



**LARA DE ANDRADE OLIVEIRA**

**CONTAGEM DE FUNGOS ANEMÓFILOS NA CÂMARA FRIA DE  
MATURAÇÃO DE QUEIJOS DO LATICÍNIO IFSULDEMINAS  
CAMPUS INCONFIDENTES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE  
SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.**

**INCONFIDENTES-MG  
2017**

**LARA DE ANDRADE OLIVEIRA**

**CONTAGEM DE FUNGOS ANEMÓFILOS NA CÂMARA FRIA DE  
MATURAÇÃO DE QUEIJOS DO LATICÍNIO IFSULDEMINAS  
CAMPUS INCONFIDENTES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE  
SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.**

Projeto Final de Curso apresentado como pré-requisito de conclusão do curso de Engenharia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais *Campus* Inconfidentes para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

**Silva**

**Orientadora: Ana Cristina Ferreira Moreira da**

**Coorientador: Taciano Benedito Fernandes**

**INCONFIDENTES-MG**

**2017**

**LARA DE ANDRADE OLIVEIRA**

**CONTAGEM DE FUNGOS ANEMÓFILOS NA CÂMARA FRIA DE  
MATURAÇÃO DE QUEIJOS DO LATICÍNIO IFSULDEMINAS  
CAMPUS INCONFIDENTES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE  
SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA.**

**Data da aprovação: \_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_**

\_\_\_\_\_  
**Ana Cristina Ferreira Moreira da Silva: IFSULDEMINAS**

\_\_\_\_\_  
**Taciano Benedito Fernandes: IFSULDEMINAS**

\_\_\_\_\_  
**Mariana Borges de Lima Dutra: IFSULDEMINAS**

**INCONFIDENTES-MG  
2017**

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho as pessoas que foram essenciais para a concretização dos meus sonhos  
em minha trajetória acadêmica:*

*Á minha amada e querida mãe, **Maria Helena**, grande exemplo de mulher, que sempre me  
deu todo amor e carinho;*

*Ao meu pai, **João Alves de Oliveira Filho**, que é exemplo de paciência e humildade;*

*Aos meus avós **Waldomiro e Izaura** por todo o carinho e compreensão que me deram no  
tempo que estive ausente nesses 5 anos;*

*Ao meu namorado, **Guilherme**, que sempre me apoiou e me deu motivação para que eu  
continuasse.*

## AGRADECIMENTOS

A *Deus* por me apoiar nos momentos mais difíceis e me dar forças para continuar. Agradecer por ele ter colocado a mão sobre mim em cada momento da minha vida.

A *Ana Cristina*, professora na qual serei eternamente grata por ser muito mais que orientadora, sempre ajudou nossa turma desde o começo e enfrentou as dificuldades conosco, uma pessoa com o coração enorme e uma generosidade que só ela tem.

Ao *Taciano Fernandes*, que está sempre com um sorriso enorme no rosto e disposto a ajudar quem precisa sem medir esforços.

Ao *Luís Santos (IPB-PORTUGAL)*, que me proporcionou um estágio maravilhoso e enriqueceu meus conhecimentos no exterior com *toda sua paciência e dedicação*.

Aos meus tios e primos que sempre foram presentes e me apoiaram: *Mara, Marcos, Gustavo, Rose, Mauro, Ana Paula, André e Adriano*.

As pessoas com quem morei nesses 5 anos de universidade, *Tamires Maganhoto e Leticia Queli e Paula Benoso*.

Aos amigos de turma que me acolheram na Engenharia de Alimentos: *Natali Alcântara, Clara Pontes, Luís Paulo Salgado, Jéssika Michelli, Danilo Matos e Lucas Nunes*.

Aos amigos que o instituto me proporcionou: *Leticia Queli, Ágatha Alves, Júlia Gil, Vanessa Tomé, Flavia Debora e Tamires Maganhoto e Izabelle de Paula*.

As amigas de infância *Fabiane, Iramaia, Bruna, Adriana, Giovana, Tamires e Verônica*.

Ao meu namorado *Guilherme*, que todos os sonhos que almejo ele sempre me apoia e sempre diz que todos os sonhos são possíveis.

A *todos os professores* que tive durante a vida e que faziam meus olhos cheios de curiosidade brilharem ao conhecer coisas novas.

A *todos os familiares* e aqueles que torceram por mim.

## EPÍGRAFE

*“Somente quando encontramos o amor, é que descobrimos o que nos faltava na vida.”*

*(John Ruskin)*

*“Temos de descobrir segurança dentro de nós próprios. Durante o curto espaço de tempo da nossa vida precisamos encontrar o nosso próprio critério de relações com a existência em que participamos tão transitoriamente.”*

*(Boris Pasternak)*

## RESUMO

Fungos são comuns em câmaras de maturação de queijos, porém indesejáveis, pois provocam alterações sensoriais e com isso leva-se à desclassificação do produto gerando perdas econômicas para o laticínio. O processo de maturação pode ser longo, o tempo varia de acordo com o tipo de queijo, podendo chegar a 6 meses no caso do parmesão. Durante este período, os queijos do laticínio do *Campus Inconfidentes*, podem sofrer contaminações por exposição ao ar que entra na câmara fria e também pelo sistema de refrigeração da câmara, que pode ser uma das principais fontes de contaminação. Além destes fatores, o manuseio dos queijos por muitas pessoas, por serem frutos de aulas práticas, também contribui para a contaminação. Sendo assim, este trabalho visa determinar a gravidade da contaminação por fungos na câmara de maturação de queijos do laticínio realizando a contagem de fungos anemófilos através da técnica de Sedimentação espontânea. As placas de Petri contendo o meio de cultura BDA foram estrategicamente colocadas nas prateleiras de maturação dos queijos, em triplicata. De acordo com a técnica adotada, permaneceram por 15 minutos expostas ao ar da câmara, para possibilitar a sedimentação dos fungos anemófilos e, em seguida, fechadas e levadas para a incubação em estufa a 25° C por 5 dias. Após esse período, as placas foram examinadas e o número de colônias de cada uma das placas foi contado e multiplicado por 10 para obter o resultado expresso em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por cm<sup>2</sup> por semana. Apesar do resultado médio em UFC/cm<sup>2</sup> /semana estar dentro de limites estabelecidos da legislação da APHA (Sveum et al., 1992) e considerados satisfatórios, os resultados individuais nos mostram que a contaminação por fungos anemófilos na câmara fria de maturação de queijos do laticínio é muito elevada e está colocando em risco a qualidade dos produtos e a saúde do consumidor, além de onerar a indústria por exigir mais cuidados e causar perdas frequentes.

