prova realizada em tubos, a 30°C, usando TTC a 5%.

Ao limitar-se essa observação para a contagem da cepa patogênica de *Escherichia coli* entero-hemorrágica sorogrupo O113 em relação ao tempo de redução do TTC, verifica-se que o coeficiente de correlação salta para $r = -0,92$, com aproximadamente 84,6% das amostras testadas perfazendo uma alta correlação

determinada entre a contagem e o tempo de redução do TTC, embora 14,6% não o façam em função da habilidade de reduzir ou não o TTC (Figura 9). Desta forma, a prova rápida de redução em tubos também poderá ser utilizada para monitorar, em menor tempo, a qualidade do leite recém-pasteurizado em relação à presença de microrganismos do grupo coliformes que, por sua vez, também apresenta uma variedade de espécies com capacidades diferentes de reduzir o TTC.

5.3 Avaliação da qualidade dos leites pasteurizados pelo método rápido de redução do TTC

As 261 amostras de leite pasteurizado, sendo cinco delas do tipo A (1,9%), 103 do tipo B (39,5%) e 153 do tipo C (58,6%), foram submetidas à prova rápida de redução em tubos, realizando-se a leitura a cada 30 minutos até completar um período de 8 horas (ponto de corte), durante o qual se observou o desenvolvimento da coloração a partir da redução do TTC, como pode ser visto na Figura 10.



Figura 10: Amostras de leite pasteurizado, submetidas à prova rápida de redução em tubos, apresentando desenvolvimento da coloração a partir da redução do TTC.

Os resultados da Tabela 5 mostram que 101 amostras (38,7%) apresentaram redução do TTC em até 8 horas, enquanto que outras 160 amostras (61,3%) evidenciaram redução do TTC num tempo superior a esse tempo ou mesmo, em alguns poucos casos, não apresentaram redução.

Tabela 5: Total de amostras de leite pasteurizado dos tipos A, B e C que reduziram o TTC, considerando 8 horas de leitura como o ponto de corte.

Tempo de redução do TTC	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Total
Até 8 h	02	46	53	101
> 8 h	03	57	100	160
Total	05	103	153	261

De acordo com os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite dos tipos A, B e C, estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, os padrões microbiológicos para contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos, para número mais provável (NMP) de coliformes totais e NMP de coliformes fecais, após a pasteurização, são, respectivamente, de 500 UFC/mL e ausência de coliformes totais e fecais (A); de 40.000 UFC/mL, 2 coliformes totais / mL e 1 coliforme fecal / mL (B) e de 150.000 UFC/mL, 2 coliformes totais / mL e 1 coliforme fecal / mL (C).

Assim, como base nos padrões regulamentares, os resultados das 261 amostras analisadas, obtidos com a contagem padrão em placas de mesófilos foram comparados em relação ao tempo de redução do TTC, buscando-se a possível equiparação ou equivalência de resposta, seja para a definição da qualidade ou da segurança do produto, caracterizando a concordância entre amostras que estavam “dentro do padrão” ou “fora do padrão”, mas que reduziram o TTC em até 8 horas, assim como àquelas que, para as mesmas situações, somente reduziram o TTC em tempo superior a 8 horas, como se pode observar na Tabela 6. Um total de 84 amostras (32,2%) mostrou-

se fora dos padrões regulamentares para os limites da contagem padrão em placas de mesófilos, dentre as quais 70 amostras (83,3%) também apresentaram redução do TTC em até 8 horas. Dessas 84, as 14 que não apresentaram redução do TTC em até 8h evidenciavam baixas estimativas, a maioria em torno de 10^4 UFC/mL, mas suficientes para desclassificá-las em função das grandes diferenças entre os tipos de leite. Além disso, pode-se atribuir também a baixa capacidade de certos grupos de microrganismos de reduzir o TTC, a exemplo dos cocos ou bacilos Gram positivos, que poderiam estar presentes nessas amostras. As demais 177 amostras (67,8%) mostraram-se dentro dos padrões regulamentares para a CPP, embora 31 dessas amostras (17,5%) tenham reduzido o TTC em até 8 horas. Aqui, de modo semelhante, a quase totalidade dos casos deveu-se a leite pasteurizado tipo C com estimativas mais elevadas, próximas ao limite (150.000) sem, contudo, ultrapassá-lo.

Tabela 6: Relação entre o tempo de redução do TTC com a contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis das amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C, considerando os padrões estabelecidos pela Instrução Normativa n° 51.

Tempo de redução do TTC	Tipo A		Tipo B		Tipo C		Total	
	DP [#]	FP [*]	DP	FP	DP	FP	DP	FP
Até 8 h	0	02	09	37	22	31	31	70
> 8 h	02	01	51	06	93	07	146	14
Total	02	03	60	43	115	38	177	84

[#] DP = Dentro do padrão, ^{*} FP = Fora do padrão

Todavia, a qualidade não se define apenas pela CPP. Assim, na Tabela 7 estão associados os resultados obtidos na contagem padrão em placas de mesófilos com a determinação do número mais provável (NMP) de coliformes (total e de fecais), classificando as amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C em “dentro do padrão” e “fora do padrão”, também com base nos limites microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa n°51 e relacionadas ao tempo de redução do TTC. Das 261

amostras analisadas, 134 amostras (51,3%) foram consideradas dentro dos padrões regulamentares para ambos os métodos oficiais, embora oito dessas amostras, tenham reduzido o TTC em até 8 horas. Dentre as 127 amostras (48,7%) que foram consideradas fora dos padrões, 93 (73,2%) promoveram a redução do TTC em até 8 horas de leitura.

