



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**JAQUELINE DE OLIVEIRA**

**USO DE CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA  
DE UM LATICÍNIO**

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2016**

**JAQUELINE DE OLIVEIRA**

**USO DE CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA  
DE UM LATICÍNIO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado como requisito para obtenção de grau de  
Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade  
Federal da Fronteira Sul  
Orientador: Prof. Dra. Cátia Tavares dos Passos

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2016**

**PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas**

Oliveira, Jaqueline de  
Uso de critérios para avaliação da qualidade  
microbiológica de um laticínio/ Jaqueline de Oliveira.  
-- 2016.  
53 f.

Orientador: Cátia Tavares dos Passos.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
engenharia de alimentos , Laranjeiras do Sul, PR, 2016.

1. Boas práticas de fabricação. 2. Indicadores de  
contaminação. 3. Biofilme. I. Passos, Cátia Tavares dos,  
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.  
Título.

JAQUELINE DE OLIVEIRA

USO DE CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE  
MICROBIOLÓGICA DE UM LATICÍNIO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Laranjeiras do Sul-PR.

Orientadora: Professora Dr.<sup>a</sup> Cátia Tavares dos Passos

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 16/12/2016

BANCA EXAMINADORA



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cátia Tavares dos Passos



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Canhadas Bertan



---

M.<sup>a</sup> Vanessa Gomes da Silva

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me guiar e me amparar em todos os momentos da minha vida, conduzindo meus passos sempre pelos caminhos da fé e do amor, dando-me força, saúde e coragem para continuar seguindo em busca dos meus objetivos.

Aos meus pais, Miguel e Adelaide, por todo o amor, incentivo e dedicação, por serem minha base e meu maior exemplo de honestidade, dignidade, dedicação, persistência e amor. Aos meus irmãos Jeferson e Tatiani pelo carinho, apoio, incentivo e por sempre estarem presentes. Peço desculpas pelas vezes em que me fiz ausente e saibam que os méritos desta conquista também pertence a vocês.

Agradeço também a minha querida orientadora, professora Dra. Cátia Tavares dos Passos, por ter aceitado o desafio, mesmo sabendo que muitas vezes teria que deixar de dedicar-se à pequena Antonella. Obrigada pela excelente orientação, não só neste trabalho de conclusão de curso, mas também nos demais projetos que executamos juntas. Foi muito gratificante ser sua orientada, pois além de orientadora tem sido uma grande amiga, a qual pude recorrer durante toda a graduação tanto nos momentos bons quanto ruins, sempre me ajudando a solucionar os problemas pessoais e também os relativos ao curso.

À professora Dra. Larissa Canhadas Bertan, por aceitar ser coorientadora deste trabalho, por sempre se fazer presente, com seus conselhos, nos momentos de dificuldade e que o medo e a insegurança falaram mais alto.

À Vanessa Gomes da Silva, que sempre foi mais que uma técnica do laboratório, empenhada e dedicada em tudo que faz, contribuiu muito para o desenvolvimento deste trabalho e também para o meu desenvolvimento e aprendizado na área da microbiologia.

À Remili Cristiane Grando pela enorme ajuda na execução deste trabalho, principalmente nos dias de coleta das amostras. À Naiane, pela ajuda nas análises de BPF. À Vanessa Luiza Cunha, por me socorrer nos momentos de apuro e aos demais colegas de laboratório.

À Cooperativa de Produtores de Leite de Virmond – COLERVI por ceder gentilmente o espaço, materiais e informações essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Eduarda Molardi Bainy pela doação de meio de cultura.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Larissa Canhadas Bertan e Me. Vanessa Gomes da Silva, e também da pré-banca, professora Dra. Eduarda Molardi Bainy e Remili Cristiane Grando, pelas importantes sugestões e correções.

À Deise e a Alana, por serem mais que simples colegas de apartamento, por serem minhas amigas de todas as horas, estando sempre à disposição, apoiando, incentivando e aconselhando. À Daiane e a Katia, pela linda amizade que temos, e que mesmo com a distância nada mudou. Ao Tiago, pelo carinho, apoio e incentivo. Com certeza, estarão para sempre em meu coração.

“Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários”. (Santa Paulina)

## RESUMO

O leite é considerado um meio ideal para o desenvolvimento de diferentes microrganismos, devido a sua composição, sendo facilmente contaminado durante ou após a ordenha, no transporte, processamento, armazenamento e distribuição. Por este motivo, faz-se necessária a pasteurização do mesmo, bem como o controle de todas as etapas produtivas por meio do uso das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e monitoramento microbiológico. Desta forma o objetivo do presente trabalho consistiu no uso de critérios para avaliar a qualidade microbiológica de um pequeno laticínio, utilizando uma lista de verificação de BPF, de acordo com a legislação vigente. Além disso, foram realizadas análises microbiológicas de microrganismos indicadores de contaminação, a fim de realizar um diagnóstico do local, por meio da verificação dos dados teóricos e da análise dos riscos reais, através de métodos convencionais e não convencionais. Para isso, realizou-se uma análise quantitativa dos dados obtidos na lista de verificação das BPF, da RDC 275, e estabeleceu-se os pontos a serem avaliados. Foram realizadas três coletas, em dias diferentes. As amostras coletadas foram: (i) *swab* de mãos dos manipuladores, (ii) *swab* de superfícies, (iii) leite cru, coletado do caminhão e do resfriador, (iv) leite pasteurizado, (v) água, (vi) embalagens, (vii) sanitizante e (viii) ar, por meio de deposição passiva em placas. As análises realizadas foram: (i) coliformes a 35°C e 45°C, (ii) contagem de bactérias totais (CBT), (iii) *Staphylococcus aureus*, (iv) *Salmonella*, (v) *Enterococcus* e (vi) *Enterobacteriaceae*, além dos (vii) testes de capacidade de formação de biofilme e de (viii) eficiência do sanitizante. O laticínio avaliado apresentou diversas inconformidades, principalmente nos blocos “manipuladores”, “equipamentos móveis e utensílios” e “produção e transporte do alimento” sendo classificado como regular. Desta forma, as análises dos microrganismos indicadores da qualidade foram realizadas na superfície de seis equipamentos, nas mãos dos manipuladores, no leite cru e pasteurizado, água, ar, embalagem, sanitizante e no produto final. A utilização de enterobactérias como indicadores da qualidade em laticínios mostrou bons resultados em substituição a técnica tradicional de enumeração de coliformes. A contagem de *Enterococcus* na superfície dos equipamentos, juntamente com contagens elevadas de CBT forneceram um bom indicativo da presença de biofilmes, além de terem sido identificados microrganismos forte formadores de biofilmes. Os resultados mais preocupantes foram relacionados com a qualidade microbiológica do ar da área de produção; e com as superfícies dos equipamentos, pois os microrganismos presentes nestas eram fortes formadores de biofilmes e estavam presentes em concentrações elevadas na tubulação do caminhão, tanque resfriador e na tubulação anterior ao pasteurizador. O sanitizante era utilizado em concentração menor do que o recomendado pelo fabricante, no entanto, demonstrou-se eficiente. Embora o leite pasteurizado tenha apresentado resultados de acordo com a Instrução Normativa nº 62, os resultados mostram que o risco estava presente nas instalações desta indústria. Portanto, devem ser realizadas medidas corretivas nos procedimentos de higienização tanto dos equipamentos quanto das instalações para garantir a produção de alimentos seguros.

Palavras-chave: Boas práticas de fabricação. Indicadores de contaminação. Biofilme.

## ABSTRACT

Milk is considered an ideal medium for the development of different microorganisms due to their composition, being easily contaminated during or after milking, in transportation, processing, storage and distribution. For this reason, it is necessary the pasteurization of the same, as well as the control of all the productive stages through the use of Good Manufacturing Practices (GMP) and microbiological monitoring. Thus, the objective of the present study was to use criteria to evaluate the microbiological quality of a small dairy, using a GMP checklist, in accordance with current legislation. In addition, microbiological analyzes of contamination microorganisms were carried out in order to carry out a site diagnosis, through the verification of theoretical data and the analysis of real risks, through conventional and non-conventional methods. For this, a quantitative analysis of the data obtained in the GMP checklist, of DRC 275 was carried out, and the points to be evaluated were established. Three collections were carried out on different days. The samples collected were: (i) hand swab of the manipulators, (ii) surface swab, (iii) raw milk, collected from the truck and cooler, (iv) pasteurized milk, (v) water, (vi) sanitizing and (vii) air, by means of passive plating. The following analyzes were performed: (i) coliforms at 35 ° C and 45 ° C, (ii) total bacterial count (CBT), (iii) *Staphylococcus aureus*, (iv) *Salmonella*, (v) *Enterococcus* and (vi) *Enterobacteriaceae*, (vii) tests of biofilm formation capacity and (viii) sanitizing efficiency. The evaluated dairy presented several nonconformities, mainly in the blocks "manipulators", "movable equipment and utensils" and "production and transport of the food" being classified as regular. In this way, the analysis of the microorganisms indicators of quality were carried out on the surface of six equipments, in the hands of the manipulators, in the raw and pasteurized milk, water, air, packaging, sanitizing and in the final product. The use of enterobacteria as indicators of quality in dairy products showed good results in replacement of the traditional coliform enumeration technique. The counts of *Enterococcus* on the surface of the equipment, together with high counts of CBT provided a good indication of the presence of biofilms, in addition to the identification of strong biofilm forming microorganisms. The most worrisome results were related to the microbiological quality of the air of the production area; And with the surfaces of the equipment, since the microorganisms present in these were strong biofilm builders and were present in high concentrations in the tubing of the truck, coolant tank and in the pipeline prior to the pasteurizer. The sanitizer was used in a lower concentration than that recommended by the manufacturer, however, it has been shown to be efficient. Although pasteurized milk presented results according to Normative Instruction No. 62, the results show that the risk was present in the facilities of this industry. Therefore, corrective measures should be taken in the sanitation procedures of both equipment and facilities to ensure the production of safe food.

Keywords: Good manufacturing practices. Indicators of contamination. Biofilm.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	10
1.1	Objetivos .....	11
1.1.1	Objetivo geral .....	11
1.1.2	Objetivos específicos .....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
2.1	Produção de leite no Brasil e sua qualidade .....	12
2.2	Boas Práticas de Fabricação .....	13
2.3	Higiene em Laticínio .....	15
2.4	Microbiota e contaminantes do leite .....	16
2.5	Microrganismos indicadores .....	18
2.6	Biofilmes .....	21
3	METODOLOGIA .....	23
3.1	Local de estudo .....	23
3.2	Aplicação e avaliação da Lista de Verificação baseada na RDC nº 275 .....	23
3.3	Análise dos indicadores da qualidade microbiológica .....	25
3.4	Determinação do potencial de formação de biofilme .....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1	Aplicação e avaliação da Lista de Verificação baseada na RDC nº 275 .....	28
4.2	Análise dos indicadores da qualidade microbiológica .....	30
4.3	Determinação do potencial de formação de biofilme .....	42
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	44
6	REFERÊNCIAS .....	45
7	ANEXOS .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o leite apresenta elevado consumo, principalmente por crianças e idosos, uma vez que apresenta elevado valor nutricional, por conter vitaminas, gorduras, proteínas, carboidratos, sais minerais e água. Devido a sua composição, o leite é considerado um meio ideal para o desenvolvimento de diferentes microrganismos. A contaminação do leite pode ocorrer durante ou após a ordenha, pelos microrganismos presentes nos tetos da vaca ou pela higienização e ordenha realizadas de forma incorreta. Além disso, também pode ocorrer durante o transporte, processamento, armazenamento e distribuição (SALVADOR et al., 2012).

A segurança microbiológica do leite é um atributo importante para os seus consumidores, por este motivo faz-se necessária a pasteurização do mesmo. Este processo, visa à destruição dos microrganismos patogênicos presentes, sem alterar significativamente as características intrínsecas do produto. Com isso, é possível reduzir o risco de doenças veiculadas por alimentos, pois o leite também é o ponto de partida para a produção de diversos produtos (LATORRE et al., 2010).

A pasteurização é capaz de eliminar uma grande quantidade de bactérias no leite, porém não é possível obter a esterilização do alimento por meio desta técnica. Portanto, a quantidade de microrganismos presentes no alimento após a pasteurização está diretamente relacionada com a quantidade de microrganismos presentes inicialmente. Desta forma, é necessário tomar diversos cuidados para evitar a contaminação do leite durante a ordenha e controlar a temperatura de refrigeração, para evitar a multiplicação microbiana (SALVADOR et al., 2012).

Outro ponto importante a ser levado em consideração para garantir a qualidade do leite é a adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF), que são medidas adotadas para garantir uma boa qualidade microbiológica do produto final. Esta ferramenta tem sido utilizada desde a década de 1970, embora a sua aplicação de forma oficial tenha iniciado apenas na década de 90. Na fabricação de alimentos, o uso das BPF é imprescindível, sendo obrigatória no Brasil desde 1997. No caso das indústrias de alimentos, apesar de ser uma ferramenta básica, as BPF correspondem a uma das mais importantes ferramentas para a realização do controle da qualidade total de um processo ou produto, sendo essencial para a implementação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Nas unidades processadoras de produtos lácteos, BPF e APPCC têm sido amplamente utilizadas para alcançar a produção segura (TAVOLARO; OLIVEIRA, 2006).