**Palavras chave:** *Fungos, Técnica de sedimentação espontânea e Laticínios.*

## **ABSTRACT**

Fungi are common in cheese maturation chambers, but undesirable because they cause sensorial changes and with this leads to the declassification of the product causing economic losses to the dairy. The process of maturation can be long, the time varies according to the type of cheese, and can reach 6 months in the case of Parmesan. During this period, dairy cheeses from Campus Inconfidentes can be contaminated by exposure to air entering the cold room and also by the chamber's refrigeration system, which can be a major source of contamination. Besides these factors, the handling of cheeses by many people, because they are the fruits of practical classes, also contributes to the contamination. Thus, this work aims to determine the severity of fungus contamination in the dairy cheese maturation chamber by performing the counting of anemophilous fungi through the technique of spontaneous sedimentation. The Petri dishes containing the BDA culture medium were strategically placed on the maturation shelves of the cheeses, in triplicate. According to the technique adopted, they remained for 15 minutes exposed to the air of the chamber, to allow the sedimentation of the anemophilous fungi and then closed and taken to the incubation in an oven at 25° C for 5 days. After this time the plates were examined and the number of colonies from each of the plates counted and multiplied by 10 to obtain the result expressed in Colony Forming Units (UFC) per cm<sup>2</sup> per week. Although the average result in UFC / cm<sup>2</sup> / week was within the established limits of the APHA legislation (Sveum et al., 1992) and considered satisfactory, the individual results show that contamination by anemophilous fungi in the cold chamber of cheese maturation Dairy industry is very high and is jeopardizing product quality and consumer health, as well as burdening the industry by demanding more care and causing frequent losses.

**Keywords:** Fungi, Spontaneous sedimentation technique and Dairy products.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. JUSTIFICATIVA .....	2
1.2. OBJETIVO GERAL.....	2
1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. CONTAMINAÇÃO EM CÂMARA FRIA .....	4
2.2. INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE REFRIGERAÇÃO NA CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS, EM CÂMARAS DE MATURAÇÃO DE QUEIJOS.....	5
2.4. OCORRÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO (FALHAS) .....	7
2.5. PREVENÇÃO .....	9
2.6. TÉCNICA DE SEDIMENTAÇÃO SIMPLES .....	10
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>12</b>
3.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS .....	12
3.2. PREPARO DO MATERIAL.....	12
3.3. TÉCNICA DE SEDIMENTAÇÃO CLÁSSICA.....	12
3.4.1. Contagem de UFC/cm <sup>2</sup> /semana .....	14
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>15</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>19</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prateleira frontal e dianteira ao sistema de Refrigeração com distribuição das placas de Petri.....	13
<b>Figura 2.</b> Sistema de Refrigeração da câmara de Maturação de queijos. ....	14
<b>Figura 3.</b> Unidades Formadoras de colônias após 5 dias de incubação. ....	15

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Contagem de UFC/cm <sup>2</sup> /semana das 54 Placas de Petri no dia 28/03 por Sedimentação simples. ....	16
---	----

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES**

**°C** – Graus Celsius;

**% UR** – porcentagem de umidade relativa;

**g** – grama;

**mm** – milímetro;

**A<sub>w</sub>** – atividade de gua;

**U** – umidade (%);

**m**- metro;

**UFC**- Unidades Formadoras de Colnias;

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação de pessoas por meio de alimentos contaminados é uma preocupação constante em todos os países do mundo. Muitos microrganismos presentes em alguns alimentos provocam o aparecimento de intoxicações alimentares, mas infelizmente esses alimentos não apresentam alterações em seu cheiro, sabor ou aspecto. Os principais agentes biológicos capazes de contaminar a água e os alimentos, além de causarem inúmeras doenças aos homens, são vírus, bactérias, protozoários, vermes (parasitas), fungos e toxinas microbianas (LOUREDO, 2012).

Em diversos trabalhos científicos é relatado que a qualidade da matéria-prima, as condições de processamento e o processo de maturação dos queijos são imprescindíveis para a obtenção de produtos de qualidade e para a proteção da saúde do consumidor. (FURTADO,1991).

A presença de fungos ambientais é indesejável em câmaras de maturação de queijos. Algumas espécies são produtoras de micotoxinas, logo representam riscos á saúde (SENSIDONI,1994). A esterigmatocistina é a toxina mais encontrada em queijos. (PEGANO,2000).

O ambiente das câmaras de maturação de queijos favorece a rápida multiplicação fúngica devido às condições de umidade e temperatura. Entre os prejuízos causados pelos fungos está o emboloramento visível, a descoloração, o odor e sabor desagradável, a perda de matéria seca, o aquecimento, as mudanças químicas e nutricionais, além da produção de compostos tóxicos, as micotoxinas (LAZZARI,1997).

As propriedades sensoriais podem ser alteradas pela produção de exoenzimas durante a multiplicação fúngica (FILTENBORG,1996), provocando sabores estranhos (SENSIDONI,1994) ou defeitos na coloração de superfície (LUND,1995). A presença de fungos em queijos duros no Brasil já foi investigada, com o isolamento de espécies micotoxigênicas (TANIWAKI,1992), mesmo quando é utilizado ácido sórbico como conservante (PRATA,2001).