Quanto ao tipo de leite pasteurizado, observou-se que, entre as amostras de leite tipo A, duas amostras (40%) estavam dentro dos padrões regulamentares pela contagem padrão em placas e pelo NMP de coliformes, enquanto que três amostras (60%) estavam fora dos padrões, embora o número de amostras seja pequeno. Quanto ao leite tipo B, 46 amostras (44,7%) estavam dentro dos padrões regulamentares e 57 amostras (55,3%) estavam fora dos padrões, lembrando que, tanto para o leite tipo A quanto para o leite tipo B, os padrões microbiológicos são mais restritos. Já, para o leite tipo C, 86 amostras (56,2%) estavam dentro dos padrões regulamentares, enquanto que 67 amostras (43,8%) mostraram-se fora dos padrões.

Tabela 7: Relação entre o tempo de redução do TTC com os resultados da contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis associados à contagem de coliformes pelo NMP, das amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C, considerando-as como dentro e fora dos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa n° 51.

Tempo de redução do TTC	Tipo A		Tipo B		Tipo C		Total	
	DP [#]	FP [*]	DP	FP	DP	FP	DP	FP
Até 8 h	0	02	03	43	05	48	08	93
> 8 h	02	01	43	14	81	19	126	34
Total	02	03	46	57	86	67	134	127

[#] DP = Dentro do padrão, ^{*} FP = Fora do padrão

5.4 Redução do TTC em relação às enzimas peroxidase e fosfatase alcalina

Todas as amostras foram avaliadas quanto à presença das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina. Das 261 amostras, apenas uma amostra apresentou fosfatase alcalina positiva, sendo que, provavelmente, houve um tratamento térmico inadequado por não atingir a temperatura necessária à correta pasteurização do leite.

A presença da peroxidase no leite pasteurizado foi determinada qualitativamente e, com base na intensidade do halo de coloração salmão, foi arbitrária e subjetivamente classificada em Positiva (P+, P++ e P+++) ou Negativa. Do total de 261 amostras analisadas, 56 amostras (21,4%) apresentaram resultado classificado como P+, significando que, possivelmente, a pasteurização foi realizada de maneira adequada, respeitando-se o binômio tempo-temperatura. Nesse caso, as amostras que não estavam de acordo com os padrões microbiológicos exigidos para coliformes e para contagem padrão em placas de mesófilos sugerem, provavelmente, a ocorrência de contaminações subseqüentes à pasteurização (recontaminações). Para os resultados P++ e P+++ da prova da peroxidase, em 121 (46,4%) e 73 (28%) amostras respectivamente, verificou-se que houve um aumento gradativo do número de amostras que estavam fora dos padrões regulamentares, provavelmente devido a uma diminuição do controle térmico, não atingindo corretamente o binômio tempo-temperatura necessário à eficiência da pasteurização. Complementando, outras oito amostras (3,1%) apresentam apenas traços de reação à peroxidase e três amostras (1,1%) não indicaram a sua presença, sendo ambas essas situações relacionadas à inativação da peroxidase causada por tratamento térmico com temperaturas superiores a 80°C, deixando claro que as amostras fora dos padrões regulamentares foram causadas por recontaminações após o processamento.

A Tabela 8 mostra a comparação realizada entre os resultados da prova da peroxidase com os de tempo de redução do TTC. Do total, ocorreu um maior número de amostras que apresentaram resultado de peroxidase P++ e P+++. Em relação às 121 amostras que tiveram peroxidase P++, 50 delas (41,3%) reduziram o TTC em até 8 horas, assim como, das 73 amostras que apresentaram peroxidase P+++, 33 (45,2%) também reduziram o TTC em até 8 horas.

Tabela 8: Relação entre os resultados da prova da peroxidase com os do tempo de redução do TTC.

Tempo de leitura	Traços	Positiva			Negativa	Total
		(+)	(++)	(+++)		
Até 8 h	02	15	50	33	01	101
> 8 h	06	41	71	40	02	160
Total	08	56	121	73	03	261
	(3,1%)	(21,4%)	(46,4%)	(28%)	(1,1%)	(100%)

Em relação às três amostras que foram negativas para a prova da peroxidase, uma estava dentro dos padrões, enquanto que outras duas estavam fora dos padrões tanto para a presença de coliformes quanto para a contagem padrão em placas de mesófilos. Das oito amostras que apresentaram traços de peroxidase, quatro estavam dentro dos padrões, duas estavam fora dos padrões para coliformes e as outras duas estavam fora dos padrões tanto para a presença de coliformes quanto para contagem padrão em placas. Dentre as 56 amostras que foram positivas (P+) para peroxidase, 35 (62,5%) estavam dentro dos padrões regulamentares e 21 (37,5%) estavam fora dos padrões, sendo três amostras fora dos padrões pela contagem padrão em placas, 11 pela presença de coliformes e sete tanto pela contagem padrão em placas quanto pela presença de coliformes. Para as 121 amostras que foram positivas (P++), 59 (48,8%) estavam dentro dos padrões regulamentares, enquanto que 62 (51,2%) estavam fora dos padrões, sendo 13 amostras pela contagem padrão em placas, 20 pela presença de coliformes e 29 tanto pela contagem padrão em placas quanto pela presença de coliformes. Finalmente, das 73 amostras que foram positivas (P+++), 35 (48%) estavam dentro dos padrões regulamentares, enquanto que 38 amostras (52%) estavam fora, sendo cinco pela contagem padrão em placas, oito pela presença de coliformes e 25 tanto pela contagem padrão em placas quanto pela presença de coliformes.