Desta forma, nota-se que a qualidade microbiológica do leite pasteurizado depende tanto da qualidade da matéria-prima, quanto da adequada pasteurização, da adoção das BPF e

também do controle da temperatura após o tratamento térmico. Portanto, é fundamental avaliar a qualidade do processo, através do uso de ferramentas de controle de qualidade e da qualidade microbiológica, baseando-se nos seguintes parâmetros: condições de higiene em que foi preparado, riscos que pode oferecer à saúde do consumidor, vida útil requerida e se está dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente (ALMEIDA, 2006).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Fazer uso de critérios para avaliar a qualidade microbiológica de um pequeno laticínio, utilizando uma lista de verificação de BPF, de acordo com a legislação vigente, e análises de microrganismos indicadores de contaminação.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Aplicar uma lista de verificação de BPF baseado na RDC nº 275;
- Analisar quantitativamente os resultados da lista de verificação;
- Escolher e aplicar análises microbiológicas de acordo com os critérios estabelecidos pela verificação das BPF;
- Verificar a adequação das metodologias microbiológicas convencionais com métodos não oficiais;
- Aplicar metodologia para avaliação do potencial de formação de biofilme em superfícies.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL E SUA QUALIDADE

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA), em 2014, o Brasil ocupou a quinta posição no ranking mundial de produção de leite, ficando atrás apenas da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China. Neste ano a produção brasileira de leite foi de 35,17 bilhões de litros, sendo que a região Sul foi responsável por 34,7% ocupando assim a primeira posição no ranking nacional. Neste período o preço médio nacional do litro do leite foi de 0,96 reais, gerando um montante de R\$ 33,78 bilhões de reais (IBGE, 2014).

Em 2014 a produtividade média de leite no Brasil foi de 1.525 litros/vaca/ano, sendo que a região Sul se destacou por apresentar a maior produtividade nacional, 2.789 litros/vaca/ano. No Paraná a produtividade média foi de 2.629 litros/vaca/ano e Castro foi o município que apresentou maior produção, 239.000.000 litros. O município de Virmond foi responsável pela produção de 13.540.000 litros, que geraram aproximadamente 3.269.200,00 reais (DERAL, 2014; IBGE, 2014). Em 2002, o setor de produtos lácteos foi considerado o quarto maior setor de alimentos do Brasil, com aproximadamente US \$ 7 bilhões em vendas. Em 2001, o setor era composto por aproximadamente 6000 plantas de processamento que empregavam aproximadamente 70.000 trabalhadores (FARINA et al., 2005).

A pecuária leiteira é uma atividade praticada em todo o Brasil, englobando produtores de vários níveis organizacionais e tecnológicos, desde a agricultura familiar e pequenas cooperativas até propriedades com alto nível tecnológico (WILLERS et al., 2014). Logo, a produção de leite é influenciada por fatores sociais, econômicos e culturais, que afetam a rotina de produção e conseqüentemente a qualidade do leite. A partir de 1990, a indústria leiteira começou a implementar programas que pagam pela qualidade do leite produzido, como forma de incentivar os produtores a buscar a melhoria de seus produtos e, indiretamente, obter um melhor desempenho industrial e estabelecer-se no mercado internacional (PAIXÃO et al., 2015).

A qualidade dos alimentos cada vez mais tem se tornado um atributo-chave na transformação dos sistemas agroalimentares, sendo um fator determinante na competitividade agrícola. O conceito de qualidade é complexo, e seus atributos podem variar ao longo do tempo, este conceito inclui segurança alimentar, nutrição e atributos relacionados à comercialização de diversos produtos, sendo baseado na certificação e monitoramento de produtos e técnicas

empregadas na produção (FARINA et al., 2005). A Instrução Normativa N° 62, de 29 de dezembro de 2011, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é a legislação que regulamenta a produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite cru refrigerado e leite pasteurizado, bem como a coleta e transporte de leite cru refrigerado no Brasil (MAPA, 2011).

## 2.2 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

Os sistemas de segurança de alimentos têm como intuito prevenir, eliminar ou reduzir os perigos, sempre que possível, pelo uso das tecnologias existentes. Estes sistemas baseiam-se no conhecimento dos perigos potenciais que podem ocorrer no processamento dos alimentos e na escolha das medidas de controle que garantam a adequação dos produtos às exigências do fabricante, do consumidor e dos órgãos de fiscalização (ICMSF, 2015).

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) indicam os princípios, procedimentos e meios primordiais para a produção de alimentos com qualidade. As BPF incluem questões referentes às instalações industriais, aos equipamentos, móveis, utensílios, manipuladores e matérias-primas, bem como qualidade microbiológica e condição higiênica de cada etapa do processo produtivo (FORSYTHE, 2002). As práticas adotadas em cada indústria para obtenção de alimentos de qualidade e seguros deve ser documentada em manuais de BPF, que descrevem como estas práticas são realizadas. Este documento é de suma importância para garantir a contínua avaliação e melhoria das indústrias processadoras de alimentos (DIAS et al., 2012).

De acordo com ICMSF (2015), as BPF são as condições e práticas higiênicas básicas necessárias para a produção de alimentos seguros e são pré-requisitos para o desenvolvimento e implementação de um sistema de gestão de segurança dos alimentos, utilizado para controlar, de forma confiável, os principais perigos no alimento produzido. O controle das BPF pode ser feito por duas formas: inspeção visual e amostragem microbiológica, sendo que o registro da realização de ambas é fundamental para garantir que as ações corretivas possam ocorrer adequadamente e em tempo hábil.

Santana et al., (2009), ao avaliarem a qualidade higiênico sanitária de serviços de alimentação em escolas de Salvador-BA, notaram que após a adoção das BPF os resultados obtidos por inspeção visual e análises microbiológicas apresentaram melhoria, em particular nas práticas de higiene dos manipuladores e segurança dos alimentos. Pois estes dados correlacionaram-se e os valores de contagem total em placas, coliformes e estafilococos diminuíram nas amostras de alimentos e nas mãos dos manipuladores.

A inspeção visual, geralmente, é realizada pelos funcionários mais experientes e treinados ou por auditores independentes, sendo que o momento adequado para realização das inspeções dependerá da sua finalidade. Quando realizada antes do início das atividades diárias tem o intuito de verificar a eficácia dos procedimentos de higienização e sanitização e se o ambiente e os equipamentos estão aptos para serem utilizados nas etapas posteriores de processamento. Já as inspeções durante a etapa de produção tem a finalidade de verificar se existem práticas adotadas por funcionários, fluxo inadequado de produtos, ou acúmulo de resíduos que possam levar contaminação aos produtos (ICMSF, 2015).

A amostragem microbiológica, por sua vez, proporciona uma melhor avaliação do processo e do ambiente, sendo importante realizá-las antes, durante e após o processamento. Neste caso é comum avaliar os microrganismos indicadores e, em alguns produtos, podem ser realizadas também análises adicionais para verificar a presença de patógenos. Estas análises geram informações importantes para determinar os ajustes necessários nas BPF e, com isso, controlar ou evitar a contaminação do ambiente e/ou produto (ICMSF, 2015).

Dias et al., (2012) concluíram que a implementação de BPF em uma unidade de processamento de queijo mudou a organização global, bem como o comportamento e conhecimento dos gestores e manipuladores de alimentos quanto a qualidade e segurança dos produtos fabricados. Com a implementação de BPF, atualização e melhoria contínua, a indústria tornou-se mais competitiva e os manipuladores tornaram-se mais conscientes sobre a sua importância para o processo. Com isso, melhorias no ambiente de trabalho, adequação a legislação e a qualidade dos produtos finais foram alcançadas.

No Brasil, as BPF estão regulamentadas na Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 275, de 21 de outubro de 2002, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores e Industrializadores de Alimentos. Este documento contém também a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos (BRASIL, 2003).

A aplicação da lista de verificação é uma avaliação inicial, que permite indicar pontos críticos e/ou em inconformidade e com isso, traçar ações corretivas para adequar as instalações, procedimentos e processos produtivos. Esta prática visa eliminar ou reduzir os riscos químicos, físicos e biológicos, que possam vir a comprometer os alimentos e a saúde do consumidor (GENTA; MAURICIO; MATIOLI, 2005).

A avaliação das BPF por meio de questionários apropriados, é utilizada como subsídio para qualificação e seleção de fornecedores, para a verificação do cumprimento das BPF, pelo próprio estabelecimento ou por auditoria fiscal sanitária. Esta ferramenta serve também como

base para a implantação do sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (TOMICH et al., 2005).

### 2.3 HIGIENE EM LATICÍNIO

O leite produzido no Brasil apresenta heterogeneidade de sistemas de produção, tendo um número pequeno de produtores especializados, e elevado número de produtores com pouca ou nenhuma especialização. Este grau de instrução afeta diretamente a produtividade leiteira e o manejo nutricional e higiênico-sanitário adotado (VARGAS et al., 2015).

A contaminação do leite por microrganismos patogênicos é um grande problema para a saúde pública, em nível mundial, agravando-se mais em regiões subdesenvolvidas, onde o leite cru, muitas vezes, é consumido pela população. Por este motivo faz-se necessária a melhoria e monitoramento de sua qualidade para aumentar a segurança da cadeia produtiva em todo o mundo. No Brasil, a comercialização do leite cru é proibida, porém por questões culturais e/ou falta de informação o consumo deste produto é muito comum, principalmente, por indivíduos de baixo poder aquisitivo. Além do risco à saúde, a contaminação microbiológica do leite pode provocar alterações físico-químicas e sensoriais, devido a presença de enzimas e toxinas produzidas por algumas espécies bacterianas (OLIVEIRA, 2011).

Como em todos os setores que produzem alimentos, o setor de lácteos é confrontado com o desafio de implementar as BPF para garantir a produção de alimentos seguros. Alguns laticínios têm feito esforços e investido significativamente para a implementação das BPF e da APPCC, com o intuito de produzir alimentos mais seguros e que atendam aos requisitos estabelecidos nas legislações vigentes (OPIYO et al., 2013).

Opiyo et al. (2013) correlacionaram os efeitos dos sistemas de gestão de segurança dos alimentos existentes, com o tamanho do laticínio, e avaliaram seus efeitos sobre a qualidade microbiológica na indústria de leites no Quênia. Foram realizadas amostragens e posterior análise de microrganismos indicadores de qualidade e de patógenos em locais críticos, como o ambiente, mãos dos manipuladores, superfícies que entram em contato com alimentos e dos produtos finais e com isso, foram traçados perfis do nível de segurança microbiana para obter uma visão geral de contaminação. A pontuação máxima foi obtida por apenas três laticínios, dos 14 avaliados, sendo dois de grande porte e um de escala média. Nos laticínios de pequeno porte a qualidade microbiológica foi mais precária, apresentando, em alguns casos, presença de *Escherichia coli* em superfícies em contato com os alimentos e no produto final.

As superfícies são importantes fontes de contaminação microbiológica, aos alimentos, principalmente quando não são adequadamente limpas ou permanecem molhadas entre a limpeza e o uso. Os manipuladores de alimentos também desempenham um papel importante em relação a contaminação, uma vez que podem ser portadores assintomáticos de doenças causadas por microrganismos de origem alimentar. Portanto, a adoção de medidas que garantam a detecção precoce de agentes patogênicos permite a tomada de decisões adequadas para eliminar o patógeno e aumentar o nível de segurança dos alimentos produzidos (EVANS et al., 2004; OPIYO et al., 2013).

As medidas adotadas nos procedimentos de higienização dos equipamentos e superfícies devem levar em consideração a composição do alimento e as especificidades do processo. No caso do leite, os principais resíduos são as proteínas e os minerais, já que o carboidrato presente é a lactose, que é facilmente removida por ser solúvel em água. As proteínas podem ser desnaturadas durante o tratamento térmico e com isso formam incrustações difíceis de serem removidas, além disso também ocorre a insolubilização de alguns sais minerais e este fator é intensificado pelo tratamento térmico (SANTOS, 2010).

As principais etapas que devem ser realizadas durante a higienização de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos são: pré-limpeza, limpeza, enxágue, desinfecção e enxágue novamente. No caso de indústrias processadoras de leite, pela composição do mesmo, é indicado realizar a pré-limpeza com água limpa à temperatura ambiente, limpeza com detergente alcalino à 80 °C/20 min, enxágue com água limpa à temperatura ambiente e desinfecção com solução ácida à 45 °C, se necessário o último enxágue deve ser realizado com água limpa também à temperatura ambiente (ANDRADE, 2008).

## 2.4 MICROBIOTA E CONTAMINANTES DO LEITE

Segundo Oliveira (2005), quando o leite é obtido em condições higiênicas adequadas e de animais sadios, o número de microrganismos deve ser baixo. No entanto, mais de dezesseis doenças bacterianas e sete virais podem ser veiculadas pelo leite cru, uma vez que os principais contaminantes desta matéria-prima são as bactérias, sendo raramente encontradas leveduras e fungos.