## 1.1. JUSTIFICATIVA

O laticínio do *Campus* Inconfidentes enfrenta sérios problemas em relação à contaminação de queijos por fungos. O laticínio possui apenas uma câmara de maturação para todos os tipos de queijos o que dificulta a distribuição correta dos queijos na câmara de acordo com o tipo de queijo, dia de fabricação, temperatura de maturação e características dos queijos maturados. Além desses problemas, o manuseio dos queijos pelos diversos alunos nas aulas práticas, a porta de madeira, e não de aço inox e a manutenção inadequada do sistema de refrigeração da câmara fria, são fatores importantes na disseminação de fungos anemófilos. Estes fungos, ao se depositarem na superfície dos queijos, multiplicam-se facilmente, pois encontram condições apropriadas de temperatura, umidade e nutrientes. Mas a contaminação real, em valores, nunca foi dimensionada, apenas estimada pelas características dos queijos contaminados. Desta forma, este trabalho pretendeu realizar a contagem dos fungos anemófilos presentes na câmara fria de maturação dos queijos para que ações corretivas sejam aplicadas de forma mais eficaz pelo laticínio.

## 1.2. OBJETIVO GERAL

Realizar a contagem de fungos anemófilos na câmara de maturação de queijos do laticínio IFSULDEMINAS- Inconfidentes utilizando a técnica de sedimentação espontânea.

## 1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.3.1 Verificar a contaminação por fungos anemófilos na câmara fria de maturação do laticínio do *Campus* Inconfidentes, utilizando o método de sedimentação espontânea nas diversas prateleiras da câmara de maturação.

1.3.2 Propor sugestões de controle do desenvolvimento dos fungos anemófilos na câmara de maturação de queijos.

1.3.3 Comparar os resultados obtidos com a legislação.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. CONTAMINAÇÃO EM CÂMARA FRIA**

De acordo com Silva Junior (1992), a temperatura inadequada durante o preparo e conservação dos alimentos como: contaminação cruzada, equipamentos e utensílios higienizados inadequadamente e manipulação por pessoas infectadas, são os fatores mais críticos no processo de contaminação alimentar, principalmente queijos, cuja contaminação microbiana assume destacada relevância em saúde pública do consumidor (PERESI et al., 2001).

O queijo é apreciado tanto pelo seu valor nutritivo como pelo seu sabor e atende aos mais exigentes paladares. No entanto, as condições de processamento, armazenamento e comercialização podem comprometer suas características sensoriais e torná-lo impróprio para o consumo em razão da contaminação por microrganismos responsáveis por doenças veiculadas por alimentos (RAIMUNDO, 1992, apud ARAUJO et al., 2001).

Vários são os microrganismos que devem ser estudados como contaminantes em queijos, dentre eles estão os coliformes termotolerantes ou coliformes a 45°C, são microrganismos pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, que são capazes de fermentar a lactose com produção de gás quando incubados a 45°C. Este grupo tem como principal representante a *Escherichia coli*. A presença de coliformes termotolerantes indicam contaminação de origem fecal, assim como eventual ocorrência de outros enteropatógenos. Ainda incluem linhagens patogênicas para homens e animais (FRANCO; LADGRAF, 1996).

Em relação aos fungos contaminantes de queijos podemos destacar o gênero *Mucor*. A Contaminação por fungos do gênero *Mucor* em câmaras frias se caracteriza pelo crescimento de mofo de cor acinzentada ou escura na superfície do queijo, geralmente antes do início do crescimento do de outro fungo, o do gênero *Penicillium*. Os fungos são alguns dos responsáveis pelo aparecimento de um defeito nos queijos, o gosto amargo e também conferir cor escura e aspecto muito desagradável. O gênero *Mucor* apresenta cerca de 3000 espécies diferentes de bolores, são organismos saprófitas e encontrados na natureza, contribuindo para a contaminação em laticínios. Apesar de não ter ação enzimática tão forte, o *Mucor* cresce muito rápido nos períodos de maturação do queijo, podendo levar à proliferação em dois ou três dias.

A contaminação por aflatoxinas deve ser destacada pois são micotoxinas produzidas por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *A. nomius* e São carcinógenos hepáticos extremamente perigosos para animais e para o homem (HESSELTINE,1976; RYSER,2001).

## 2.2. INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE REFRIGERAÇÃO NA CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS, EM CÂMARAS DE MATURAÇÃO DE QUEIJOS

Quando o sistema de refrigeração da câmara fria está impróprio há contaminação e desenvolvimento de microrganismos patogênicos, incluindo *Listeria monocytogenes* que consegue multiplicar-se a temperaturas de 6 a 10°C (JAY, 2005).

A temperatura de refrigeração influi sobre a proliferação das bactérias durante a maturação dos queijos. A microbiota láctica e os coliformes são os mais abundantes na temperatura de 25 a 30°C, por isso é imprescindível a refrigeração a 4°C para inibir a multiplicação dos microrganismos mesófilos. Em contrapartida, as bactérias psicrótróficas, em especial as aeróbias gram negativas como *Pseudomonas* spp., podem proliferar-se em temperatura de refrigeração (JAY, 2005).

Na matriz dos alimentos, os fungos normalmente se desenvolvem em pHs menores que 2 e maiores que 9, a maioria dos fungos crescem em temperaturas entre 5 e 35°C e em atividade de água de 0,85 ou menor (MISLIVEC et al., 1992).

A atmosfera contém gases, gotas de água, partículas microscópicas de pólen, poeiras e ainda microrganismos (bactérias e mofos). Os mofos que têm dispersão aérea são

denominados anemófilos, possuem a capacidade de colonizar diferentes substratos e habitats de forma simples e muito rápida e eficiente (LOBATO et al.2007).

O risco da cadeia produtiva do queijo vir a ser acometida por uma contaminação microbiológica começa na produção do leite, passando por várias etapas na produção como a de armazenagem na fazenda, transporte, armazenagem na indústria, pasteurização, fabricação, maturação, embalagem, transporte para o consumidor, exposição no ponto de venda até o armazenamento pelo consumidor final, (ANVANITTOYANNIS & MAUROPOULOS, 2000).

A produção de micotoxinas é o ponto mais importante a ser tratado na questão da contaminação de alimentos por fungos. Segundo FILTENBORG et al., (1996), a mais importante micotoxina encontrada em queijos até a data de seu trabalho foi esterigmatocistina, porém muitas outras, como o ácido ciclopiazônico, a rugucovasina A e B e a ocratoxina A podem ser de grande importância (FRISVAD & THRANE, 2000).

A contaminação ambiental é outro ponto de grande importância (FRANCO et al., 1996). Esporos de alguns fungos ambientais resistem ao estresse de serem transportados pelo ar e sobrevivem em baixa atividade de água, assim podem colonizar vários tipos de construções em laticínios (STETZENBACH, 1998).