5.5 Qualidade do leite pasteurizado por área de competência dos Serviços de Inspeção

De acordo com a Tabela 9, observa-se que o maior número de amostras que se encontram fora dos padrões microbiológicos são fiscalizadas por Serviços de Inspeção Municipal (SIM) e pelo Serviço de Inspeção Estadual (SISP). Essas indústrias, que estão sob a fiscalização do SIM e do SISP, normalmente, são de pequeno e médio porte que, na maioria, apresentam muitos problemas relacionados à falta de adequação estrutural, precárias condições de conservação e funcionamento de equipamentos, assim como apresentam deficiência de corpo-técnico qualificado. Conseqüentemente, acabam fornecendo seus produtos sem um controle efetivo da segurança e da qualidade. No entanto, muito embora seja conhecido o fato de que quanto mais efetiva for a atuação dos Serviços de Inspeção (Federal, Estadual ou Municipal), melhor será a qualidade do leite pasteurizado distribuído ao consumo, os achados do trabalho de NADER FILHO et al. (1997) parecem sugerir que a maior ou menor ocorrência de amostras fora dos padrões legais tanto para contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos quanto para às pesquisas de coliformes totais e de fecais, independente do tipo de leite considerado, talvez esteja mais relacionada com a “competência” de cada estabelecimento industrial, do que com a atividade desenvolvida pelo Serviço de Inspeção ao qual está subordinado.

Tabela 9: Total de amostras dentro e fora dos padrões de acordo com o tipo de fiscalização sanitária que as controla (SIM, SISP e SIF).

Inspeção	DP[#]	FP[*]	Total
SIM	0 (0%)	02 (100%)	02
SISP	18 (19,3%)	75 (80,7%)	93
SIF	116 (68,9%)	50 (30,1%)	166
Total	134 (51,3%)	127 (48,7%)	261

[#] DP = Dentro do padrão, ^{*} FP = Fora do padrão

5.6 Avaliação da metodologia padronizada na eficiência dos controles

A partir de todos os resultados obtidos com a prova rápida de redução em tubos, com a sua comparação em relação aos métodos oficiais de controle (CPP e NMP de coliformes), pode-se realizar a avaliação acerca da existência ou não de atributos do método rápido proposto quanto aos propósitos pretendidos neste trabalho, ou seja, aliar as qualidades de rapidez, simplicidade e eficiência para determinar a qualidade e definir a segurança do leite pasteurizado, com a confiabilidade e precisão necessárias e, portanto, o grau de confiança que se pode ter na utilização deste teste.

Antes de tudo, é preciso considerar quatro possibilidades, como se pode verificar pelos dados expostos na Tabela 10: o total de amostras que reduziram o TTC em até 8 horas quando essas estavam realmente fora dos padrões (verdadeiros positivos), as amostras que reduziram o TTC em até 8 horas estando dentro dos padrões (falso positivos), as amostras que não reduziram o TTC entre 8 e 24 horas quando estavam fora dos padrões (falso negativos) e as amostras que não reduziram o TTC entre 8 e 24 horas quando estavam dentro dos padrões (verdadeiros negativos).

Tabela 10: Interpretação prática do método da prova rápida de redução em tubos.

		Padrões microbiológicos		Total
		DP	FP	
Tempo de redução do TTC	Até 8 h	08 (FP)	93 (VP)	101
	> 8 h	126 (VN)	34 (FN)	160
Total		134	127	261

DP = Dentro do padrão, FP = Fora do padrão, FP = falso positivo, VP = verdadeiro positivo, VN = verdadeiro negativo, FN = falso negativo

A partir dos dados da Tabela 10 é possível calcular as propriedades do método da prova rápida de redução em tubos que são a sensibilidade (S), a especificidade (E),