As bactérias que se encontram presentes no leite cru podem afetar a qualidade, a segurança e a aceitação do mesmo. Dentre os diversos microrganismos que podem ser encontrados no leite e em outros produtos lácteos, cabe ressaltar os agentes patogênicos como:

*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* e *Mycobacterium tuberculosis* (ELMOSLEMANY et al., 2009).

Os microrganismos que mais frequentemente tem sido relacionados com doenças causadas por alimentos são *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli*. Nos Estados Unidos, cerca de 62% dos surtos estavam relacionados com alimentos de origem animal e os agentes etiológicos de maior destaque foram *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (ANDRADE, 2008).

Embora os produtos lácteos sejam bastante fiscalizados pelos órgãos competentes, vários casos de surtos e de toxinfecções alimentares têm sido registrados nos Estados Unidos e no Reino Unido, relacionadas com estes produtos. Provavelmente estes casos sejam comuns também em outros países porém não há registros dos casos. Os microrganismos mais incidentes nos países mencionados são: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolítica* (ALMEIDA, 2006).

Gillespie et al., (2003) relataram que apenas 2% dos surtos alimentares registrados na Inglaterra e no país de Gales estavam relacionados ao leite, sendo que deste total, 52% apresentava como veículo o leite não pasteurizado e 37% o leite pasteurizado. Os microrganismos responsáveis pelos casos foram: *Salmonella* (37%), *Escherichia coli* (33%) e *Campylobacter* (26%). No Brasil, uma pesquisa realizada em Curitiba-PR avaliou a presença de *Campylobacter* em 30 amostras de leite, 15 crus e 15 pasteurizados, sendo detectada a presença em apenas 2 amostras de leite cru e em nenhuma de leite pasteurizado (NARCIZO; MONTANHINI, 2014).

No leite também estão presentes as bactérias ácido lácticas (BAL), que são amplamente distribuídas na natureza. No leite, os gêneros comumente encontrados são: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Porém, todos os aspectos higiênicos aplicados na obtenção do leite, na manipulação, no uso de refrigeração e no emprego de ferramentas de controle de qualidade, podem afetar a população microbiana e, juntamente com os microrganismos contaminantes presentes no leite cru, as BAL podem ser eliminadas durante os processos tecnológicos (ERCOLINI et al., 2009; STULOVA et al., 2010).

A contagem bacteriana total (CBT) é uma análise que fornece uma estimativa do número total de bactérias aeróbias presentes na amostra. Quando apresenta contagens elevadas pode ser um indicativo de vacas com mastite, condições de ordenha insalubres e/ou higienização inadequada (GILLESPIE et al., 2012).

O leite é considerado um meio de cultura ideal para o desenvolvimento de bactérias e outros microrganismos, sendo que no caso dos microrganismos pertencentes ao grupo

coliformes a população dobra de tamanho a cada 20 minutos à uma temperatura média de 30 °C. Dependendo do tipo e da quantidade dos microrganismos presentes no leite, além dos riscos à saúde pública citados anteriormente, estes podem causar efeitos indesejáveis na qualidade industrial. Dentre as alterações relacionadas à indústria alimentícia, vale ressaltar os problemas com a acidificação e coagulação, produção de gás, alterações de sabor, odor, cor, entre outros. Além de reduzir a vida de prateleira, estas alterações também são responsáveis pela diminuição do rendimento industrial (CASSOLI, 2005).

## 2.5 MICRORGANISMOS INDICADORES

Os benefícios e a eficácia da implementação de BPF, quanto à segurança alimentar e qualidade, podem ser avaliados pelo uso de indicadores. Dentre os parâmetros que são utilizados para avaliar esta eficácia, os mais comumente utilizados, são os indicadores de custos pré e pós-implementação de BPF e os indicadores microbiológicos (DIAS et al., 2012).

Os valores fornecidos por análises de microrganismos indicadores são muito úteis para analisar tendências ou controlar processos. Em casos em que se tem um programa de gestão de segurança e da qualidade microbiológica bem estruturado, as análises de microrganismos indicadores podem tornar-se mais importantes que análises microbiológicas convencionais do produto final. Estes microrganismos também podem ser utilizados como ferramenta para avaliar a eficácia de processos de limpeza e desinfecção, ou de processamento inadequado (ICMSF, 2015).

O método mais utilizado para avaliar a carga microbiana do leite é a contagem bacteriana total (CBT), que inclui tanto os microrganismos deteriorantes quanto os patógenos, e em contagens elevadas indicam matéria prima excessivamente contaminada, falta de condições básicas de higiene, refrigeração e/ou pasteurização inadequada ou equipamentos não higienizados corretamente, o que pode implicar em perdas econômicas (OLIVEIRA, 2005).

Entretanto, este não é um indicador de segurança do alimento, uma vez que não há diferenciação entre os tipos de bactérias presentes e nem a presença de patógenos ou toxinas, porém, fornece informações gerais sobre a qualidade dos produtos, das práticas adotadas e das matérias-primas utilizadas. Esta análise pode ser realizada tanto para microrganismos mesófilos, psicrotróficos ou termófilos, variando apenas o tempo e a temperatura de incubação (NASCENTES; ARAÚJO, 2012; OLIVEIRA, 2005; SALVADOR et al., 2012).

Já a presença de *Enterococcus* indica que práticas higiênicas foram inadequadas, ou que o produto foi exposto às condições que propiciaram a multiplicação de microrganismos

indesejáveis (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Os microrganismos que pertencem ao gênero *Enterococcus* são encontrados com frequência em leite e seus derivados e comumente aderem-se aos equipamentos e utensílios dos laticínios, formando biofilmes nas superfícies destes (ROSADO, 2009). Tal fato é preocupante, pois normalmente estão associados a infecções clínicas, embora contribuam para as características sensoriais e para a biopreservação de produtos lácteos (PORTO et al., 2016).

Os *Enterococcus* colonizam o trato gastrointestinal de diferentes animais, incluindo aves, bovinos e suínos, sendo as espécies mais isoladas *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus cecorum* e *Enterococcus durans* (CASSENEGO et al., 2013), devido a isso, alguns autores sugerem o uso como indicador de contaminação fecal (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Os produtos lácteos são um dos principais reservatórios deste gênero, podendo estar relacionado com contaminação ambiental ou fecal, por outros animais ou pelo próprio homem. Estes microrganismos podem ser considerados um problema para a saúde pública, quando carregam genes de virulência, pois devido ao uso de antimicrobianos em animais de cria, para o tratamento de doenças, podem influenciar na seleção ou na amplificação de cepas potencialmente patogênicas, que apresentam resistência a diferentes tipos de antibióticos, que podem ser transmitidas ao homem através da cadeia alimentar (DELPECH et al., 2013).

Porto et al. (2016) verificou 75,5%, 26,42% e 3,77% de resistência a pelo menos um, dois e três antibióticos, respectivamente, de nove que foram testados: ampicilina 10µg; cloranfenicol 10µg; eritromicina 15µg; estreptomicina 300µg. teicoplanina 30µg; norfloxacin 10µg; vancomicina 30µg; tetraciclina 30µg; e gentamicina 120µg, avaliando queijo coalho no nordeste do Brasil. Além disso, este gênero também pode expressar genes de aderência, aumentando a sua capacidade infectiva, devido a formação de biofilmes (CASSENEGO et al., 2013).

A utilização de grupo coliformes como indicador da qualidade higiênico-sanitária de alimentos é uma prática já consolidada e a presença destes em leite indica que as práticas de higiene adotadas durante a ordenha e nas etapas subsequentes foram precárias, que há infecção no úbere, causada por algumas espécies pertencentes a este grupo, ou que houveram falhas na pasteurização. Além disso, a detecção de coliformes termotolerantes é utilizada como um índice de contaminação recente e indica que microrganismos de origem fecal, inclusive patogênicos, possam estar presentes (OLIVEIRA, 2005; SALVADOR et al., 2012).

Por mais de 100 anos, os Estados Unidos, têm utilizado o grupo coliformes como microrganismos indicadores, sendo este um teste de qualidade higiênica padrão para muitos

alimentos e bebidas, incluindo a água e o leite. A indústria de lácteos utiliza este grupo para indicar a presença de mais de 20 gêneros de bactérias Gram-negativas, bacilares, não formadores de esporos, que não têm a capacidade de sobreviver à tratamentos térmicos, como a pasteurização. Portanto, nestes casos, os coliformes atuam como indicadores de contaminação pós pasteurização (MASIELLO et al., 2016).

A presença de coliformes além de ser um indicativo da condição higiênica dos produtos lácteos e do ambiente de processamento e armazenamento, também tem afetado a qualidade sensorial dos produtos, uma vez que podem crescer em temperaturas de refrigeração (MASIELLO et al., 2016; WESSELS; JOOSTE; MOSTERT, 1989). Martin et al., (2012), ao avaliar sensorialmente amostras de leite pasteurizado contaminado com coliformes observou diminuição significativa de 14 dias na vida de prateleira, quando comparado com amostras não contaminadas, os autores correlacionaram este fato com a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas.

Embora muito utilizado nos EUA em laticínios, como indicadores de qualidade, os coliformes representam menos de 50% da flora bacteriana que contamina o leite fluido após a pasteurização (RANIERI; BOOR, 2009). Na Europa tem-se utilizado um grupo alternativo de indicadores, a família taxonômica *Enterobacteriaceae*, este grupo é composto por bactérias gram-negativas, fermentadoras de glicose e termolábeis, que inclui um grande número de gêneros relacionados com a contaminação pós pasteurização de produtos lácteos, como por exemplo *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Pantoea*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*. Além disso, ao avaliar o grupo *Enterobacteriaceae* é possível detectar um grande número de gêneros associados à deterioração de produtos lácteos, sem excluir o tradicional grupo coliformes (HERVERT et al., 2016).

A utilização de bactérias do gênero *Staphylococcus* como indicadores de qualidade é interessante pois estes microrganismos estão presentes naturalmente na pele, mucosas do trato respiratório superior e no intestino do homem, sendo o *S. aureus* o de maior patogenicidade e responsável por um número considerável de surtos de toxinfecção. A importância deste microrganismo como indicador se deve ao papel desempenhado pelos manipuladores durante o processamento, aos riscos de contaminação das matérias-primas e das superfícies em contato com os alimentos e também ao fato desta bactéria ser a mais resistente de todas as patogênicas não formadoras de esporos, além de ser um indicador de contaminação pós-processo (NASCENTES; ARAÚJO, 2012; OLIVEIRA, 2005).

## 2.6 BIOFILMES

Devido à alta capacidade de adaptação e reprodução, em um pequeno intervalo de tempo, os microrganismos conseguem se desenvolver em diversos ambientes, incluindo condições extremas. Quando presentes nos equipamentos, os microrganismos podem apresentar-se dispersos na suspensão, ou aderidos à superfícies, na forma de biofilmes (SILVA, 2011). As bactérias são os microrganismos com maior capacidade de formação de biofilmes, por apresentarem tamanho reduzido, altas taxas de reprodução, elevada capacidade de adaptação e de produção de substâncias extracelulares (LINDSAY; VON HOLY, 2006).

Biofilmes têm sido definidos como um conjunto de células microbianas ligadas a uma superfície, por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídeos que formam uma matriz extracelular. Os microrganismos associados no biofilme, normalmente, são diferentes dos que permanecem em suspensão e apresentam elevada resistência aos antibióticos e desinfetantes, apresentando real importância para as áreas de medicina, ambiental e industrial. Por este motivo o estudo de biofilmes microbianos tem recebido significativa atenção nas últimas décadas (DONLAN, 2002).

Os biofilmes são constituídos por substâncias poliméricas extracelulares, denominadas exopolissacarídeos (EPS). Estas substâncias representam cerca de 70 a 90% do peso total, sendo o restante composto por proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas. O biofilme forma uma crosta, na qual os microrganismos continuam a crescer, proporcionando maior resistência aos agentes químicos e físicos, utilizados em procedimentos de higienização (SILVA, 2011).

Há vários métodos desenvolvidos para o cultivo e quantificação de biofilmes, porém nenhum protocolo foi padronizado para a avaliação de formação de biofilme por diferentes espécies bacterianas. A quantificação de biofilmes iniciou-se com um método baseado no cultivo de biofilmes em um tubo de ensaio e posterior detecção do biofilme por coloração, em seguida foram utilizadas microplacas para o cultivo e os resultados foram medidos por espectrofotometria. Além dos métodos citados, também há a possibilidade do uso da marcação radioativa, microscopia, teste com ágar vermelho Congo, dentre outros. Entretanto, o método mais utilizado para investigação de biofilme é o que utiliza microplacas (STEPANOVIC et al., 2007).

A diferenciação entre adesão bacteriana e formação de biofilme tem sido baseada na quantidade de células aderidas por  $\text{cm}^2$ , sendo que este valor difere entre os autores. Alguns sugerem um número mínimo de células aderidas por  $\text{cm}^2$  de  $10^6$ , enquanto outros consideram

que a formação de biofilme já ocorre com um número de células aderidas entre  $10^5$  e  $10^6$  células por  $\text{cm}^2$  (SILVA, 2011).