### 2.3. CONTAMINAÇÃO POR FUNGOS EM AMBIENTES

Os fungos dispersam-se na natureza principalmente através do ar atmosférico ou por outras vias como: água, insetos, homem e animais. Os fungos que são dispersos através do ar atmosférico são conhecidos por fungos anemófilos. Sendo assim, a microbiota fúngica anemófila pode ser semelhante ou diferente em cada cidade ou região. Os elementos fúngicos mais comuns que são encontrados no ar atmosférico são os esporos (propágulos). São aeroalérgenos que, quando inalados, são responsáveis por quadros alérgicos, como asma e rinite (BURGE,1996).

Está havendo um crescente interesse por microorganismos alergênicos e a procura de novos indicadores ambientais, e desta forma tem aumentado o estudo de fungos anemófilos no Brasil, já que a sua frequência e a diversidade em espécies estão associadas a fatores ambientais (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2001).

As leveduras (fungos unicelulares) são contaminantes naturais (superfícies molhadas, leite derramado, soro). A maior fonte de leveduras está na salmoura. Assim, os queijos salgados em salmouras são os mais susceptíveis a contaminação por leveduras. Além

disso, alto teor de sal na superfície do queijo faz com que haja migração da umidade, criando ambiente ainda mais favorável às leveduras. As leveduras mais frequentemente isoladas são *Candida spp.*, *K. marxianus*, *G. candidum*, *D. hansenii* e *Pichia spp.* Bolores e leveduras são mais comuns na superfície de queijos em forma de anel, que representam um grande grupo de tradicionais queijos europeus. Estes queijos não são cobertos ou embalados, sendo maturados por determinado tempo expostos "ao ar". As condições de umidade e o ambiente com alto teor de sal da superfície criam condições seletivas para leveduras e bolores (FLEET,1990; HOCKING, FAEBO, 1992; VILJOEN, GREYLING, 1995).

Dependendo da espécie, a contaminação fúngica pode constituir--se em sérios problemas de segurança alimentar devido à produção de micotoxinas, mas também, acarretar vários prejuízos econômicos que são inviáveis devido a alterações nas características dos produtos (KURE et al., 2001; KURE et al., 2004). Os principais problemas que comprometem as qualidades comerciais de vários tipos de queijos em todo o mundo são alterações da aparência, do aroma, do sabor e da textura.

#### 2.4. OCORRÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO (FALHAS)

Os problemas relacionados à contaminação de alimentos para consumo humano tornaram-se mais evidentes com a globalização, pois se torna muito fácil a distribuição de alimentos industrializados pelo mundo e a livre importação de produtos são exemplos típicos, sendo um fator contribuinte para sua contaminação e, conseqüentemente, para a ocorrência de danos à saúde humana (BALBANI; BUTUGAN, 2001).

A microbiota inicial do leite está associada diretamente aplicada a higiene da ordenha e a limpeza dos utensílios utilizados para a obtenção do leite e para elaboração do queijo. Em boas condições de assepsia, o leite recém-ordenhado contém entre  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL os quais são provenientes de galactóforos, dos equipamentos de ordenha e manipuladores, sendo necessário o resfriamento imediato para assegurar a qualidade bacteriológica e assegurar que não haja danos aos consumidores (LISITA,2005). Vários são os pontos considerados críticos no que diz respeito á obtenção do leite, além do período imediato após a ordenha, a carga microbiana do leite pode aumentar devido a contaminação provenientes do ambiente e do homem (ANDREATTA,2008).

A qualidade dos produtos lácteos incentiva a aceitação e a demanda pelos consumidores. Apesar das exigências de que o leite destinado à fabricação de queijos seja

higienizado por meios mecânicos adequados e submetidos à pasteurização ou tratamento térmico equivalente, ainda é muito grande a comercialização dos queijos fora desses padrões. Além disso, pode ocorrer também a contaminação pós-pasteurização, que são acarretadas pela utilização de temperaturas inadequadas e incorretas condições de manufatura e armazenagem contribuem, também de forma efetiva para a má qualidade do produto final (ALBUQUERQUE; RODRIGUES.2008).

O queijo apresenta vários pontos críticos durante a fabricação, com 8 processos nele envolvidos, como recepção do leite, pasteurização do leite, coagulação, corte da coagulação, dessoragem, enformagem, salga, maturação (quando necessário) e embalagem, que podem conduzir a alterações e até a recontaminação no produto final (BALBANI; BUTUGAN, 2001; ROSA; PORTO; SPOTO, 2005).

Fernandes et al. (2006) e Santana et al. (2008) em estudos realizados com queijos no Brasil, relatam a preocupação com os níveis muito altos de contaminação por microrganismos e a legislação impõe limites na contagem de microrganismos, em queijos comercializados no país, uma vez que estes altos níveis representam um sério risco a saúde da população e do consumidor. Neste estudo, registraram-se níveis de contaminação por microrganismos acima dos valores recomendados pela legislação.

Segundo Martins, 2002, a boa atividade do fermento no tanque de fabricação diminui muito o fator de contaminação devido: ao controle de contaminação (combate bacteriológico entre as bactérias ruins e boas, onde se a atividade for boa não sobra alimento-lactose para as bactérias ruins); a remoção da umidade da coalhada (pelo abaixamento do pH durante a fabricação); a formação de sabor (produção de ácido lático e compostos aromáticos); a formação de corpo e textura de queijos (com a desmineralização é afetado o teor de cálcio no queijo); e melhora a atuação do coalho (pela acidez e pela reação da quebra da proteína – proteólise).

Manipular os alimentos é necessário bastante cuidado e critério, pois, para evitar que ocorra a sua contaminação. Para isso, é preciso primeiramente saber quais são as fontes de contaminação; como e quais os microrganismos que se desenvolvem; o que eles podem causar nos alimentos e nos consumidores; e o que fazer para evitar as fontes de contaminação por fungos.

Geralmente as condições climáticas de um país determinam, em grande parte, as classes de fungos que irão crescer nos alimentos e os tipos de micotoxinas que podem

produzir. No Brasil, existem condições muito propícias para o crescimento de todo tipo de fungos principalmente os produtores de micotoxinas.