a probabilidade e a acurácia (A ou CGT - coeficiente geral) do teste. A sensibilidade é a proporção de amostras que reduziram o TTC em até 8 horas entre todas aquelas que estavam fora dos padrões regulamentares, obtendo-se nessa avaliação, o valor 72,2%. A especificidade é a proporção de amostras que não reduziram o TTC entre 8 e 24 horas em relação às aquelas que estavam dentro dos padrões regulamentares, chegando-se a uma especificidade de 94,0%. A probabilidade do teste estar correto é quando a proporção de amostras que estão fora dos padrões consegue ser detectada pelo teste entre todas as amostras analisadas. Assim, a probabilidade do teste foi de 48,7%. A acurácia ou coeficiente geral do teste expressa a proporção de acertos do teste, ou seja, é a proporção de amostras verdadeiramente positivas e negativas em relação a todos os resultados possíveis, mostrando que a prova rápida de redução em tubos apresentou uma acurácia de 83,9%.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, ao serem calculadas as propriedades da prova rápida de redução em tubos, pôde-se revelar com maior precisão o grau de confiança para utilização desta técnica. Entretanto, é preciso compará-la às propriedades das técnicas de contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos e de contagem de coliformes pela determinação do NMP para melhor justificar a sua possível adesão pelas indústrias de laticínios. Sabe-se que, até então, a contagem padrão em placas e a contagem de coliformes pelo NMP são os métodos microbiológicos oficiais de referência, empregados nas indústrias, para avaliar a qualidade do leite pasteurizado, embora estes métodos fujam dos objetivos do sistema APPCC, já que só controlam o produto elaborado e não aqueles que estão na linha de processamento.

A partir dos dados da Tabela 11, verifica-se que a prova rápida de redução em tubos apresenta maior sensibilidade, maior especificidade, maior probabilidade de acerto e maior precisão (acurácia) em relação aos métodos oficiais, deixando claro que a prova rápida de redução em tubos poderá substituir as duas técnicas com maior rapidez e confiança para controlar a qualidade do leite pasteurizado logo após o seu processamento. Além disso, pode-se observar que a contagem padrão em placas, por si só, não representa um melhor método para avaliar a qualidade do leite. O mesmo raciocínio serve para a contagem de coliformes pelo NMP. As duas técnicas só são

realmente válidas para análise microbiológica do leite pasteurizado elaborado quando ambas são realizadas em conjunto.

Tabela 11: Comparação entre as propriedades dos testes – contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos viáveis, contagem de coliformes pelo NMP e prova rápida de redução em tubos.

Metodologia	Sensibilidade	Especificidade	Probabilidade	Acurácia (CGT)
CPP de mesófilos	66,1%	75,7%	32,2%	83,5%
NMP de coliformes	33,9%	75,7%	16,5%	67,8%
Prova de redução em tubos	72,2%	94,0%	48,7%	83,9%

Dessa forma, a prova rápida de redução em tubos, sendo um método rápido, simples e mais econômico, torna-se uma alternativa para as pequenas, médias e até grandes indústrias de laticínios que podem controlar melhor a qualidade do leite pasteurizado logo após o seu processamento, contando com mais uma ferramenta que, até então, não dispunham e que apresenta um excelente grau de confiança, com base nas suas propriedades, para realizar o monitoramento quanto à presença de microrganismos mesófilos e de coliformes totais e fecais.

5.7 Proposição do teste

A proposta, então, para que se cumpram os objetivos de uma metodologia simples, rápida e eficiente, indicada para o controle do processo de pasteurização do leite por pequenas, médias e até grandes indústrias, visando maior controle da qualidade do produto para que este possa ser oferecido ao consumidor com garantias quanto à segurança de consumo, é a realização da prova rápida de redução em tubos logo após o envasamento do leite recém-pasteurizado na embalagem comercial, após a

efetivação do controle do processo por meio da pesquisa das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina.

Deve-se, então, proceder à prova rápida de redução em tubos utilizando-se 10mL da amostra de leite recém-pasteurizado que serão colocados, por meio de pipetas estéreis, em tubos de ensaio com rosca, previamente limpos e esterilizados, contendo 5 mL de meio nutritivo estéril. Posteriormente, serão adicionados aos tubos 0,1 mL (100 μ L) do indicador de atividade microbiana, o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 5%, sendo também uma solução previamente esterilizada. Os tubos deverão ser homogeneizados por inversão dos mesmos e, em seguida, mantidos a temperatura entre 25 – 30°C, sobre a bancada do próprio laboratório e sob iluminação direta, natural e / ou artificial. A cada 30 minutos deverá ser realizada a leitura da prova até completar um tempo de leitura de 8 horas. É importante ressaltar que o protocolo de interpretação da prova baseia-se no desenvolvimento da coloração das amostras nos tubos (citado no item material e métodos), a partir da redução do TTC, comparando-se sempre com o tubo – controle, ou seja, o tubo branco da reação que contém apenas 5 mL de meio nutritivo estéril e 0,1 mL de TTC a 5%. Esse tubo branco também é importante para se ter um controle do meio nutritivo, visto que este deve estar estéril, não vindo a causar nenhuma interferência na técnica.

5.8 A prova de redução do TTC no controle de processo

A prova rápida de redução em tubos pode ser considerada uma poderosa ferramenta para o sistema APPCC que, por ser um sistema dinâmico de controle e gerenciamento da segurança do alimento necessita, cada vez mais, de métodos rápidos, capazes de serem empregados na linha de processamento industrial e que proporcionem respostas rápidas e eficientes sobre a qualidade do produto em processamento, definindo o grau de controle do processo. Vias de regra, métodos microbiológicos clássicos não são utilizados com esse propósito visto que, embora eficientes, fornecem respostas tardias (24 a 48 horas) sobre a qualidade do produto

elaborado, situações em que, muitas vezes, o produto já se encontra no comércio ou foi consumido.