A prevenção da formação de biofilmes em equipamentos de laticínios é muito importante para assegurar a qualidade da matéria-prima, pois a presença de biofilmes na indústria de alimentos tem sido relatada como fonte potencial de contaminação bacteriana. Dentre as espécies de importância está a *Listeria monocytogenes*, que tem potencial para formar biofilmes em materiais como o aço inoxidável, borracha e plástico, amplamente encontrados em equipamentos de indústrias processadoras de leite (LATORRE et al., 2010).

Entretanto, outras espécies patogênicas podem estar associadas à formação de biofilmes, como é o caso da *Listeria innocua*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Já no caso dos microrganismos alteradores de alimentos o gênero *Pseudomonas* é o que apresenta maior número de espécies com capacidade de formação de biofilmes (ANDRADE, 2008).

A formação de biofilmes pode causar danos irreversíveis e redução da viabilidade de equipamentos, ocasionando prejuízos econômicos às indústrias. Além disso, pode reduzir o fluxo nas tubulações, reduzir a taxa de transferência de calor em trocadores e provocar corrosão nas superfícies dos equipamentos e utensílios (SILVA, 2011).

### 3 METODOLOGIA

O presente trabalho investigou uma indústria processadora de leite fluido pasteurizado a fim de avaliar a sua condição higiênico sanitária através do uso de diferentes critérios. Para isso, primeiramente foi aplicada uma lista de verificação segundo a RDC nº 275 (Brasil, 2002), sendo que após a avaliação criteriosa dos resultados, foram escolhidos os pontos que seriam amostrados para realizar as análises microbiológicas. Estas análises foram escolhidas de acordo com o tipo de amostra que seria coletada e utilizadas para determinar o risco do ambiente e a adequação da escolha das mesmas.

#### 3.1 LOCAL DE ESTUDO

Foi avaliada uma pequena indústria processadora de leite fluido pasteurizado, que possui SIP/POA, localizada no município de Virmond, PR, Brasil, com capacidade para produção de 50 mil L.mês<sup>-1</sup>.

#### 3.2 APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA LISTA DE VERIFICAÇÃO BASEADA NA RDC Nº 275

O estabelecimento foi avaliado utilizando a *Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos* contida no Anexo II da RDC nº 275 (Brasil, 2002), Sendo uma parte desta disponibilizada no Anexo I, deste trabalho. Este instrumento é dividido em cinco blocos, sendo eles: **1-** edificações e instalações; **2-** equipamentos, móveis e utensílios; **3-** manipuladores; **4-** produção e transporte dos alimentos **5-** documentação, obtendo como resposta para cada um dos itens “Sim”, “Não” ou “NA” (não aplicável). A aplicação desta foi realizada de forma individual, durante uma visita ao laticínio, por cinco pessoas: 2 engenheiras de alimentos, 1 farmacêutica, 1 médica veterinária, e 1 acadêmica da última fase do curso de bacharelado em engenharia de alimentos, no dia 14/09/2016, após a visita, foi realizada uma reunião, para realizar a síntese dos resultados.

Os itens contidos nesta Lista de Verificação foram avaliados de acordo com Tomich et al. (2005). Para isso, os itens foram pontuados como: **Imprescindíveis**- itens críticos para proteção contra doenças de origem alimentar e que necessitam de correção imediata; **Necessários**- itens que contribuem para ocorrência de doenças de origem alimentar, mas que podem levar um tempo maior para ocorrer a adequação; **Recomendáveis**- não são críticos para

gerar doenças de origem alimentar, mas pertencem às BPF e **Não Atendidos**. Desta forma, cada item recebeu uma pontuação: 4- Imprescindíveis, 2- Necessários, 1- Recomendáveis e 0- Não Atendidos.

Para o cálculo da pontuação do bloco (PB), foi utilizada a Equação 1 onde TS corresponde ao número de respostas sim, K é pontuação máxima do bloco e TÑA o número de itens não aplicáveis.

$$PB = \frac{TS}{(K - T\tilde{N}A)} \quad (\text{Equação 1})$$

A porcentagem de itens imprescindíveis em cada bloco (%I) foi calculado utilizando a Equação 2, e o peso de cada bloco, utilizando a Equação 3. Sendo  $\Sigma I$  o total de itens Imprescindíveis do bloco e  $\Sigma NT$  o número total de itens do bloco, enquanto W refere-se ao peso do bloco e  $\Sigma \% I$  a somatória de % I de todos os blocos.

$$\%I = \left( \frac{\Sigma I}{\Sigma NT} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

$$W = \left( \frac{\%I}{\Sigma \%I} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Para o cálculo da pontuação ponderada de cada bloco (PPB) foi utilizada a Equação 4, enquanto que a pontuação ponderada do estabelecimento (PPE) foi realizada pela soma das pontuações ponderadas de cada bloco (Equação 5), a classificação do estabelecimento se deu de acordo com a Tabela 1.

$$PPB = PB \times W \quad (\text{Equação 4})$$

$$PPE = PPB_1 + PPB_2 + PPB_3 + PPB_4 + PPB_5 \quad (\text{Equação 5})$$

Tabela 1 - Classificação do laticínio de acordo com a Pontuação Ponderada do estabelecimento (PPE).

<b>Classificação</b>	<b>PPE</b>
Excelente	96 a 100
Muito bom	89 a 95
Bom	76 a 88
Regular	41 a 75
Ruim	< 41

Fonte: TOMICH et al., 2005.

Para verificar a importância de cada bloco na pontuação final foi calculada a contribuição percentual de cada bloco em relação a pontuação ponderada do estabelecimento utilizando a Equação 6.

$$\% \text{Contribuição}(PPE) = \left( \frac{PPB_A}{\sum PPB} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Após a obtenção destes resultados, foi possível estabelecer os pontos do *layout* do laticínio onde seriam coletadas as amostras para as análises microbiológicas, de acordo com o critério 1- Imprescindível.

### 3.3 ANÁLISE DOS INDICADORES DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA

A coleta das amostras seguiu a metodologia proposta por Santana et al. (2009) com modificações, onde foram realizadas 3 coletas, em dias diferentes, totalizando 3 coletas de cada ponto. Todas as análises microbiológicas foram baseadas nas metodologias propostas pela APHA (*American Public Health Association*) e foram realizadas em duplicata. Todas as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo e levadas ao laboratório, onde foram imediatamente analisadas. Entre a coleta e o início das análises não ultrapassou 2 h.

As amostras das superfícies foram realizadas por *Swab*, utilizando um padrão de 100 cm<sup>2</sup> ou 25 cm<sup>2</sup>, de acordo com o tamanho da superfície, sendo coletadas em tubos de diluição contendo água peptonada 0,1% e solução de tiosulfato de sódio 0,25%. As análises realizadas foram: Contagem de Bactérias Mesófilas Totais (CBT) (MORTON, 2001 *apud* SILVA et al., 2010a), *Enterococcus* (FRANCIOSI et al., 2009) e Coliformes Termotolerantes a 45°C, utilizando Petrifilm EC (SILVA et al., 2010a). Para as mãos dos manipuladores, coletou-se *Swab* nas palmas e bordas, sem a necessidade da utilização da solução de tiosulfato de sódio (ANDRADE, 2008), quantificando-se *Staphylococcus* coagulase positiva (LANCETTE; BENNETT, 2001, *apud* SILVA et al., 2010a).

Também foram coletadas amostras de 200 mL de água em frascos contendo 0,2mL de solução de tiosulfato de sódio 3% e de 200 mL de leite cru, no caminhão e no tanque resfriador, em frascos estéreis, além de embalagens fechadas de leite pasteurizado. Foi realizada a enumeração de enterobactérias, coliformes a 35°C e 45°C na água. No leite cru e pasteurizado foi realizada a contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais segundo *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (Laird et al, 2004 *apud* SILVA et al., 2010a), contagem de

coliformes a 35°C e 45°C (Davidson et al, 2004 apud SILVA et al., 2010a) e *Salmonella* pelo método AOAC 2011.03, segundo Instrução Normativa n° 62 (IN 62) (MAPA, 2011).

Embalagens vazias retiradas da embaladora, antes e após passar pela luz UV, foram acondicionadas em sacos de polipropileno (500 mL) estéreis e realizou-se a análise de CBT. Também realizou-se o teste do poder desinfetante dos materiais de limpeza utilizados no estabelecimento, pelo teste de suspensão, avaliando o número de reduções decimais utilizando como padrão *Escherichia coli* ATCC® 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 em contato com o sanificante por 30s a 20°C, segundo metodologia recomendada pela AOAC. A eficiência foi determinada pela capacidade de redução de 5 ciclos logarítmicos ou maior (ANDRADE, 2008).

A qualidade do ar foi analisada quanto a bactérias aeróbias mesófilas totais, pela metodologia de deposição passiva em placa, utilizando ágar nutriente, a 1m do chão e 1m da parede, utilizando placas abertas de 65cm<sup>2</sup> por 15min incubadas posteriormente a 36°C/24h, conforme metodologia descrita pela APHA (ANDRADE, 2008; PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000).

### 3.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Após estimar a existência de biofilme nas superfícies pela contagem de bactérias mesófilas totais (CBT), próxima a 10<sup>5</sup>, foi determinado o potencial de formação de biofilme pelo método de microplacas, seguindo o protocolo de Stepanovic et al. (2007). Neste método 0,3mL dos *swabs* de superfície foram inoculados em tubos contendo 3mL de caldo BHI, para crescimento da cultura misturada, incubada a 37°C/24h. Após, uma alíquota foi transferida para novo caldo BHI a fim de atingir a densidade óptica (DO<sub>540 nm</sub>) de 0,08 a 0,1, transferindo 200 µL deste meio para microplacas de 96 poços, estéreis, de fundo plano, incubadas sob as mesmas condições. Um controle negativo foi utilizado com o mesmo volume de meio.

Após, o meio foi removido e os poços lavados 3 vezes com 200 µL de solução salina estéril (0,85%) e aplicou-se metanol P.A., por 15 min e em seguida removido; aguardou-se secagem do mesmo em capela. Foi adicionado 200 µL do corante cristal violeta 1%, por 5 min e na sequência lavou-se os poços, novamente, com 200 µL de solução salina estéril (0,85%). Por fim, adicionou-se 200 µL de uma solução de ácido acético glacial (33%) e realizou-se a medida a densidade óptica (DO<sub>540 nm</sub>) em leitor de microplacas. A análise dos resultados foi realizada conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação da capacidade de formação de biofilme pela medida da densidade óptica ( $DO_{540\text{ nm}}$ ), utilizando o método de microplacas com o corante cristal violeta.

<b>Classificação</b>	<b>Leitura</b>
Não produtor de biofilme	$DO\text{ isolado} \leq DO\text{ controle}$
Fraco produtor de biofilme	$DO\text{ controle} < DO\text{ isolado} \leq 2 \times DO\text{ controle}$
Moderado produtor de biofilme	$2 \times DO\text{ controle} < DO\text{ isolado} \leq 4 \times DO\text{ controle}$
Forte produtor de biofilme	$4 \times DO\text{ controle} < DO\text{ isolado}$

Fonte: Adaptado de STEPANOVIC et al., 2007.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA LISTA DE VERIFICAÇÃO BASEADA NA RDC Nº 275

Após aplicação da lista de verificação e da reunião com a equipe avaliadora, os seguintes itens foram considerados imprescindíveis, ou seja, itens críticos e que necessitam de correção imediata:

- Lavatórios da área de manipulação;
- Existência de um responsável pela operação de higienização, bem como frequência e adequação da higienização;
- Produtos de higiene aprovados pelo Ministério da Saúde e utilizados nas concentrações adequadas;
- Qualidade da água utilizada nos processos de higienização;
- *Layout* adequado ao processo produtivo, com fluxo de produção ordenado, linear e sem cruzamento;
- Superfícies em contato com alimentos lisas, íntegras, impermeáveis, resistentes à corrosão, de fácil higienização e de material não contaminante e em adequado estado de conservação e funcionamento;
- Existência de programa de capacitação adequado e contínuo relacionado à higiene pessoal e à manipulação dos alimentos;
- Seleção das matérias-primas baseados na segurança do alimento e inspecionados na recepção;
- Rede de frio adequada ao volume e aos diferentes tipos de matérias-primas e ingredientes.

A Tabela 3 apresenta o número de itens avaliados, sendo divididos em itens não aplicáveis, itens conformes, itens não conformes e o número de itens imprescindíveis, de acordo com cada bloco. A partir destes resultados, usando as equações 1 a 6, pode-se classificar o nível das boas práticas que estavam sendo aplicadas no laticínio, conforme resultados apresentados a Tabela 4.

Tabela 3 – Resultados obtidos com a aplicação da lista de verificação da RDC N° 275 no laticínio.