As micotoxinas são produzidas principalmente por cinco gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*. As principais micotoxinas encontradas em alimentos são: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2 e M1), ácido fusárico, fumonisinas (B1 e B2), fumonisinas, ocratoxinas (A, B e C), patulina, citrinina, zearalenona e tricotecenos.

## 2.5. PREVENÇÃO

O controle de patógenos tradicionalmente é centrado na higiene de ordenha e pasteurização do leite, mas, para as bactérias do gênero *Propionibacterium*, somente essas medidas não são, necessariamente, suficientes na sua prevenção, pois, se o laticínio não aplicar as Boas Práticas de Fabricação conhecidas como (BPF), recontaminações poderão ocorrer especialmente em produtos muito manipulados como o queijo. (WALKER et al. 1991). A maior parte dos microrganismos podem ser controlados através de Boas práticas de fabricação.

As Boas práticas nada mais são do que Práticas de Higiene recomendadas para o manuseio de alimentos, tendo como objetivo a obtenção de produtos seguros até a mesa do consumidor. São práticas preventivas e incluem aspectos que vão desde a produção no campo até a mesa do consumidor final, passando pela industrialização, a distribuição e a comercialização de queijos (PAS, 2004).

A garantia da segurança microbiológica de produtos de origem animal baseia-se na prevenção e inibição da transferência de agentes patogênicos (ou de suas toxinas) e de resíduos de drogas químicas, empregadas no manejo dos rebanhos, para os alimentos (SANTOS, 2008).

A qualidade higiênico-sanitária inadequada permite a propagação de microrganismos patogênicos nos queijos. A alta taxa de micro-organismos quando presentes nos alimentos produzem toxinas e que causam a intoxicação alimentar estafilocócica. Assim para prevenir os surtos causados por esses alimentos é necessário detectar essas bactérias e fungos (FERREIRA et al., 2010).

É necessário aplicar práticas dentro da fazenda leiteira que devem assegurar que o leite seja produzido (SANTOS, 2007) a partir de animais saudáveis, em boas condições de higiene e dentro de condição ambiental sustentável. Tais procedimentos devem sempre

enfocar a prevenção dos problemas, visto que a sua correção é, na maioria das vezes, mais cara e menos eficiente. A demanda por alimentos seguros fez surgir diversos programas para assegurar a qualidade e segurança dos alimentos. Entre as principais ferramentas usadas pelas cadeias produtivas, destacam-se: Boas Práticas Agropecuárias (BPA), Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Programa Alimento Seguro (PAS), Rastreabilidade, Sistemas de Certificação e Protocolos Internacionais (ex., EurepGap).

## 2.6. TÉCNICA DE SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Um dos métodos clássicos (ou convencionais ou tradicionais) mais utilizados para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos é a contagem em placas através da sedimentação espontânea (TORTORA et al., 2001). A contagem em placas é um dos métodos mais antigos desenvolvidos para a enumeração de microrganismos em rotina. A técnica foi introduzida por Robert Koch (1880) com o desenvolvimento de meios de cultura de ágar e em 1895 foi reconhecido o seu procedimento. Em 1916, Breed e Dotherer formalizaram o procedimento deste método (Easter, 2005).

A técnica de Sedimentação Espontânea é exemplo de técnicas que apresentam vantagens à abordagem clássica de purificação e principalmente de isolamento, devido à sua versatilidade, e é um processo muito rápido e feito em quantidades menores de amostra na análise, de maneira a prover uma rápida priorização de extratos e substâncias, evitando-se o re-isolamento de compostos já conhecidos (Easter, 2005).

A utilização da técnica de exposição de placas, adotada neste estudo, permite uma estimativa relevante da contaminação bacteriana e principalmente fúngica no ar por estimar microrganismos que sedimentam sobre a placa de Petri (FRIBERG;B, 2009).

Partículas do ar contendo microrganismos se depositam por sedimentação nas placas e estas são incubadas por 5 dias, após o qual são contadas e seus resultados avaliados. Esse método pode ser considerado como qualitativo ou semi- qualitativo, pois seus resultados podem ser afetados por correntes de ar e, além disto, o método não detecta a presença de microrganismos em suspensão que não se depositaram sobre a placa (AVALLONE, 1985; CLOSSET, 2007; CLONTZ, 2008; BRITISH PHARMACOPEIA, 2010).

As placas devem ser posicionadas em locais onde ocorrem operações de contaminação críticas e dentro das cabines de fluxo laminar, para simular as condições nas

quais o produto é exposto. O ressecamento das placas durante o tempo de exposição e incubação deve ser avaliado para a promoção de crescimento dos organismos encontrados não seja prejudicada (HALLS,2002; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; ANDON, 2006; COSSET, 2007; BILL, 2010; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

A técnica de sedimentação espontânea de ar consiste em impactar um volume de ar em placas de Petri por sedimentação ou outro tipo de suporte apropriado e, em seguida, incubá-las em temperatura e tempo apropriado e, para que haja o crescimento dos microrganismos coletados, permitindo a análise quantitativa dos dados gerados. Esta técnica permite detectar microrganismos em áreas com contagens baixas, o que não é possível através de amostragem passiva (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; ANDON, 2006; COSSET, 2007; BILL, 2010; PINTO, KANEKO, PINTO, 2010).

### 3. METODOLOGIA

As amostras foram coletadas na câmara fria de maturação de queijos do laticínio do Instituto Federal do Sul de Minas Gerais *Campus* Inconfidentes e as análises foram realizadas no laboratório de Microbiologia do *campus*.

#### 3.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS

Para realização do trabalho foi utilizado o meio de cultura Potato Glucose Ágar e 54 placas de Petri esterilizadas e preparadas para uso de acordo com a técnica de sedimentação espontânea.

#### 3.2. PREPARO DO MATERIAL

O material foi preparado de acordo com o regulamento estabelecido na IN 62;

Foi feita a diluição do meio Potato Glucose Ágar com 56,27g diluído em 1,350 L de água destilada e posteriormente autoclavado;

Distribuiu-se o meio em 54 placas de Petri que foram colocadas em estufa de secagem a temperatura de 25°C por 24 horas.