A prova rápida de redução em tubos pode ser empregada para o controle do processo de pasteurização do leite, sendo este um ponto crítico de controle (PCC) que, até então, só é controlado e monitorado pela pesquisa das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina e pelo registro termográfico. Só para se ter uma idéia, se o leite recém-pasteurizado for contaminado por apenas 1 UFC/mL, em torno de 7 horas e 30 minutos em condições ideais, esse leite terá, em média, $1,6 \times 10^4$ UFC/mL, baseado na teoria de que as bactérias multiplicam-se a cada 20 - 30 minutos.

Como a prova rápida de redução em tubos, com base nos resultados deste trabalho, tem como tempo de leitura de até 8 horas (ponto de corte do teste), capacidade de detectar células bacterianas viáveis a partir de 10^4 UFC/mL (limite de detecção do teste), sensibilidade de 72,2%, especificidade de 94% e acurácia de 83,9%, pode-se concluir que se trata de um excelente instrumento para facilitar o trabalho desenvolvido pelo APPCC na indústria, não necessitando de grandes alterações estruturais para sua implementação e realização sistemática, nem de equipamentos caros, nem de grandes quantidades de vidrarias e muito menos do emprego de reagentes caros, sendo bastante acessível economicamente para ser incorporado como uma prova de rotina para controlar e monitorar o processamento industrial, com os méritos principais de atuar preventivamente (conforme a necessidade do sistema APPCC) e de, efetivamente, garantir a segurança do produto com precisão igual ou superior a outros métodos oficiais e tradicionalmente utilizados .

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados e análise estatística pode-se concluir que:

- ✓ Dentro do plano APPCC, a prova rápida de redução em tubos pode ser empregada para controle do processo de pasteurização do leite, que até então só é controlado e monitorado pela pesquisa das enzimas peroxidase e fosfatase alcalina e pelo registro termográfico.
- ✓ A prova rápida de redução em tubos é uma técnica que fornece resultados seguros em menor tempo (até 8 horas), proporcionando respostas rápidas sobre a qualidade do leite em processamento, definindo o grau de controle do processo.
- ✓ A prova rápida de redução em tubos é uma técnica bastante simples que pode ser realizada por qualquer técnico da indústria, bastando que este seja antes treinado.
- ✓ A prova rápida de redução em tubos é uma técnica que não exige um alto custo para sua realização, já que não faz uso excessivo de vidrarias e nem mesmo de equipamentos caros.
- ✓ O limite de detecção da prova rápida de redução em tubos é de 10^4 UFC / mL, situando-a nos limites de qualidade ora aceitáveis para os diferentes tipos de leite pasteurizado.

- ✓ A prova rápida de redução em tubos poderá ser utilizada para monitorar, em menor tempo, a qualidade do leite recém-pasteurizado tanto em relação à presença de microrganismos mesófilos aeróbios e facultativos viáveis quanto de coliformes (totais e fecais), que até então só são verificados através dos métodos oficiais de contagem padrão em placas e determinação do NMP, respectivamente.

- ✓ A prova rápida de redução em tubos poderá ser adotada por mini, média ou até grandes indústrias que processem leite por pasteurização rápida (tipo HTST), visando o controle de processo e, portanto, permitindo um maior controle da qualidade do produto oferecido ao consumidor.

7. REFERÊNCIAS

ACKERS, M. L.; SCHOENFELD, S.; MARKMAN, J.; SMITH, M. G.; NICHOLSON, M. A.; DEWITT, W.; CAMERON, D. N.; GRIFFIN, P. M.; SLUTSKER, L. An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 181, p. 1834-1837, 2000.

ALMEIDA, C. R. o sistema HACCP como instrumento para garantir a inocuidade dos alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 53, p. 12-20, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on microbiological methods for foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

ATHAYDE, A. Sistemas GMP e HACCP garantem produção de alimentos inócuos. **Engenharia de Alimentos**, São Paulo, ano 5, n. 23, p. 13-17, 1999.

BARANCELLI, G. V.; SARKIS, F.; GALLO, C. R.; OLIVEIRA, A. J. Avaliação de métodos para enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes em leite cru. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 120, p. 70-84, 2004.

BARBALHO, T. C. F. **Listeria em abatedouro de frangos: ocorrência, disseminação e proposição de um método rápido para confirmação e identificação das espécies**. 2002. 73 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2002.

- BARENDZ, A. W. Food safety and total quality management. **Food Control**, Guildford, v. 9, n. 2-3, p. 163-170, 1998.
- BARROS, V. R. M.; PANETTA, J. C.; PERCES, E. M. C. Eficiência do sistema de pasteurização utilizado em usinas de beneficiamento de leite da capital de São Paulo – Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 3, n. 3-4, p. 199-207, 1984.
- BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FREITAS, J. C.; NERO, L. A.; SOUZA, J. A.; SANTANA, E. H. W.; FRANCO, B. D. G. M. Frequency of 2,3,5-trifenylnitroimidazole chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 137-140, 1999.
- BENNET, W. L.; STEED, L. L. An integrated approach to food safety. **Quality Progress**, Milwaukee, v. 32, n. 2, p. 37-42, 1999.
- BOOR, K. J. Fluid dairy product quality and safety: looking to the future. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 1-11, 2001.
- BRANDÃO, S. C. C. Leite: legislação, responsabilidade e saúde pública. **Balde Branco**, São Paulo, v. 30, n. 360, p. 68-71, 1994.
- BRANDÃO, S. C. C. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite. In: SOUZA, L. J. **Nova legislação de produtos lácteos**. São Paulo: Ed. Revista Indústria de Alimentos, 2002. p. 171-211.
- BRASIL. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção I, p. 10785, 07 jul. 1952.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal – **LANARA**.

Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – Métodos físico-químicos. Brasília, 1981, p.XIV1-22.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Regulamento técnico sobre condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores / industrializadores de alimentos. Portaria n. 326, de 30 de julho de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, anexo I, 01 ago. 1997a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de elaboração para estabelecimentos elaboradores / industrializadores de alimentos. Portaria n. 368, de 4 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 172, seção I, p. 19697, 08 set. 1997b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual genérico de procedimentos para APPCC em indústria de produtos de origem animal. Portaria n. 46, de 10 de fevereiro de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção I, p. 24, 16 mar. 1998.

BRASIL. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção I, p. 13, 20 set. 2002.

BRASIL. Institui o programa genérico de procedimentos-padrão de higiene operacional (PPHO) a ser utilizado nos estabelecimentos de leite e derivados que funcionam sob o regime de Inspeção Federal, como etapa preliminar e essencial dos programas de segurança alimentar do tipo APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). Resolução DIPOA / DAS n. 10, de 22 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção I, p. 4, 28 mai. 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção I, p. 14, 18 set. 2003b.

BRUM, J. V. F. **Análise de perigos e pontos críticos de controle em indústria de laticínios de Curitiba – PR**. 2004. 129 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

BRYAN, F. L. Epidemiology of milk-borne diseases. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 46, n. 7, p. 637-649, 1983.

CARELI, R. T.; DIAS, A. S.; ANDRADE, N. J. Levantamento das condições de processamento em micro-indústrias de leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 137, p. 25-28, 2005.

CARBALLIDO, J. R.; VIYELLA, A. R.; MORENO, I. J. Exigencias de calidad en las empresas alimentarias: industria cárnica. **Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos**, Madrid, n° 249, p. 23-26, 1994.

CARVALHO, C. H. M. O ano de 2001 tem tudo para ser favorável à cadeia láctea. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 6, n. 32, p. 5-8, 2001.

CARVALHO, M. C.; OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R. O sistema petrifilm como alternativa aos métodos tradicionais para contagem total de microrganismos aeróbios e coliformes totais em leite cru refrigerado. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 116-126, 2002.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Série histórica das doenças de transmissão hídrica e alimentar, estado de São Paulo, 1998 – 2005**. Disponível em:

< http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/ddtha_sh9805.htm > . Acesso em: 15 ago. 2006.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O. Doenças transmissíveis pelo leite e derivados. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, n. 13, p. 39-62, 1995.

CHAIN, V. S.; FUNG, D. Y. C. Comparison of Redigel, Petrifilm, Spiral Plate System, Isogrid and aerobic plate count for determining the numbers of anaerobic bacteria in selected foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, n. 3, p. 208-211, 1991.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA (Brasília, DF). Valor bruto da produção agropecuária brasileira: 2002 e 2003. **Indicadores Rurais**, Brasília, v. 7, n. 50, p. 6, 2003.

CRAVEN, H.M.; FORSYTH, S. R.; DREW, P. G.; MACAULEY, B. J. A new technique for early detection of gram negative bacteria in milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 49, p. 54-56, 1994.

CULLOR, J. S. HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) is coming to the dairy? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 3449-3452, 1997.

D'AOUST, J. Y.; WARBURTON, D. W.; SEWELL, A. M. *Salmonella typhimurium* phage-type 10 from cheddar cheese implicated in a major Canadian foodborne outbreak. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 48, n. 12, p. 1062-1066, 1985.

D'AOUST, J. Y.; PARK, C. E.; SZABO, R. A.; TODD, E. C. D.; EMMONS, D. B.; MCKELLAR, R. C. Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica* and Hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 12, p. 3230-3236, 1988.

- DONNELLY, C. W. Concerns of microbial pathogens in association with dairy foods. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 6, p. 1656-1661, 1990.
- EVANS, M. R.; ROBERTS, R. J.; RIBEIRO, C. D.; GARDNER, D.; KEMBREY, D. A milk-borne campylobacter outbreak following an educational farm visit. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 117, p. 457-462, 1996.
- FIGUEIREDO, V. F.; COSTA NETO, P. L. O. Implantação do HACCP na indústria de alimentos. **Gestão & Produção**, São Carlos, v. 8, n. 1, p. 100-111, 2001.
- FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MAC DONALD, K. L.; BRONDUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOLMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 312, n. 7, p. 404-407, 1985.
- FRANCO, B. D. G. M. Inovação nos métodos de análise microbiológica de leite e derivados. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 3, n. 18, p. 70-71, 1998.
- FRANCO, B. D. G. M. Métodos modernos em microbiologia de leite e de derivados. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 3, n. 19, p. 54-56, 1999.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1999. 182 p.
- FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v 14, n. 68-69, p. 70-77, 2000.
- GARCIA, C. A.; SILVA, N. R.; LUQUETTI, B. C.; MARTINS, I. P.; SILVA, R. T.; VIEIRA, R. C. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite "in natura". **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 70, p. 36-50, 2000.