<b>Bloco</b>	<b>Número de itens</b>	<b>Itens não aplicáveis</b>	<b>Itens conformes</b>	<b>Itens não conformes</b>	<b>Itens imprescindíveis</b>
<b>Edificações e instalações</b>	79	10	39	30	17
<b>Equipamentos, móveis e utensílios</b>	21	0	14	7	11
<b>Manipuladores</b>	14	4	8	2	5
<b>Produção e transporte do alimento</b>	33	3	23	7	12
<b>Documentação</b>	17	7	3	7	1
<b>Total</b>	<b>164</b>	<b>24</b>	<b>87</b>	<b>53</b>	<b>46</b>

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Avaliação quantitativa da lista de verificação.

<b>Bloco</b>	<b>Pontuação do bloco (PB)</b>	<b>Itens imprescindíveis (%I)</b>	<b>Peso do bloco (W)</b>	<b>Pontuação Ponderada do Bloco (PPB)</b>	<b>Pontuação Ponderada do Estabelecimento (PPE)</b>	<b>Contribuição percentual do bloco (%PPE)</b>
<b>Edificações e instalações</b>	0,57	21,52	14,17	8,01	69,34	11,55
<b>Equipamentos, móveis e utensílios</b>	0,67	52,38	34,49	23,00		33,16
<b>Manipuladores</b>	0,80	35,71	23,52	18,81		27,13
<b>Produção e transporte do alimento</b>	0,77	36,36	23,95	18,36		26,48
<b>Documentação</b>	0,30	5,88	3,87	1,16		1,68

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com o resultado da PPE, o laticínio analisado foi classificado como regular (TOMICICH et al., 2005). Como pode ser observado, os blocos “manipuladores”, “equipamentos móveis e utensílios” e “produção e transporte do alimento” foram os que apresentaram maior peso e, portanto, maior contribuição percentual, pois estes foram os que apresentaram também o maior número de itens imprescindíveis. Estes resultados se assemelharam aos encontrados por Santos e Hoffmann (2010) e por Dias et al. (2012), que avaliaram um estabelecimento produtor de queijos minas frescal e ricota, em São Paulo, e uma fábrica de queijo mussarela, no Paraná, respectivamente, também classificados como regulares. Outro ponto em comum destes trabalhos foi que o bloco referente aos manipuladores esteve em destaque por apresentar elevado número de inconformidades em todos eles.

Como forma de corrigir estes problemas poderiam ser realizados treinamentos com os funcionários, criação de POPs (Procedimentos Operacionais Padronizados), reformulação dos procedimentos de higienização e realização de reformas e adequações nas instalações do laticínio.

#### 4.2 ANÁLISE DOS INDICADORES DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA

Os pontos de coleta das amostras, para verificação da qualidade microbiológica do laticínio foram escolhidos de acordo com os resultados da análise das BPF, com observações adicionais, realizadas durante a avaliação do laticínio, que incluíram: (i) presença de poeira na área externa, (ii) paredes sem revestimento impermeável, (iii) porta da câmara fria sem vedação adequada, (iv) janela e portas quebradas e/ou com ferrugem, (v) alguns lavatórios sem sabonete líquido, (vi) produtos de limpeza armazenados em local inadequado, (vii) encanamentos concertados com material impróprio, (viii) embalagens armazenadas em local inadequado, (ix) ausência de *pallets* e (x) falta da aplicação de uma ferramenta organizacional. Por este motivo, os itens considerados imprescindíveis, para os três blocos que apresentaram o maior PPE na avaliação do estabelecimento, foram selecionados para a realização das análises microbiológicas. O Quadro 1 apresenta os pontos onde foram coletadas as amostras, bem como, as respectivas análises microbiológicas escolhidas para serem realizadas em cada ponto.

Quadro 1 – Pontos selecionados para coleta das amostras e respectivas análises microbiológicas.

Bloco		Ponto	Análises
1º	Equipamentos, móveis e utensílios	Tanque do caminhão	CBT*; <i>Enterococcus</i> ; Coliformes a 35 e 45°C; Enterobactérias; Formação de biofilmes.
		Tubulação do caminhão	
		Resfriador	
		Tubulação anterior ao pasteurizador	
		Tubulação posterior ao pasteurizador	
		Tanque pulmão	
		Teste do poder desinfetante dos produtos utilizados na higienização	Teste de suspensão (Padrões: <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> ).
2º	Manipuladores	Swab de mãos de todos os manipuladores	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .
		Área de lavagem das mãos	CBT*.
3º	Produção e transporte do alimento	Leite cru – caminhão	CBT*; Coliformes a 35 e 45°C; Enterobactérias; <i>Salmonella</i> .
		Leite cru – resfriador	
		Leite pasteurizado	
		Embalagem vazia antes e após passar pela luz UV	CBT*
		Água	Coliformes a 35 e 45°C; Enterobactérias
		Ar	Aeróbios mesófilos

\*CBT: Bactérias mesófilas totais.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos para as análises do primeiro bloco, com exceção do teste do poder desinfetante, estão apresentados na Tabela 5, onde se observa que as bactérias mesófilas totais (CBT) e os *Enterococcus* foram encontrados em maior número na tubulação do caminhão ( $6,50 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $2,01 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>), no resfriador ( $6,33 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $8,02 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>) e na tubulação anterior ao pasteurizador ( $3,87 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $6,67 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>), onde havia possível formação de biofilme, pela contagem encontrada.

Tabela 5 – Enumeração de bactérias mesófilas totais (CBT), *Enterococcus*, coliformes a 35 e 45°C e enterobactérias em diferentes superfícies de equipamentos do laticínio.

Amostra	Microrganismos				
	CBT (UFC/cm <sup>2</sup> )	<i>Enterococcus</i> (UFC/cm <sup>2</sup> )	Coliformes a 35°C (NMP/cm <sup>2</sup> )	Coliformes a 45°C (NMP/cm <sup>2</sup> )	Enterobactérias (UFC/cm <sup>2</sup> )
Tanque do caminhão	$4,57 \times 10^3$	$7,98 \times 10^1$	$1,43 \times 10^2$	$3,33 \times 10^{-1}$	$3,03 \times 10^2$
Tubulação do caminhão	$6,50 \times 10^4$	$2,01 \times 10^2$	$1,87 \times 10^3$	0,00	$2,49 \times 10^3$
Resfriador	$6,33 \times 10^4$	$8,02 \times 10^2$	$1,07 \times 10^2$	0,00	$6,35 \times 10^1$
Tubulação anterior ao pasteurizador	$3,87 \times 10^4$	$6,67 \times 10^4$	$6,26 \times 10^2$	0,00	$1,53 \times 10^3$
Tubulação posterior ao pasteurizador	$4,49 \times 10^1$	$6,67 \times 10^1$	0,00	0,00	$1,73 \times 10^0$
Tanque pulmão	$4,12 \times 10^1$	$2,60 \times 10^0$	0,00	0,00	0,00

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores encontrados para CBT, neste trabalho, foram superiores aos encontrados por Costa et al., (2006) na superfície do resfriador ( $3,09 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>) e inferiores aos encontrados por estes mesmos autores na superfície do tanque pulmão ( $1,07 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>), sendo que ambos os trabalhos avaliaram seis superfícies e a média da contagem bacteriana total foi de  $1,33 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $28,61 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>, para Costa et al. (2006) e para o trabalho em questão, respectivamente. Esta diferença pode ser devido a contaminação da matéria-prima, procedimentos de higienização, concentração dos detergentes e sanitizantes utilizados, condições do ambiente de processamento, manipuladores, equipamentos, dentre outros (ANDRADE, 2008).

O tanque do caminhão ( $4,57 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $7,98 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>), a tubulação posterior ao pasteurizador ( $4,49 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $6,67 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>) e o tanque pulmão ( $4,12 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $2,60 \times 10^0$  UFC/cm<sup>2</sup>) apresentaram baixas contagens, provavelmente devido aos procedimentos de limpeza e por estarem melhor protegidos, na área interna do laticínio, sendo higienizados antes e após o uso. Os itens que apresentaram a provável formação de biofilme se localizavam na área externa, onde a higienização era mais difícil e não eram higienizados com a mesma frequência, permanecendo longo tempo em contato com o resíduo do leite cru (CARELI et al., 2009).

Vários tipos de materiais utilizados na indústria de alimentos podem promover a aderência bacteriana, como o aço, vidro, polipropileno, polietileno de baixa densidade e policarbonato (BLACKMAN; FRANK, 1996 apud PARIZZI et al., 2004; FLINT et al.; 1997 apud PARIZZI et al., 2004; KUMAR; ANAND, 1998; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Estas

superfícies que ficam em contato com os alimentos podem apresentar imperfeições e rugosidades, as quais são suficientes para abrigar microrganismos e quando isso ocorre em áreas com dificuldade de acesso pode diminuir a eficiência dos procedimentos de limpeza. O crescimento dos microrganismos, nestas imperfeições, leva ao desenvolvimento dos biofilmes, devido ao estabelecimento de processos de aderência, podendo ser encontrado um grande número de microrganismos (CARELI et al., 2009), como mostram as contagens encontradas neste trabalho.

Dentre os microrganismos que tem a capacidade de aderir em superfícies encontra-se o gênero *Enterococcus* que são encontrados em leite e derivados, além de outros tipos de alimentos (ROSADO, 2009). O leite é um dos principais reservatórios deste gênero, pois pode se contaminar devido a sua presença no meio ambiente, ao material fecal dos animais, ou do contato humano (DELPECH et al., 2013), água poluída, equipamentos utilizados na ordenha e nos tanques de recepção (PORTO et al., 2016). Portanto, a contaminação ambiental, associada aos procedimentos de limpeza são os fatores que provavelmente influenciaram na obtenção de uma maior contagem na área externa.

O biofilme é um complexo formado por múltiplas bactérias com capacidade de aderência, que produzem substâncias exopolissacarídicas que as protegem contra agentes antimicrobianos, aumentando sua capacidade de sobrevivência (CHAI et al., 2008; GEORGE; KISHEN; SONG, 2005). Nos *Enterococcus* a expressão do gene *Agg*, que expressa uma proteína de agregação está sendo relacionada com esta capacidade de aderência (CASSENEGO et al., 2013). As contagens de *Enterococcus* foram maiores nos pontos que apresentaram as maiores contagens de CBT, o que indica a possível presença de biofilme. Isto pode representar um perigo à saúde pública, pois os *Enterococcus* podem abrigar genes de produção de hemolisina, DNase, termonuclease e gelatinase e de fatores de virulência como, para resistência a antibiótico, produção de adesinas, substâncias de agregação e proteínas de superfície (PORTO et al., 2016).

Já para os coliformes a 35°C e as enterobactérias as maiores contagens foram na tubulação do caminhão ( $1,87 \times 10^3$  NMP/cm<sup>2</sup> e  $2,49 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>) e na tubulação anterior ao pasteurizador ( $6,26 \times 10^2$  NMP/cm<sup>2</sup> e  $1,53 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>), seguidos do tanque do caminhão ( $1,43 \times 10^2$  NMP/cm<sup>2</sup> e  $3,03 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>) e do tanque resfriador ( $1,07 \times 10^2$  NMP/cm<sup>2</sup> e  $6,35 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>), enquanto na tubulação posterior ao pasteurizador e no tanque pulmão não houve contagem significativa, similarmente ao que ocorreu com os coliformes a 45°C para todos os pontos, salvo para o tanque do caminhão ( $3,33 \times 10^{-1}$  NMP/cm<sup>2</sup>).

A Tabela 6 apresenta os resultados das análises microbiológicas do leite, como pode ser observado, o leite cru não apresentou contagem de coliformes a 45°C, logo, pode-se sugerir que os coliformes estão provavelmente aderidos ao biofilme, resultantes de contaminação de cargas anteriores e que não foram removidos no processo de higienização do tanque.

O contato do alimento com superfícies inertes, onde há aderência bacteriana, pode resultar em contaminação dos mesmos, o que aumenta o risco de disseminação de doenças (BOWER; MCGUIRE; DAESCHEL, 1996; HOOD; ZOTTOLA, 1997; JEONG; FRANK, 1994; KUMAR; ANAND, 1998; STICKLER, 1999; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994), no entanto, salvo para o tanque do caminhão, não foram encontrados indicadores da presença de microrganismos patogênicos, mas os resultados comprovam que o risco existia.

Tabela 6 - Enumeração de bactérias mesófilas totais (CBT), coliformes a 35 e 45°C, enterobactérias e *Salmonella* em leite cru, coletado do caminhão e do tanque resfriador, e em leite pasteurizado produzido no laticínio.