#### 3.3. TÉCNICA DE SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA

Após este período de 24 horas, as placas, já secas, foram levadas para a câmara de maturação de queijos e distribuídas nos três conjuntos de prateleiras sendo: um conjunto

frontal ao sistema de refrigeração e dois conjuntos de prateleiras nas laterais da câmara. Num total de 18 prateleiras o experimento foi conduzido em bloco individualizado. Conforme a figura 1:

**Figura 1.** Prateleira frontal e dianteira ao sistema de Refrigeração com distribuição das placas de Petri.



Fonte: Próprio autor.

As prateleiras foram numeradas de cima para baixo sendo:

Prateleira 1: Lateral direita paralela ao sistema de refrigeração da câmara fria sendo as prateleiras enumeradas de 1 a 6;

Prateleira 2: Lateral esquerda paralela ao sistema de refrigeração da câmara fria sendo as prateleiras enumeradas de 7 a 12;

Prateleira 3: Frontal ao sistema de refrigeração da câmara fria (mais próxima da porta da câmara) sendo as prateleiras enumeradas de 12 a 18.

Foram colocadas 3 placas por prateleira, abertas e posicionadas de forma a permitir que houvesse a sedimentação do ar nas placas. As placas permaneceram abertas para a

sedimentação por 15 minutos. Após este período foram fechadas e levadas para incubação em estufa a 25°C por 5 dias no laboratório de microbiologia. Após os 5 dias de incubação, procedeu-se à contagem e avaliação dos resultados.

As prateleiras mais próximas ao sistema de refrigeração são as laterais esquerda e direita conforme a figura 2:

**Figura 2.** Sistema de Refrigeração da câmara de Maturação de queijos.



Fonte: Próprio autor.

#### 3.4.1. Contagem de UFC/cm<sup>2</sup>/semana

As placas foram examinadas e o número de colônias de cada uma das placas foi contado e multiplicado por 10 (para considerar a diluição) para obter o resultado expresso em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por cm<sup>2</sup> por semana.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 3 estão apresentadas as colônias formadas após o período de incubação em estufa.

**Figura 3.** Unidades Formadoras de colônias após 5 dias de incubação.



Fonte: Próprio autor.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados obtidos, em contagem direta das placas, em UFC/cm<sup>2</sup> /semana nas placas das 18 prateleiras, sendo que foram colocadas 3 placas em cada prateleira no total de 54 placas de Petri.

**Tabela 1.** Contagem de UFC/cm<sup>2</sup>/semana das 54 Placas de Petri no dia 28/03 por Sedimentação simples.

<b>POSIÇÃO DAS PLACAS</b>	<b>CONTAGEM em UFC/cm<sup>2</sup> /semana</b>	<b>CONTAGEM em UFC/cm<sup>2</sup> /semana</b>	<b>CONTAGEM em UFC/cm<sup>2</sup> /semana</b>	<b>MÉDIA UFC/cm<sup>2</sup> /semana</b>	<b>MÉDIA (MULTIPLICADA POR 10)</b>
1	5	2	1	2,66	26,6
2	1	3	3	2,33	23,3
3	3	8	1	4	40
4	11	2	65	26	260
5	1	67	1	23	230
6	2	6	2	3,33	33,3
7	9	2	0	3,66	36,6
8	0	1	1	0,66	6,6
9	0	0	1	0,33	3,3
10	1	1	0	0,66	6,6
11	1	24	9	11,33	113,3
12	3	0	2	1,66	16,6
13	3	5	1	3	30
14	4	64	6	24,66	246,6
15	0	1	1	0,66	6,6
16	1	1	25	9	90
17	2	4	3	3	30
18	9	0	3	4	40

Fonte: Próprio autor.

**O cálculo para a obtenção do número de UFC/cm<sup>2</sup>/semana está relacionado na equação abaixo:**

$$\text{MÉDIA TOTAL: } 2,295 \text{ UFC/cm}^2\text{/semana} \times 10 = 22,95 \text{ UFC/cm}^2\text{/semana}$$

Em função das exigências de qualidade microbiológica dos ambientes, a câmara fria, considerando-se a técnica da sedimentação espontânea utilizada, pode ser enquadrada na Classe 100.000, conforme recomendação da APHA (Sveum et al., 1992). Nessa classe, os ambientes são considerados em condições higiênicas satisfatórias, adequadas ao processamento de alimentos quando apresentarem uma contagem de microrganismos mesófilos aeróbios de até 30 UFC/cm<sup>2</sup> /semana.

No entanto, se analisadas cada uma das placas dispostas em locais diferentes da câmara fria, verifica-se que em 9, das 18 placas, ou seja 50% das amostras, os valores encontrados estão muito acima do limite de 30 UFC/cm<sup>2</sup> /semana, com média de 121,08 UFC/cm<sup>2</sup> /semana. A variação de valores nas amostras é explicada pela disposição das placas na câmara fria. As placas que apresentaram maior contaminação foram as colocadas em prateleiras com queijos já contaminados com fungos e que estavam mais tempo em processo de maturação, o que influenciou na sedimentação espontânea nas placas.

Já as placas que apresentaram menos contaminação estavam em estantes com queijos sem contaminação, novos, ou sem queijo nenhum, sofrendo menos impacto do ar contaminado.

As placas da prateleira 14 apresentaram o segundo maior resultado de contaminação, isso se deve ao fato de que está localizada perto da entrada da câmara fria do laticínio, ocorre que a corrente ar de fora leva contaminação para dentro da câmara fria de maturação e também há muita passagem de alunos e manipuladores perto desta prateleira.

Mesmo que o resultado médio em UFC/cm<sup>2</sup> /semana esteja dentro de limites estabelecidos e considerados satisfatórios, os resultados individuais nos mostram que a contaminação por fungos anemófilos na câmara fria de maturação de queijos do laticínio é muito elevada e está colocando em risco a qualidade dos produtos e a saúde do consumidor, além de onerar a indústria por exigir mais cuidados e causar perdas frequentes.

Por estes motivos, devem ser implementadas medidas de saneamento destes problemas.