GILLESPIE, I. A.; ADAK, G. K.; O'BRIEN, S. J.; BOLTON, F. J. Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992 – 2000. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 130, n. 3, p. 461-468, 2003.

GINN, R. E.; PACKARD, V. S.; FOX, T. L. Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 69, n. 3, p. 527-531, 1986.

GOH, S.; NEWMAN, C.; KNOWLES, M.; BOLTON, F. J.; HOLLYOAK, V.; RICHARDS, S.; DALEY, P.; COUNTER, D.; SMITH, H. R.; KEPPIE, N. *E. coli* O157 phage type 21/28 outbreak in North Cumbria associated with pasteurized milk. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 129, n. 3, p. 451-457, 2002.

GOMES, S. T. **Efeitos do leite longa vida no mercado de São Paulo**. Disponível em: <[http://www.ufv.br/der/docentes/stg/stg_artigos/Art_089%20-%20EFEITOS%20DO%20LEITE%20LONGA%20VIDA%20NO%20MERCADO%20DE%20S%C3%20PAULO%20\(29-8-95\).pdf](http://www.ufv.br/der/docentes/stg/stg_artigos/Art_089%20-%20EFEITOS%20DO%20LEITE%20LONGA%20VIDA%20NO%20MERCADO%20DE%20S%C3%20PAULO%20(29-8-95).pdf)> . Acesso em: 1ago. 2006.

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

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; NEILL, S. D.; ROWE, M. T. Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 631-636, 1996.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 166-170, 1998.

GRANT, I. R.; ROWE, M. T.; DUNDEE, L.; HITCHINGS, E. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 54, p. 2-13, 2001.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

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

GUSMÃO, V. V.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMANN, F. L. Qualidade microbiológica de leite pasteurizados tipos A, B e C, obtido do comércio varejista da região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 137, p. 95-100, 2005.

HAJDENWURCEL, J. R. APPCC: garantindo a qualidade e segurança dos produtos lácteos. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 3, n. 16, p. 45-50, 1998.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M.; FAZIO, M. L. S. Microbiologia do leite pasteurizado tipo C, comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 65, p. 51-54, 1999.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1992. 804p.

JAYARAO, B. M.; HENNING, D. R. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2157-2162, 2001.

JOUBE, J. L. Principles of food safety legislation. **Food Control**, Guildford, v. 9, n. 2-3, p. 75-81, 1998.

KEENE, W. E.; HEDBERG, K.; HERRIOTT, D. E.; HANCOCK, D. D.; McKAY, R. W.; BARRETT, T. J.; FLEMING, D. W. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 176, p. 815-818, 1997.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; ASSIS, P. N.; SILVA, M. D.; ANDRADE, C. S. O. Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializados em Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 3, n. 1, p. 21-25, 2002.

LEITE, Z. T. C.; VAITSMAN, D. S.; DUTRA, P. B.; GUEDES, A. Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 876-880, 2006.

LIEVARRT, J. J.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; VAN BEEK, E.; VAN DER BEEK, C.; VAN RISP, A.; SCHENKEL, J.; VAN VEERSEN, J. The hazard analysis critical control point's (HACCP) as applied to some chemical, physical and microbiological contaminants of milk on dairy farms. **Veterinary Quarterly**, The Hague v. 27, n. 1, p. 21-29, 2005.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P.; WEAVER, R.; AUDURIER, A.; PLIKAYTIS, B. D.; FANNIN, S. L.; KLEKS, A.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 319, n. 13, p. 823-828, 1988.

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

MAHMOUD, N. S.; GHALY, A. E. Influence of temperature and pH on the nonenzymatic reduction of triphenyltetrazolium chloride. **Biotechnology Progress**, New York, v. 20, n. 1, p. 346-353, 2004.

MARTINS, M. C. Competitividade da cadeia produtiva do leite no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, ano 13, n. 3, p. 38-51, 2004.

MASCOLA, L.; SORVILLO, F.; NEAL, J.; IWAKOSHI, K.; WEAVER, R. Surveillance of listeriosis in Los Angeles County, 1985-1986. A first year's report. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 149, n. 7, p. 1569-1572, 1989.

MENDES, B. J.; TAHAN, F.; OLIVEIRA, F. L. R.; BUENO, J. M.; MONTEIRO, M. R. P., VEIGA, S. M. O. M. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo "C" comercializado na cidade de Alfenas, MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 135, p. 64-67, 2005.

MEIRELES, A. J.; ALVES, D. R. **Importância do leite longa vida para o desenvolvimento do mercado brasileiro de leite**. Terra Viva, 2006. Apresenta textos sobre o agronegócio do leite no Brasil. Disponível em: <http://www.terraviva.com.br/estudos/estudo_8.html> . Acesso em: 1ago. 2006.

NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo B comercializado em Jaboticabal, São Paulo. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 99-104, 1988.

NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo C e das embalagens plásticas utilizadas no envase, em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 261-266, 1989a.

NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo B em diferentes pontos do fluxograma de beneficiamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 7-16, 1989b.

NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; LUIZ, A. F. Características microbiológicas do leite pasteurizado dos tipos A, B e C, comercializados na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 6, n. 2, p. 166-172, 1990.

NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; SCHOCKEN, D. L. Características microbiológicas do leite pasteurizado tipo “integral”, processado por algumas mini e micro-usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 50, p. 21-23, 1997.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, 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 nº 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

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.10-16, 1999.

OLIVEIRA, C. A. F. **Qualidade do leite no processamento de derivados. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 83-94, 2001.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implication. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.

PASCHOA, M. F. A importância de se ferver o leite pasteurizado tipo “C” antes do consumo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 52, p. 24-28, 1997.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia de Alimentos. In: _____. (Org.). **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Ed. Makron Books, 1996. p. 380.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; LARA, J. A. F.; PIVA, F. C. Avaliação sazonal e correlação entre propriedades do leite utilizadas na avaliação de qualidade. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 35-39, 1999.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; DELBEM, A. C. B.; LARA, J. A. F.; PERRI, S. H. V. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais riscos decorrentes de seu consumo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 86, p. 31-38, 2001.

POTTER, M. E.; BLASER, M. J.; KEITH SIKES, R.; KAUFMANN, A. F.; WELLS, J. G. Human campylobacter infection associated with certified raw milk. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 117, n. 4, p. 475-483, 1983.

PRATA, L. F. **Manual de enfermidades transmitidas por alimentos**. Jaboticabal: Funep, 1999. 212 p.

PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. São Paulo: Unesp, 2001. 287p.

REZENDE, D. C.; BORGES JÚNIOR, A. Trajetórias tecnológicas na coleta de leite: o caso CAARG. **Cadernos de Administração Rural**, Lavras, v. 10, n. 2, p. 13-20; 1998.

ROQUE, R. A.; SCHUMACHER, S. S. P.; PAVIA, P. C. Quantificação de microrganismos psicrotóxicos em leites pasteurizados tipos B e C, comercializados na cidade de São Paulo, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 112, p. 59-68, 2003.

ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; FALEIROS, R. R.; LOPES, J. L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Análises das condições físico-químicas e bacteriológicas do leite oferecido ao comércio de Jaboticabal, São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 220, n. 37, p. 15-19, 1982.

SAKATE, R. I.; ANDRADE, N. J.; VANETTI, M. C. D.; PARIZZI, F. E.; BRANDÃO, S. C. C. Enumeração de bactérias em leite cru, utilizando a técnica de contagem direta por microscopia de fluorescência (Direct Epifluorescent Filter Technique – DEFT). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 120, p. 50-54, 2004.

SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos Simplate^R TPC – CI e Petrifilm^R AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 60-64, 2002.

SAVITCI, L. A.; GASPARINO FILHO, J.; VIEIRA, M. C.; VAN DENDER, A. G. F. Usinas de beneficiamento de leite: otimização de empreendimentos de pequeno porte. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 28, n. 12, p. 7-13, 1998.

SILVA, N.; NAKAZATO, L. T.; MIYAGUSKU, L. Avaliação do método de plaqueamento em gotas para contagem de microrganismos em alimentos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 49-54, 1996.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1997. 317p.

SILVEIRA, N. V. V.; SAKUMA, H.; DUARTE, M.; RODAS, M. A. B.; SARUWATARI, J. H.; CHICOUREL, E. L. Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 260, n. 43, p. 40-45, 1988.

SOARES, P. V. **Estimativa rápida da carga de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado**. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

TIMM, C. D.; GONZALEZ, H. L.; OLIVEIRA, D. S.; BÜCHLE, J.; ALÉXIS, 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. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 100-104, 2003.

TIMM, C. D.; ROOS, T. B.; GONZALEZ, H. L.; OLIVEIRA, D. S. **Pontos críticos de controle na pasteurização do leite em microusinas**. Disponível em: <<http://www.ufpel.tche.br/veterinaria/inspleite/documentos/prelo/pontoscriticos.doc>>. Acesso em: 04 ago. 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

VAN KESSEL, J. S.; KARNS, J. S.; GORSKI, L.; MCCLUSKEY, B. J.; PERDUE, M. L. Prevalence of salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 9, p. 2822-2830, 2004.

VASAVADA, P. C. Pathogenic bacteria in milk – a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 10, p. 2809-2816, 1988.

VASAVADA, P. C. Rapid methods and automation in dairy microbiology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 10, p. 3101-3113, 1993.

VIALTA, A.; MORENO, I.; VALLE, J. L. E. Boas práticas de fabricação, higienização e análise de perigos e pontos críticos de controle na indústria de laticínios: 1-requeijão. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 37, p. 56-63, 2002.

VIEIRA, M. C. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; RABELO, J. A.; LIMA, S. V. L.; SILVA, E. V. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido no Estado de Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80-81, p. 113, 2001a.

VIEIRA, M.C.M.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; SILVA, E.V.; LIMA, S.V.L.; SOUZA, C.M.; RABELO, J.A. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite pasteurizado integral comercializado no Estado de Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80-81, p. 113, 2001b.

WENDPAP, L.L.; ROSA, O.O. Qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado em Cuiabá – MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 39, p. 11-14, 1995.

WENDPAP, L. L.; ROSA, O. O.; LIMA, M. G. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado em Cuiabá – MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 47, p. 34-37, 1997.