Amostra	Microrganismos				
	CBT (UFC/mL)	Coliformes a 35°C (NMP/mL)	Coliformes a 45°C (NMP/mL)	Enterobactérias (UFC/mL)	<i>Salmonella</i> (UFC/mL)
<b>Leite cru (caminhão)</b>	$1,66 \times 10^7$	$8,87 \times 10^2$	0,00	$1,97 \times 10^5$	Ausente
<b>Leite cru (resfriador)</b>	$3,54 \times 10^6$	$7,64 \times 10^2$	0,00	$1,05 \times 10^5$	Ausente
<b>Leite pasteurizado</b>	$1,26 \times 10^4$	0,00	0,00	0,00	Ausente

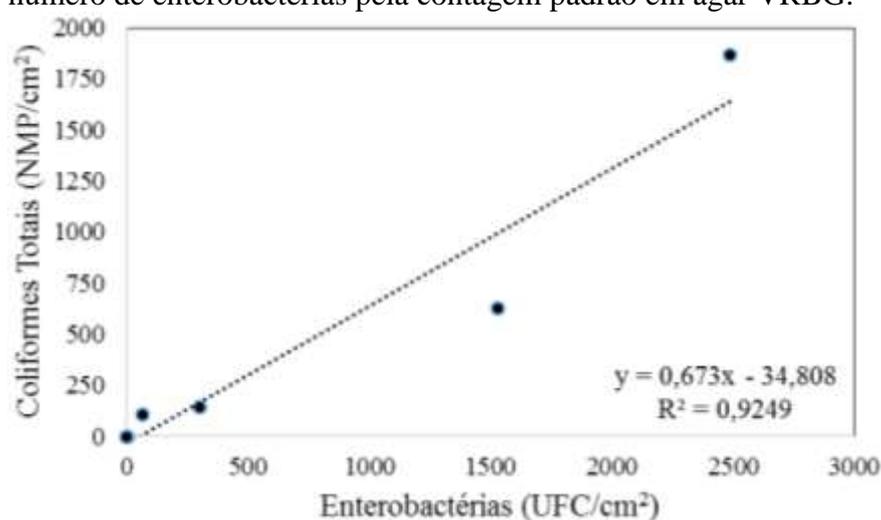
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores encontrados para coliformes podem ser comparados com os de Silva et al. (2011), que avaliaram os equipamentos e utensílios utilizados em dez laticínios da região do Rio Pomba, em Minas Gerais, e encontraram uma média de  $1,49 \times 10^3$  NMP/cm<sup>2</sup> para coliformes a 35°C e  $4,46 \times 10^2$  NMP/cm<sup>2</sup> para coliformes a 45°C. Enquanto que no presente trabalho as médias para coliformes a 35 e 45°C foram  $4,58 \times 10^2$  NMP/cm<sup>2</sup> e  $5,55 \times 10^{-2}$  NMP/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Desta forma, nota-se que as contagens de coliformes a 35°C foram semelhantes em ambos os trabalhos, no entanto, a contagem de coliformes a 45°C foi bem inferior as apresentadas no trabalho de Silva et al. (2011), indicando que no laticínio investigado, o risco de contaminação por *Escherichia coli* foi menor. A contagem de coliformes a 35°C foi elevada, no entanto, isto não significa que havia contaminação fecal ou presença de enterobactérias patogênicas (FRANCO; LANDGRAF, 2008), mas indica que os processos de

obtenção da matéria-prima, higienização do ambiente e dos equipamentos precisam ser revisados e melhorados.

A fim de verificar a relação entre a contagem de enterobactérias e de coliformes a 35°C nas superfícies, realizou-se análise de correlação, onde se obteve, conforme pode ser observado na Figura 1, um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,9249, considerado bom, uma vez que Beloti et al., (2015) afirmam que coeficientes de correlação superiores 0,90 indicam forte correlação entre os dados. Este resultado já era esperado, pois o grupo *Enterobacteriaceae* já tem sido utilizado em muitos países, principalmente da Europa, como substituto do grupo coliformes, no que diz respeito aos indicadores de qualidade higiênico-sanitária de indústrias do ramo alimentício.

Figura 1 – Comparação entre o número de coliformes totais (a 35°C) pelo método NMP e o número de enterobactérias pela contagem padrão em ágar VRBG.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo a Instrução Normativa nº 62 (IN 62), que aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado, as contagens de CBT, no leite cru (caminhão:  $1,66 \times 10^7$  UFC/mL e resfriador:  $3,54 \times 10^6$  UFC/mL), estão acima do permitido, que é de  $1 \times 10^5$ , no entanto, após a pasteurização ( $1,26 \times 10^4$  UFC/mL), o leite está dentro do limite estabelecido pela normativa para CBT ( $m=4 \times 10^4$ ,  $M=8 \times 10^4$ ), o mesmo ocorreu para os coliformes a 30/35°C ( $m=2$  e  $M=4$ ) e 45°C ( $m=1$  e  $M=2$ ) e *Salmonella* spp/25mL ( $m$ =ausência), sendo considerado portanto, aceitável.

De acordo com Venturini, Sarcinelli e Silva (2007), a pasteurização do leite deve eliminar os microrganismos patogênicos e reduzir a contagem dos microrganismos

deteriorantes, aumentando assim a sua vida útil, sem alterar a composição nutricional e sensorial do mesmo. No entanto, mesmo que a pasteurização tenha tornado o leite seguro, a contagem acima do previsto para a legislação pode trazer riscos à saúde do consumidor, logo, os procedimentos de obtenção, coleta e transporte deverão ser revisados.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores médios de contagens de bactérias mesófilas totais (CBT), coliformes a 35 e 45°C em leite cru e pasteurizado encontrados por diversos autores, em várias regiões do Brasil.

Tabela 7 – Contagens de bactérias mesófilas totais (CBT), coliformes a 35 e 45°C em leite cru e pasteurizado encontrados por diversos autores.

CBT (UFC/ml)	Coliformes a 35°C (NMP/mL)	Coliformes a 45°C (NMP/mL)	Local	Autores
<b>Leite cru</b>				
$6,43 \times 10^5$	-	-	Região central do Paraná (ordenha manual)	(VALLIN et al., 2009)
$1,69 \times 10^6$	-	-	Região central do Paraná (ordenha mecânica)	
$1,68 \times 10^7$	$>10^6$	-	Agreste de Pernambuco	(MATTOS et al., 2010)
$2,94 \times 10^5$	-	-	Região oeste do Paraná	(BERSOT et al., 2010)
$1,39 \times 10^4$	60,88	26,85	Região leste do Rio Grande do Sul	(SILVA et al., 2010b)
$1,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^5$	-	Agreste de Pernambuco	(MATSUBARA et al., 2011)
$2,57 \times 10^4$	-	-	Curitiba - Paraná	(SHIRAI et al., 2011)
$1,28 \times 10^3$	-	-	Patos de Minas-MG	(NASCENTES; ARAÚJO, 2012)
$9,12 \times 10^4$	$9,88 \times 10^2$	$2,87 \times 10^2$	Região oeste do Paraná	(ALFONZO et al., 2012)
$3,23 \times 10^6$	-	-	Região sul do Rio Grande do Sul	(PICOLI et al., 2014)
$3,8 \times 10^6$	-	-	Estado do Paraná (Pequenos produtores)	(RIBEIRO JUNIOR et al., 2015)
$1,5 \times 10^4$	-	-	Estado do Paraná (Grandes produtores)	
<b>Leite pasteurizado</b>				
$1,91 \times 10^5$	10,78	-	Viçosa- MG	(CARVALHO; FREITAS; CAMPOS, 2003)
$3,42 \times 10^4$	22,63	1,23	Região leste do Rio Grande do Sul	(SILVA et al., 2010b)
$6,4 \times 10^2$	Presença em 33,33% das amostras		Apucarana-PR e região	(SALVADOR et al., 2012)
$1,8 \times 10^2$	-	-	Patos de Minas-MG	(NASCENTES; ARAÚJO, 2012)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme apresentado na Tabela 7, Vallin et al. (2009) observaram que a ordenha mecânica implicou em contagens superiores a ordenha manual para CBT, sendo que 45,65% das amostras analisadas apresentaram contagens superiores às permitidas pela legislação. Além disso, os autores citam que as maiores médias foram encontradas no leite resfriado em tanques de expansão e em tanques de imersão e ressaltam que a variação do tempo e da temperatura de

armazenamento do leite, ainda na propriedade, e a higienização inadequada influenciaram diretamente na qualidade do leite cru refrigerado.

Picoli et al. (2014) avaliaram o manejo de ordenha como fator de risco em leite cru, produzido no estado do Paraná, e observaram diferença significativa entre ordenha manual e mecânica, secagem dos tetos com papel toalha, pano ou nenhum, e se a técnica de *pré-dipping* (antisepsia dos tetos realizada antes da ordenha), era realizada ou não. Ribeiro Junior et al. (2015), compararam a qualidade microbiológica do leite cru produzido por pequenos e grandes produtores, também no Paraná, e observaram que o nível de contaminação do leite foi consideravelmente superior no leite produzido por pequenos produtores.

Mattos et al. (2010) e Matsubara et al. (2011) avaliaram a qualidade do leite no agreste pernambucano e ambos encontraram valores superiores aos exigidos pela IN 62 do MAPA, para CBT. Mesmo que esta apresente diretrizes mais flexíveis para as regiões Norte e Nordeste, os autores encontraram ainda valores elevados de coliformes a 35°C, indicando que as condições higiênicas de obtenção do leite não foram satisfatórias. De acordo com Mattos et al. (2010) isto se deve às altas temperaturas da região e as dificuldades de escoamento da produção, além disso, a maioria das propriedades apresentavam alta contaminação durante a ordenha.

Não há especificações para coliformes a 35 e 45°C em leite cru na legislação, no entanto Murphy (1997) apud Alfonzo et al. (2012) e Chambers (2002) apud Mattos et al. (2010) consideram valores limite para coliformes a 35°C, de  $1,0 \times 10^3$  UFC/mL e  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL, respectivamente. Sendo assim, as amostras do agreste de Pernambuco foram as que apresentaram maiores contaminações e estavam fora dos limites sugeridos pelos dois autores. Já as amostras coletadas região Sul, que foram submetidas à análise de coliformes a 35°C, as da região leste do Rio Grande do Sul estavam de acordo com os limites dos dois autores, enquanto que a da região oeste do Paraná estavam entre os valores sugeridos, como os valores obtidos neste trabalho.

Conforme já apresentado, os resultados de CBT e de coliformes a 35 e 45°C, para leite pasteurizado, estão de acordo com a IN 62, de forma semelhante a maioria dos trabalhos apresentados na Tabela 7. Com os dados apresentados nesta tabela é possível notar que com o passar dos anos os níveis de contaminação vem diminuindo gradualmente, este fato, muito provavelmente, está associado a IN 62, que estabeleceu limites mais rigorosos para as contagens em leite cru, o que implica diretamente na qualidade do leite pasteurizado.

A contagem de enterobactérias (Tabela 6) foi superior a contagem de coliformes a 35°C, indo ao encontro dos dados apresentados por Hervert et al. (2016), que explicam que a utilização da família *Enterobacteriaceae* como indicador do estado higiênico dos produtos

láceos e de ambientes de processamento é mais eficiente, quando comparada com o grupo coliformes, já que seus estudos provaram que até 100% dos coliformes são detectados por este método, além de detectar a presença de outros patógenos como *Yersinia*, *Salmonella* e *Shigella*.

O valor médio obtido para esta análise ( $1,51 \times 10^5$ ) está muito próximo do encontrado por Picoli et al., (2014), que avaliaram amostras de leite cru oriundas de propriedades leiteiras da região sul do Rio Grande do Sul, onde a média obtida foi de  $3,96 \times 10^5$ , sendo que 27,8% correspondia a *Escherichia coli*, o que é preocupante já que qualquer falha no tratamento térmico pode implicar em prejuízos à saúde do consumidor, devido a patogenicidade deste microrganismo.

Não há uma legislação que indique um limite máximo aceitável para enterobactérias, no entanto, sua presença indica falhas no processo de produção e armazenamento do leite, e assim como os coliformes, algumas enterobactérias são patogênicas e representam risco para a saúde pública (FRANCO; LANDGRAF, 2008; OLIVEIRA et al., 2012). Portanto, trabalhos que enfoquem a análise de enterobactérias em leite poderão colaborar para a consolidação de novos métodos oficiais de indicadores de contaminação.

Quanto à *Salmonella* todas as amostras de leite, tanto cru, quanto pasteurizado, apresentaram ausência, o que foi considerado adequado, uma vez que a presença de *Salmonella* no leite pode causar toxinfecções alimentares graves. Portanto, as amostras atenderam as legislações em vigor, tanto a RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001) quanto a IN 62 do MAPA (2011). Mesmo que haja exigência legal para a investigação da presença deste microrganismo no leite, a incidência deste é baixa, conforme observada por outros autores: Oliveira (2005), Oliveira (2009), Mattos et al. (2010), Salvador et al. (2012) e Oliveira et al. (2013).

Após pasteurizado o leite deve ser envasado em embalagens estéreis, para isso, a embalagem entra em contato com uma luz que emite radiação UV, capaz de eliminar os microrganismos, e em seguida o leite é adicionado à embalagem, a qual é selada e encaminhada para a câmara fria. A contagem bacteriana total no interior das embalagens, antes e após passar pela luz UV, foi de  $8,67 \times 10^{-1}$  e  $1,40 \times 10^1$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Esta elevação na contagem pode ser devido à contaminação do ar da sala de processamento e, principalmente, por haver resquícios de leite nas embalagens coletadas após a passagem pela luz UV, uma vez que foram coletadas durante o processamento e o operador precisava parar o envase para coletar a amostra de embalagem vazia. No entanto, como a CBT do leite, no final do processo estava de acordo com a IN 62, pode-se considerar que o procedimento realizado está sendo suficiente para a garantir a qualidade final do produto.