Para implementar medidas e solucionar problemas que ocorrem com contaminação de fungos anemófilos na câmara fria de maturação, é necessária a troca porta de madeira por uma de aço inoxidável, construção de mais uma câmara fria, pois existem queijos que sua maturação pode chegar cerca de 6 meses. Fazer uma manutenção periódica do sistema de refrigeração, e tratamento do ar por processo de fumigação.

## **5. CONCLUSÕES**

Pelos resultados, constatou-se a necessidade de realização de avaliações microbiológicas periódicas na câmara fria de maturação de queijos do laticínio do Campus Inconfidentes. Apesar do resultado médio obtido nas amostras do ar da câmara, apresentar valores satisfatórios dentro dos limites estabelecidos pela APHA (Sveum et al., 1992), a análise de cada amostra comprova a necessidade de maior atenção em relação à contaminação provocada por fungos nessa câmara. Propondo-se que, a partir deste trabalho, sejam implementados programas mais frequentes de avaliação microbiológica do ar da câmara e também das demais dependências da fábrica, além de manutenção do sistema de refrigeração e adoção de práticas de tratamento do ar como a fumigação. E também, após pesquisar a legislação brasileira a respeito, verifica-se a necessidade de definição de especificações ou de recomendações mais adequadas às condições brasileiras para o controle microbiológico de ambientes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, I.P.S.; RODRIGUES, M. A. M. Qualidade microbiológica do queijo tipo mussarela artesanal comercializado em Uberlândia, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.22,n. 162,p.101-105,jun.2008.

ANDON, M.B. Active vs. passive air (Settle Plate) monitoring in routine environmental monitoring programs. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.60, n.6, p.350-355,2006.

Andreatta, E. Avaliação da qualidade do leite cru utilizado na fabricação de derivados revisão. 2008. INTELLECTUS- Revista Acadêmica Digital do Grupo Polis Educacional.

ARAÚJO, W.; SILVA, M.H.; MARTINEZ, T.C.N.; SILVEIRA, V.F.; BARROS, S.L.B.; SILVA, A.A.F. Isolamento e identificação de coliformes no queijo minas comercializado na região metropolitana de Salvador-BA. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v.2, n.2, p.37-42, 2001.

ARVANITOYANNIS, I.S.; MAUROPOULOS, A. A. Implementation of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to Kasseri/Kefalotiri and Avenato cheese productions lines. **Food Control**, v.11, p.31-40, 2000

AVALLONE,H. Control aspects of aseptically produced products. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.39, n.2, p.75-79, 1985.

BALBANI, A. P. S., BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. *Revista de Pediatria*. São Paulo, v. 23, n. 4, p. 320-328, 2001.

BALBANI, A. P. S; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. *Pediatria*, São Paulo, v.23, n.4, p. 320-328, jul./ago.2001.

BARANCELLI, G. V., CAMARGO, T. M., REIS, C. M. F., PORTO, E., HOFER, E. E OLIVEIRA, C. A. F. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese Manufacturing Plants from the Northeast Region of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, Vol. 74, No. 5, Pages 816-819. 2011b.

BILL, A. Microbiology laboratory methods in support of the sterility assurance system. In: AVIS, EK.; LIEBERMAN, A.H.; LACHMAN, L.NEMA, S.; LUD WIG, J.D. **Pharmaceutical dosage forms: parenteral medications**. 3.ed. New York: Informa Healthcare, 2010 . [v.2: Facility design, sterilization and processing].

BRITISH Pharmacopeia 2010. London: Stationery Office, 2009.

Burge HA, Levetin E, Muilenberg, ML, Solomon, WR. Fungus spore identification. American Academy of Allergy Asthma Immunology; 1996. p.3-22.

CLONTZ, L. **Microbial limit and bioburden tests: validation approaches and global requirements**. Buffalo-Grove: CRC Press, 2008. P.223-261.

COSSLET, G.A. The design of controlled environments. In: DENYER, S.P.; BAIRD, R.M., eds. **Guide to microbiological control in pharmaceutical and medical devices**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press. 2007. Cap.4.

CRUZ, C. D., MARTINEZ, M. B., DESTRO, M. T. Listeria monocytogenes: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alim. Nutr. Araraquara**, v. 19, no. 2, p. 195-206, abr./ jun. 2008.

DASCALAKI, E. G. Indoor environmental quality in hellenic hospital operating rooms. **Energy and Buildings**, Belgrade, v. 41, n. 5, p. 551-560, may 2009.

Easter, M. (2005). Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry. Interpharm/CRC. Washington, EUA.

Fernandes, A.M.; Andreatta, E.; Oliveira, C.A. F. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: Questão de saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**, v.20, n.144. p.2-25, 2006. Harrigan, W. F.

FERREIRA G.B. et al., Pesquisa de Staphylococcus Aureus em queijos tipo “Minas Frescal” comercializados na região do triângulo mineiro. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.34, n.3, p. 575-589, jul./set. 2010.

**Filtenborg O., Frisvad J.C. & Thrane U. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of food Microbiology*. 33: 85-102.**

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; THRANE, V. Moulds in food spoilage. **Int. J. Food Microbiol.** v.33, p.85-102, 1996.

Fleet GH. **A review: yeasts in dairy products**. J Appl Bacteriol68:199,1990.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: sterile drug products produced by aseptic processing – current good manufacture practicing**. Rockville : FDA, 2004.

FOX, P. F. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**, 2º. ed. London: Chapman & Hall, vol. 1, 1993. 577 p.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004

FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1999, 298p.

Friberg B, Friberg S, Burman LG. Inconsistent Correlation between aerobic bacterial surface and air counts in operating rooms with ultra clean laminar air flows: proposal of a new bacteriological standard for surface contamination. *J Hosp Infect* 1999; 42: 287-293.

FURTADO, M. M. A qualidade do leite. In: **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Editora Globo, 1991, p. 21-33.

FURTADO, M. M. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e de soro de queijo da Região do Serro, Minas Gerais**. 1990. 95 f.. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1990.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**, 2º. ed. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. 200 p.

GREEN, S.; RANDELL, C. Rapid microbiological methods explained. In: HALLS, N., ed. **Microbiological contamination control in pharmaceutical clean rooms**. Boca Raton: CRC Press, 2004. Cap 7, p.157.