Com base no exposto, pode-se afirmar que a qualidade microbiológica do leite pasteurizado depende, principalmente, da qualidade do leite cru, que por sua vez está diretamente ligada a fatores como: tamanho da propriedade, tipo de manejo no momento da ordenha, tipo do tanque resfriador nas propriedades leiteiras, controle do tempo de armazenamento e temperatura; e procedimentos de higienização inadequados tanto na propriedade, quanto no laticínio, que podem propiciar o crescimento bacteriano, podendo contaminar o leite.

O sanitizante utilizado na indústria era o Peracetyc EQ®. Foram testadas duas concentrações, a indicada pelo fabricante e a normalmente utilizada no laticínio: 0,3% e 0,02%, respectivamente, sendo o sanitizante eficiente, contra os padrões utilizados e em ambas as concentrações testadas. Estes resultados vão de encontro aos apresentados por Beltrame (2009), que testou a eficiência de quatro sanitizantes: ácido peracético, clorexedina, quaternário de amônio e uma mistura de ácidos orgânicos, em diferentes concentrações, temperaturas e tempo de contato em relação à quatro bactérias reconhecidas como problema para a indústria alimentícia, *Salmonella* sp., *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes*. O ácido peracético foi o sanitizante que obteve melhor eficiência na menor concentração testada (0,2%) e no menor tempo de contato (2 min) a 10°C, como também em testes realizados em planta industrial, através da contagem total de mesófilos na superfície, mesmo em concentrações e tempos abaixo dos recomendados pelos fornecedores, além de apresentar a melhor relação custo benefício e ser indicado para controle de todos os microrganismos testados.

O ácido peracético comercial é composto por uma mistura de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo. Este sanitizante age contra um grande espectro de microrganismos, dentre eles: bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, vírus e esporos bacterianos. Além disso, apresenta a vantagem de não ser agressivo ao meio ambiente, já que se decompõe em ácido acético e a água (ANDRADE, 2008). No entanto, mesmo que seja considerado eficiente e seguro, o mesmo deve ser utilizado nas concentrações recomendadas, a fim de evitar riscos à produção. A constatação que o laticínio utilizava uma concentração menor que a recomendada, pode explicar os resultados de CBT encontradas nas superfícies, pois pode não ter sido suficiente para evitar a possível formação de biofilmes.

No que diz respeito aos manipuladores, as contagens de *Staphylococcus aureus* foram de  $7,50 \times 10^2$  e  $5,00 \times 10^2$  UFC/mão, valores superiores ao recomendado pela APHA e por Andrade (2008), que sugerem como ideal valores inferiores a  $10^2$  UFC/mão. No entanto, são inferiores a alguns dos valores obtidos por Silva (2006) ao avaliar uma unidade de alimentação,

e que foram facilmente reduzidos após treinamento dos manipuladores, o que poderá ser uma sugestão para minimizar o problema.

Estes resultados podiam também estar relacionados à ausência de sabonete líquido em algumas saboneteiras, e ao fato de que um dos manipuladores além de executar tarefas na linha de produção, também realizava tarefas na área externa, nos setores de recebimento da matéria-prima e no laboratório. Este tipo de conduta está em desacordo com as BPF, o que pode ocasionar a contaminação da linha de produção.

A contaminação do ar também é um fator importante que pode levar a contaminação da linha de produção. De acordo com a APHA o número de aeróbios mesófilos não deve exceder 30 UFC/cm<sup>2</sup> semana, e de acordo com Andrade (2008) não deve ser superior a  $1 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> semana, no entanto no laticínio em questão foram obtidos valores superiores a estas duas referências para área de produção (225 UFC/cm<sup>2</sup> semana) e foi aceitável para a área de lavagem das mãos, na entrada para a área interna (91,4 UFC/cm<sup>2</sup> semana).

Salustiano et al. (2003), também avaliaram a qualidade do ar da área de processamento de um laticínio utilizando a técnica de sedimentação e obtiveram uma contagem média de aeróbios mesófilos de 73,6 UFC/cm<sup>2</sup> semana para a sala de pasteurização do leite. Os autores justificaram este valor, superior ao recomendado pela APHA, pela presença de manipuladores na área de produção, responsabilizando-os pela alta contaminação do ar, uma vez que cada manipulador é capaz de espalhar entre 20 e 70 microrganismos/min, o que também ocorria no laticínio investigado neste trabalho. Além disso, outros fatores podem ter contribuído para a contaminação do ar como: o laticínio se localizar ao lado de uma via de acesso não pavimentada ocasionando poeira no seu entorno, falta de um sistema de ventilação e falhas na vedação de janelas e portas.

De acordo com Chaves et al. (2011), as características climáticas e geográficas podem influenciar na microbiota ambiental existente, sendo diferente entre os países, e por isso a recomendação da APHA pode ser considerada rígida demais para os estabelecimentos brasileiros. Ainda de acordo com estes autores, a APHA e outros trabalhos devem ser utilizados apenas como referência, não havendo a necessidade de seguir estes valores à risca pois cada agroindústria possui suas especificidades, sendo indicado que cada agroindústria estabeleça seus próprios parâmetros de qualidade dentro das condições oferecidas, mas sempre mantendo as contagens o mais baixo possível.

A qualidade do ar na área de processamento pode influenciar diretamente na qualidade microbiológica do leite, uma vez que os produtos lácteos são extremamente susceptíveis à contaminação por microrganismos, tanto patogênicos, quanto deteriorantes, devido a sua

composição. O ar pode ser um veículo de contaminação por bactérias, bolores, leveduras e vírus, portanto faz-se necessária a desinfecção química regular do ar ambiente, principalmente nas áreas mais críticas da indústria (RADHA; NATH, 2014), além da necessidade de pavimentar toda a área ao redor do laticínio. Durante a visita foi constatado que as paredes não eram lavadas com regularidade, o que não está de acordo com o recomendado pelas BPF e pode ter contribuído também para estes resultados.

Outro fator importante para garantir a segurança do alimento produzido é a qualidade da água utilizada nos processos de higienização dos equipamentos e instalações. Por este motivo realizou-se a análise de coliformes a 35 e 45°C e de enterobactérias na água, obtendo-se 3,73 NMP/mL de coliformes a 35°C e ausência de coliformes a 45°C e enterobactérias. Este resultado já era esperado, pois o laticínio realiza cloração da água e realizam monitoramento da qualidade diariamente.

Os resultados obtidos para coliformes a 35°C (3,73 NMP/mL) estão de acordo com a Portaria N° 518, do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004, que estabelece em seu Art. 11, §9:

Em amostras individuais procedentes de poços, fontes, nascentes e outras formas de abastecimento sem distribuição canalizada, tolera-se a presença de coliformes totais, na ausência de *Escherichia coli* e, ou, coliformes termotolerantes, nesta situação devendo ser investigada a origem da ocorrência, tomadas as providências imediatas de caráter corretivo e preventivo e realizada nova análise de coliformes (BRASIL, 2004, p.7).

A quantidade de coliformes a 35°C presentes nas amostras foram superiores aos valores obtidos por Alfonzo et al. (2012) nas 24 propriedades leiteiras, localizadas em municípios da região oeste do Paraná, no entanto, a contagem de coliformes a 45°C foi inferior. Ainda de acordo com estes autores, mesmo estando fora dos padrões estabelecidos em legislações, a presença de coliformes a 35 e 45°C é muito comum tanto na água utilizada para higienização dos tetos e utensílios nas propriedades leiteiras, quanto nas indústrias processadoras de leite.

Estes resultados provam que o leite produzido não apresentava risco à saúde dos consumidores, pois apresentava condição microbiológica aceitável, segundo a legislação vigente, no entanto, ficou comprovado que o processo estava em risco, pois algumas modificações e procedimentos terão que ser adotados a fim de minimizar os problemas. Com isso, pode-se afirmar, que a análise microbiológica está de acordo com a análise realizada de forma teórica, utilizando a lista da verificação das BPF, pois para ambas as avaliações, o laticínio poderia ser considerado regular, ou seja, havia riscos, com isso medidas corretivas

deveriam ser adotadas. Logo, constatou-se que com o uso correto da lista de verificação da RDC n° 275 obtêm-se resultados seguros sobre o estabelecimento que está sendo avaliado.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Como na investigação dos indicadores da qualidade microbiológica do laticínio foi verificado, em alguns pontos, contagem indicativa de formação de biofilmes, foi proposto uma metodologia para avaliar o risco desta contaminação, de acordo com a capacidade dos microrganismos presentes na amostragem, de aderir às superfícies. Por este motivo, as culturas mistas coletadas das superfícies dos equipamentos, pela técnica de *Swab*, foram testadas quanto a sua capacidade de formação de biofilmes e classificadas de acordo com a Tabela 2. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Capacidade de formação de biofilmes.

<b>Amostra</b>	<b>Densidade óptica (540nm)</b>	<b>Classificação</b>
<b>Tanque do caminhão</b>	1,650	Forte produtor de biofilme
<b>Tubulação do caminhão</b>	1,607	Forte produtor de biofilme
<b>Resfriador</b>	1,520	Forte produtor de biofilme
<b>Tubulação anterior ao pasteurizador</b>	1,391	Forte produtor de biofilme
<b>Tubulação posterior ao pasteurizador</b>	1,285	Forte produtor de biofilme
<b>Tanque pulmão</b>	0,831	Forte produtor de biofilme
<b>Controle</b>	0,200	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme observado, mesmo os pontos que não indicaram a possível presença de biofilme, pela contagem de CBT, mostraram ser fortes produtores de biofilme. Além disso, o fato de terem sido encontrados *Enterococcus* nestas superfícies, poderia ser considerado um indicativo da possível presença de biofilmes, devido a sua já conhecida capacidade de aderência e agregação. Por este motivo é necessário promover uma higienização eficiente dos equipamentos, para assim, garantir e manter a qualidade da matéria prima e do produto acabado. Segundo Miguel et al. (2014), um dos problemas recorrentes nos laticínios é a recontaminação do leite pela presença de biofilmes em tanques de armazenamento e trocadores de calor.

No entanto, as operações de higienização muitas vezes são negligenciadas ou não são realizadas da maneira correta, como foi observado para a concentração do sanitizante utilizado,

o que pode levar ao acúmulo de microrganismos e, conseqüentemente, adesão e formação de biofilme. É de suma importância adotar todas as medidas de higiene e sanitização adequadas, pois quando os microrganismos se apresentam na forma de biofilmes, estes podem tornar-se de dez a mil vezes mais resistentes aos efeitos dos sanitizantes utilizados nas indústrias de alimentos (SIMÕES et al., 2006).

Desta forma, a melhor maneira para prevenir a formação de biofilmes é higienizar regularmente e adequadamente as superfícies para evitar que as bactérias iniciem o processo de adesão. Estudos mostram que sanitizantes apresentados na forma de aerossóis são mais efetivos contra biofilmes de microrganismos patogênicos presentes nas linhas de processamento industrial, pois conseguem acessar áreas mais restritas do ambiente e que conseqüentemente são difíceis de serem higienizadas (PARK et al., 2012).

Para promover a ausência de biofilmes nas plantas industriais faz-se necessária a compreensão do conceito de biofilmes microbianos, bem como de sua estrutura, composição e do seu processo de formação, para assim traçar medidas efetivas. As medidas de controle mais eficientes são, além da utilização de um processo de higienização adequado, a adoção de ferramentas de controle de qualidade (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao investigar a condição higiênico-sanitária de uma pequena indústria processadora de leite fluido pasteurizado, notou-se que a lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) forneceu subsídios para a escolha dos pontos a serem avaliados nas análises microbiológicas, bem como na escolha dos microrganismos indicadores. Possibilitando assim realizar um diagnóstico preciso do laticínio através da relação dos dados obtidos por inspeção visual e por meio das análises microbiológicas.

A utilização de enterobactérias como indicadores da qualidade em laticínios é uma técnica viável, prática e que apresenta bons resultados em substituição a técnica tradicional de enumeração de coliformes. Além disso a contagem de *Enterococcus* na superfície dos equipamentos, juntamente com contagens elevadas de CBT fornecem um bom indicativo da presença de biofilmes.

A presença de biofilmes ou de microrganismos fortes produtores de biofilme nas superfícies dos equipamentos é um fator preocupante para os laticínios, pois além de reduzir a eficiência de equipamentos, como trocadores de calor, pode causar contaminação da matéria-prima ou recontaminação do produto final, implicando em prejuízos econômicos para a indústria e para a saúde do consumidor, caso microrganismos patogênicos estejam presentes. Portanto a adoção das BPF e, conseqüentemente, de procedimentos adequados de higienização, são imprescindíveis para o bom funcionamento do laticínio e qualidade do produto final.

Tanto para os resultados obtidos com a aplicação da lista de verificação, quanto para os resultados das análises dos indicadores de contaminação microbiológica pode-se afirmar que a situação do laticínio era regular, ou seja, o produto final se apresentava aceitável de acordo com a legislação vigente, no entanto, o processo encontrava-se em risco, indicando que medidas corretivas deveriam ser realizadas a fim de eliminar tais problemas.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALFONZO, E. P. M. et al. Caracterização microbiológica da qualidade do leite coletado em tanques de expansão. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 388, p. 48–52, 2012.
- ALMEIDA, A. O. DE. **Controle rápido da eficiência e segurança do processo de pasteurização do leite (HTST – High Temperature Short Time)**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”, 2006.
- ANDRADE, N. J. DE. **Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- BELOTI, V. et al. Enumeração de microrganismos psicrotróficos e termodúricos psicrotróficos de leite: comparação de metodologias. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 1, p. 17–23, 2015.
- BELTRAME, C. A. **Avaliação da eficiência de sanitizantes utilizados pelas indústrias de alimentos**. [s.l.] Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2009.
- BERSOT, L. DOS S. et al. Quantificação de microrganismos indicadores de qualidade em leite cru e comportamento da microiota ao longo do transporte. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, n. 373, p. 9–13, 2010.
- BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, 1996.
- BRASIL. **Resolução RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001**, 2001.
- BRASIL. **Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002**, 2003.
- BRASIL. **Portaria N º 518, do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004**, 2004.
- CARELI, R. T. et al. Microtopography and bacterial adherence to food contact surfaces evaluated by scanning electron microscopy and epifluorescence microscopy. **Journal of food Process Engineering**, v. 32, p. 730–742, 2009.
- CARVALHO, A. F. DE; FREITAS, R. DE; CAMPOS, F. M. Qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Viçosa - MG. p. 2–4, 2003.
- CASSENEGO, A. P. V et al. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1433–1440, 2013.
- CASSOLI, L. D. **Validação da metodologia de citometria de fluxo para avaliação da contagem bacteriana do leite cru**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2005.
- CHAI, Y. et al. Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 254–263, 2008.

CHAVES, K. F. et al. Avaliação microbiológica de ambientes de diferentes laticínios da região de Rio Pomba-MG. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 380, p. 11–15, 2011.

COSTA, P. D. et al. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 345–349, 2006.

DELPECH, G. et al. Enterococcus spp. aislados de queso de oveja: resistencia a los antimicrobianos de utilización clínica. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 33, p. 129–133, 2013.

DERAL, D. DE E. R. **Levantamento da produção rural paranaense por município**, 2014.

DIAS, A. M. et al. On the implementation of good manufacturing practices in a small processing unit of mozzarella cheese in Brazil. **Food Control**, v. 24, n. 1–2, p. 199–205, 2012.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, p. 881–890, 2002.

ELMOSLEMANY, A. M. et al. Microbiological quality of bulk tank raw milk in prince edward Island dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4239–4248, 2009.

ERCOLINI, D. et al. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow 's milk. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 228–231, 2009.

EVANS, J. A. et al. Microbial contamination of food refrigeration equipment. **Food Engineering**, v. 62, p. 225–232, 2004.

FARINA, E. M. M. Q. et al. Private and public milk standards in Argentina and Brazil. **Food Policy**, v. 30, p. 302–315, 2005.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCIOSI, E. et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows ' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 3–11, 2009.

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

GENTA, T. M. DE S.; MAURICIO, A. A.; MATIOLI, G. Avaliação das Boas Práticas através de check - list aplicado em restaurantes self - service da região central de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 27, n. 2, p. 151–156, 2005.

GEORGE, S.; KISHEN, A.; SONG, K. P. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by Enterococcus faecalis. **Basic Research-Biology**, v. 31, n. 12, p. 867–872, 2005.

GILLESPIE, B. E. et al. Short communication : evaluation of bulk tank milk microbiological quality of nine dairy farms in tennessee. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4275–4279, 2012.

GILLESPIE, I. A. et al. Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales , 1992 – 2000. **Epidemiology and infection**, v. 130, p. 461–468, 2003.

HERVERT, C. J. et al. Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry. **Journal Dairy Science**, v. 99, p. 7033–7042, 2016.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 145–153, 1997.

IBGE. Produção Pecuária Municipal 2014. v. 42, n. Rio de Janeiro, p. 1–39, 2014.

ICMSF, I. C. ON M. S. FOR F. **Microrganismos em alimentos 8: Utilização de Dados para Avaliação do Controle de processo e Aceitação de Produto**. São Paulo: Blucher, 2015.

JEONG, D. K.; FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 21oC in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 27, p. 415–424, 1994.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry : a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9–27, 1998.

LATORRE, A. A. et al. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. **Journal Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2792–2802, 2010.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. What food professionals should know about bacteria biofilms. **British Food Journal**, v. 108, p. 27–37, 2006.

MARTIN, N. H. et al. A decade of improvement: New York State fluid milk quality. **Journal Dairy Science**, v. 95, 2012.

MASIELLO, S. N. et al. Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. **Journal Dairy Science**, v. 99, p. 130–140, 2016.

MATSUBARA, M. T. et al. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências agrárias**, v. 32, n. 1, p. 277–286, 2011.

MATTOS, M. R. DE et al. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco. **Semina: Ciências agrárias**, v. 31, n. 1, p. 173–182, 2010.

MIGUEL, E. M. et al. Formacao de biofilmes em trocadores de calor e seus efeitos em leite e derivados. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 1, p. 53–64, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, M. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2011** Brasil, 2011.

NARCIZO, D. K.; MONTANHINI, M. T. M. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em leite cru e pasteurizado comercializado em Curitiba, estado do Paraná, Brasil. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 5, p. 341–347, 2014.

NASCENTES, R. M.; ARAÚJO, B. C. DE. Comparação da qualidade microbiológica de leite cru , pasteurizado e UHT comercializados na cidade de Patos de Minas , MG. **Perquirere**, v. 9, n. 1, p. 212–223, 2012.

OLIVEIRA, R. P. DE S. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2005.

OLIVEIRA, C. J. B. ET AL. Risk factors associated with selected indicators of milk quality in semiarid northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 3166–3175, 2011.

OLIVEIRA, A. B. A. DE et al. Avaliação da presença de microrganismos indicadores higiênico-sanitários em alimentos servidos em escolas públicas de Porto Alegre , Brasil Evaluation of the presence of hygienic and sanitary indicator microorganisms in food served in public schools in Po. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 18, n. 4, p. 955–963, 2013.

OLIVEIRA, A. R. C. DE et al. Qualidade microbiológica de doces de leite comercializados no sul de Minas Gerais. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 388, p. 11–14, 2012.

OLIVEIRA, D. C. V. DE. **Análise da qualidade microbiológica em leite pasteurizado , tipo C , recém pasteurizado e na data de validade**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2009.

OLIVEIRA, M. M. M. DE; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos : uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277–284, 2010.

OPIYO, B. A. et al. Microbiological Performance of Dairy Processing Plants Is Influenced by Scale of Production and the Implemented Food Safety Management System : A Case Study. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 6, p. 975–983, 2013.

PAIXÃO, M. G. et al. Socioeconomic and technical assistance factors related to total bacteria count and somatic cell count of milk from bulk tanks in southern Minas Gerais State , Brazil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 7, p. 1241–1248, 2015.

PARIZZI, S. Q. F. et al. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 77–83, 2004.

PARK, S. H. et al. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 130–134, 2012.

PASQUARELLA, C.; PITZURRA, O.; SAVINO, A. The index of microbial air contamination. **Journal of Hospital Infection**, v. 46, p. 241–256, 2000.

PICOLI, T. et al. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de micro- organismos em leite cru. **Semina: Ciências agrárias**, v. 35, n. 4, p. 2471–2480, 2014.

PORTO, B. C. et al. Determinantes de virulência em Enterococcus endógenos de queijo artesanal. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 69–76, 2016.

RADHA, K.; NATH, L. S. Studies on the air quality in a dairy processing plant. **Indian Journal of Veterinary and Animal Sciences Research**, v. 43, n. 5, p. 346–353, 2014.

RANIERI, M. L.; BOOR, K. J. Short communication: Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 92, 2009.

RIBEIRO JUNIOR, J. C. et al. Quality of milk produced by small and large dairy producers. **Semina: Ciências agrárias**, v. 36, n. 2, p. 883–888, 2015.

ROSADO, M. S. **Biofilme de Enterococcus faecium em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2009.

SALUSTIANO, V. C. et al. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 255–259, 2003.

SALVADOR, F. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região. **Revista Fapciência**, v. 9, n. 5, p. 30–41, 2012.

SANTANA, N. G. et al. Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 255–261, 2009.

SANTOS, A. DE L. **Implantação de um procedimento de higienização em uma unidade produtora de queijo minas artesanal na região da canastra avaliação pelo método de ATP-bioluminescência**. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2010.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Avaliação das boas práticas de fabricação em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 222–228, 2010.

SHIRAI, M. A. et al. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo B comercializado na cidade de Curitiba, PR. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 383, p. 27–31, 2011.

SILVA, F. G. **Avaliação da microbiota e formação de biofilme em superfícies de tanques abastecidos com combustíveis de origem fóssil e biocombustíveis**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS, 2011.

SILVA, L. F. **Procedimento operacional padronizado de higienização como requisito para segurança alimentar em unidade de alimentação.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** 4. ed. São Paulo: Varela, 2010a.

SILVA, N. B. N. DA et al. Avaliação microbiológica de equipamentos e utensílios utilizados em laticínios da região de Rio Pomba - MG. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 378, 2011.

SILVA, V. A. DE M. DA et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma Granja Leiteira no RS. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 1, p. 51–57, 2010b.

SIMÕES, M. et al. Control of flow-generated biofilms with surfactants - Evidence of Resistance and Recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 4, p. 338–345, 2006.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, p. 891–899, 2007.

STICKLER, D. Biofilms. **Current Opinion in microbiology**, v. 2, p. 270–275, 1999.

STULOVA, I. et al. Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, p. 683–690, 2010.

TAVOLARO, P.; OLIVEIRA, C. A. F. Evaluation of a GMP training of milkers in dairy goat farms in São Paulo, Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 16, n. 1, p. 81–88, 2006.

TOMICH, R. G. P. et al. METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DAS BOAS PRÁTICAS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 115–120, 2005.

VALLIN, V. M. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências agrárias**, v. 30, n. 1, p. 181–188, 2009.

VARGAS, D. P. DE et al. Qualidade e potencial nutracêutico do leite bovino em diferentes sistemas de produção e estações do ano. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1208–1219, 2015.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Processamento do leite. **Boletim técnico - PIE-UFES:02297**, v. 1, 2007.

WESSELS, D.; JOOSTE, P. J.; MOSTERT, J. F. Psychrotrophic, proteolytic and lipolytic properties of Enterobacteriaceae isolated from milk and dairy products. **Journal of Food Microbiology**, v. 9, p. 79–83, 1989.

WILLERS, C. D. et al. Determination of indirect water consumption and suggestions for cleaner production initiatives for the milk-producing sector in a Brazilian middle-sized dairy farming. **Journal Cleaner Production**, v. 72, 2014.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry - Should they be a concern ? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125–148, 1994.

## 7 ANEXOS

ANEXO I – Fragmento da lista de verificação de boas práticas aplicada no laticínio em 14/09/2016.

Item	Sim	Não	Não aplicável
<b>1. Edificação e instalações</b>			
<b>1.1 Area externa</b>			
1.1.1 Area externa livre de focos de insalubridade, de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente, de vetores e outros animais no pátio e vizinhança; de focos de poeira; de acúmulo de lixo nas imediações, de água estagnada, dentre outros.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.1.2 Vias de acesso interno com superfície dura ou pavimentada, adequada ao trânsito sobre rodas, escoamento adequado e limpas.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>1.2 Acesso</b>			
1.2.1 Direto, não comum a outros usos (habitação).	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>1.3 Area interna</b>			
1.3.1 Area interna livre de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>1.4 Piso</b>			
1.4.1 Material que permita fácil e apropriada higienização (liso, resistente, drenado com declive, impermeável e outros).	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Item	Sim	Não	Não aplicável
1.4.2 Em adequado estado de conservação (livre de defeitos, rachaduras, trincas, buracos e outros).	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.4.3 Sistema de drenagem dimensionado adequadamente, sem acúmulo de resíduos. Drenos, ralos sifonados e grelhas colocados em locais adequados de forma a facilitar o escoamento e proteger contra a entrada de baratas, roedores etc.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>1.5 Tetos</b>			
1.5.1 Acabamento liso, em cor clara, impermeável, de fácil limpeza e, quando for o caso, desinfecção.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.5.2 Em adequado estado de conservação (livre de trincas, rachaduras, umidade, bolor, descascamentos e outros).	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<b>1.6 Paredes e divisórias</b>			
1.6.1 Acabamento liso, impermeável e de fácil higienização até uma altura adequada para todas as operações. De cor clara.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.6.2 Em adequado estado de conservação (livres de falhas, rachaduras, umidade, descascamento e outros).	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
1.6.3 Existência de ângulos abaulados entre as paredes e o piso e entre as paredes e o teto.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>