Hocking AD, Faebo M. **Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged cheddar cheese during maturation**. *Int Dairy J* 16:123,1992.

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62, DE 26 DE AGOSTO DE 2003; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia. 711p. 2005.

Lazzari FA. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. 2. ed. Curitiba: edição do autor; 1997.

Lima, M.C.G.; SENA, M.J.; Mendes, E.S.; Almeida, C.C.; Silva, R.P.E. Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru tipo C produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto biológico**, v.73, n.1, p.89-95, 2006

Lisita, MO. Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo minas frescal em uma indústria de laticínios. 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade de São paulo/ Piracicaba.

LOBATO, R, DANIELS. K, J, SILVEIRA, E. Pesquisa de fungos anemófilos em biotério.

LOUREDO, P. **Contaminação dos alimentos**. 2012. Disponível em: . Acesso em: 21 de fevereiro de 2017.

**Lund F., Filtenborg O. & Frisvad J.C. 1995**. Associated myoflora of cheese. *Food Microbiology*. 12: 173-80.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; JÚNIOR, S. A. S.; BERN, L. A. G.; GESU, G. D. 2003. Os Fungos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Associação Médica**. São Paulo. Vol. 49, n 3.

MISLIVEC, P.B.; BEUCHAT, L.R.; CUSIN, M.A Yeast and molds. In: VANDERZART, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 rd . ed. Washington, DC: APHA, 1992. p.239-49.

**Northold M.D., Van Egmond H.P., Soentoro P. & Deijll E. 1980.** Fungal growth and the presence of sterigmatocystin hard cheese. *Journal os Association Official Analitical Chemistry*. 63: 115-119.

NUNES, Z. G. et al. Indoor air microbiological evaluation of offi ces, hospitals, industries, and shopping centers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 351- 357, jan./jul. 2005.

PANTOJA, L. D. M. et. al. Diversidade de Bioaerossóis presentes em ambientes urbanizados e preservados de um Campus universitário. **Biológico**, São Paulo, v.69, n.1, p.41-47, jan./jun., 2007.

**PAS, Boas práticas O que são e o que fazer para aplicá-las?** SEBRAE/SP, Fascículo 2, 1º Ed.2004

PASQUARELLA, C. et al. The index of microbial air contamination. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 46, n. 4, p. 241-256, dec., 2000.

**Pegano M. & Gauvreau K. 2000.** *Princípios de Bioestatística*. 2ed, São Paulo: Thompson,506p.

PINTO, T.J.A; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle Biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatatos e cosméticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. P.451-485, p.245-283.

**Prata A.F.G., Kraemer F.B., Florido P.S.S.,Sgarbi D.B.G. & Stussi J.S.P 2001.** Fungos toxigênicos e proteolíticos isolados de queijo tipo parmesão ralado e embalado, comercializado em Niterói,RJ, *Higiene Alimentar*. 15:49-52.

QUADROS, M. E. et al. Indoor air quality in hospitals: a case study and a critical review of current standards. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 431-438, jul./set. 2009.

ROSA, V. P.; PORTO, E.;SPOTO, M. H. F. Avaliação microbiologica e sensorial de queijos Minas frescal embalados sob atmosfera modificada. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n .132, p. 58-64,2005.

Ryser, ET Public Health Concerns (capítulo 13). In: Marth, E.H.;Steele, J.L.**Applied Dairy Microbiology**. Nova lorque: Mareei Dekker. 2001

Santana, R.F.; Santos, D.M.; Martinez, A.C.C.; Lima, A.S. Qualidade microbiológica do queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, 2008.

SANTOS, M. V. Boas práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite. In: **O Brasil e a nova era do mercado do leite – Compreender para competir**. Piracicaba-SP : Agripoint Ltda, 2007, v.1, p. 135-154

SANTOS, P. L. S. **Perfil sócio-econômico de produtores e aspectos produtivos e sanitários de rebanhos leiteiros da Paraíba.** 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária de Ruminantes e Eqüídeos), Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos-PB, 2008.

SCHINDLER, S. et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. **Journal of Immunological. Methods**, Amsterdam, v. 316, n. 1-2, p. 42- 51, oct. 2006.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; TRUFEM, S. F. B.; GRANDI, R. A. P.; MILANEZ, A. I.; PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A. Airborne fungi in the region of Cubatão, São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.32, 2001, p.61-65.

SCOTT, R. **Fabricación de Queso.** 2.ed. Espanha: Editora Acríbia S.A, 1991. 520 p.

Sensidoni A., Rondinini G., Peressini D., Maifreni M. & Bortolomeazzi R. 1994. Presence of an off-flavour associate with the use of sorbates i cheese and margarine. *Italian Journal of Food Science*. 6: 237-242.

SILVA JUNIOR, E.A. **Contaminação microbiológica como indicadora das condições higiênico-sanitárias de equipamentos e utensílios de cozinhas industriais para a determinação de pontos críticos de controle.** 1992. 83f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

STETZENBACH, L.D. **Microorganisms and indoor air quality.** *Clin. Microbiol. Newsl.* , v.20, p.34-45, 1998.

SVEUM, W. H.; MOBERG, L. J.; RUDE, R. A.; FRANK, J. F. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F.; SPECK, M. L. (Eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3. ed. Washington: APHA, 1992. cap. 3, p. 51-74.

Taniwaki M.H. & Van Denfer A.G.F.1992. Ocurrance of toxigenic molds in Brazilian cheese. *Journal Food Protection* 55: 187-191.

Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2001). *Microbiology: An introduction*. San Benjamin Cummings. Francisco, EUA.

VARNAM, Alan H.; SUTHERLAND, Jane P. **Leche y Productos Lácteos.** Espanha: 1995. 476 p.

Viljoen, B.C.;Greyling, T **Yeasts associated with cheddar and Gouda making.** *Int Dairy J* 28:79, 1995.

WALKER, R.L.; JENSEN, L.; KINDE, H.; ALEXANDER, A.V.; OWENS, L. Environmental survey for *Listeria* species in frozen milk product plants in California. *Journal of Food Protection*, v.54, n.3, p.178-182, 1991.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Indoor air pollutants:** exposure and health effects (Euro Reports and Studies, 78). Copenhagen, 1983.

