

VALÉRIA COSTA SALUSTIANO

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DO AR DE AMBIENTES DE
PROCESSAMENTO EM UMA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS E SEU
CONTROLE POR AGENTES QUÍMICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

VALÉRIA COSTA SALUSTIANO

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DO AR DE AMBIENTES DE
PROCESSAMENTO EM UMA INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS E SEU
CONTROLE POR AGENTES QUÍMICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA EM: 25 de fevereiro de 2002.

Prof. Sebastião César C. Brandão
(Conselheiro)

Prof^ª Raquel Monteiro C. de Azeredo
(Conselheira)

Prof. Paulo Roberto Cecon

Prof^ª Roberta H. Picolly do Vale

Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

“Se as coisas são inatingíveis...ora! Não é motivo para não querê-las...”

Mário Quintana

A Deus e aos meus amados pais
Alonso e Conceição.

AGRADECIMENTO

A Deus, que não me carregou no colo, mas sempre segurou minha mão, por tudo.

A meus amados pais Alonso e Conceição, aos quais devo todas as minhas vitórias e sucesso, pelo apoio, pelo amor e pela compreensão incondicionais.

Às minhas irmãs, no completo sentido da palavra, Alina e Flávia, por sempre me incentivarem e estarem ao meu lado.

Aos meus amados avós Oswaldo e Maria José, pela torcida e por todo o amor a mim dedicado.

Ao Maurício, a quem amo, por estar sempre presente, apoiando-me nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pelo curso e pelo aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio e pela bolsa de estudo.

Ao meu Prof. Orientador Nélio José de Andrade, pela orientação, pela confiança, pela amizade e pelos ensinamentos não só científicos, como também pelos ensinamentos de vida.

Ao Prof. Sebastião César Cardoso Brandão, pelo apoio, pela amizade e pelos ensinamentos valiosos.

À Prof^ª Raquel Monteiro C. de Azeredo, pela amizade, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela atenção.

Ao Prof. Paulo Cecon, pela presteza, pela ajuda e pelos ensinamentos.

À Prof^ª Roberta H. Picolly do Vale, pelas sugestões e pelos ensinamentos.

Aos meus queridos amigos, pelos bons momentos compartilhados, em especial a Sandra, Wiliam, Gabriela, Júnia e Carolina, pela importante ajuda e pelo companheirismo.

Às minhas queridas amigas Célia e Mírian, por, muitas vezes, terem sido a minha família em Viçosa.

Aos funcionários do DTA e da Planta de Laticínios/Funarbe, pelo carinho com que me auxiliaram e me trataram, em especial ao Thomás, que esteve sempre disponível para me ajudar, com paciência e ótimo humor.

Ao Sr. Luis Sampaio, pelo auxílio no Laticínios para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

VALÉRIA COSTA SALUSTIANO, filha de Alonso Salustiano Pereira e Maria Conceição Costa Pereira, nasceu em Anápolis, Estado de Goiás, em 18 de novembro de 1976.

Em dezembro de 1999, graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, GO.

Em fevereiro de 2000, ingressou no Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2002.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Avaliação da microbiota do ar de ambientes na indústria de alimentos	4
2.2. Recomendações de números máximos permitidos de microrganismos presentes no ar para a indústria de alimentos ...	7
2.3. Controle e desinfecção do ar de ambientes de processamento na indústria de alimentos	9
2.3.1. Considerações gerais	9
2.3.2. Agentes químicos empregados na desinfecção do ar na indústria de alimentos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Avaliação da qualidade microbiológica do ar de ambientes de processamento	14
3.1.1. Técnica de sedimentação	15

	Página
3.1.2. Técnica de impressão em ágar	16
3.2. Avaliação de sanificantes químicos no controle da microbiota do ar de ambientes de processamento de produtos lácteos	17
3.2.1. Agentes químicos sanificantes avaliados	17
3.2.2. Aplicação e avaliação das soluções químicas sanificantes utilizadas	18
3.3. Análise estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Avaliação da microbiota do ar de ambientes de processamento na indústria de laticínios pela técnica de impressão em ágar	21
4.2. Avaliação da microbiota do ar de ambientes de processamento na indústria de laticínios pela técnica de sedimentação	26
4.3. Influência da umidade relativa do ar e da temperatura ambiente sobre a microbiota presente no ar de ambientes de processamento na indústria de laticínios	28
4.4. Distribuição dos diferentes grupos de microrganismos nos ambientes de processamento na Planta de Laticínios da Funarbe/UFV	30
4.5. Comparação das técnicas de sedimentação e impressão em ágar	32
4.6. Avaliação do uso e da eficiência de agentes químicos no controle da microbiota do ar de ambientes de processamento na indústria de laticínios	36
5. RESUMO E CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Classificação de metodologias de análise do ar de ambientes de processamento na indústria de alimentos, segundo a 16 ^a edição do <i>Standard Methods for the Examination of Dairy Products</i>	5
2. Níveis máximos aceitáveis de microrganismos, expressos em UFC· m ⁻³ de ar, em função do tempo de exposição e da dimensão da abertura do recipiente de embalagem	8
3. Recomendação da APHA para o controle microbiológico ambiental.....	9
4. Vantagens e desvantagens do ácido peracético como sanificante na indústria de alimentos	11
5. Concentrações para uso, preconizadas pela Diversey Lever, de alguns agentes químicos usados para desinfecção do ar de ambientes na indústria de alimentos	13
6. Neutralizantes adicionados aos meios de cultura, ação e concentração de uso em meios sólidos ou líquidos	19
7. Faixa de contagem, médias e desvio-padrão de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, em UFC· m ⁻³ , no ar de ambientes de processamento da Planta de Laticínios da Funarbe/UFV, pela técnica de impressão em ágar	22

8. Resumo da análise de variância do \log_{10} do número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, em $\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$, no ar de ambientes de processamento da indústria de laticínios	24
9. Resumo da análise de variância do \log_{10} do número coliformes totais e de <i>Staphylococcus aureus</i> , em $\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$, no ar de ambientes de processamento da indústria de laticínios	25
10. Valores médios de <i>Staphylococcus</i> spp., expresso em $\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$, nos ambientes de processamento avaliados em uma indústria de laticínios	26
11. Faixas de contagem, médias e desvios-padrão de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, obtidos pela técnica de sedimentação ($\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{semana}^{-1}$)	27
12. Resumo da análise de variância do número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, pela técnica de sedimentação, expresso em $\text{UFC} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{semana}$, nos ambientes de processamento da indústria de laticínios	28
13. Porcentagens dos diferentes grupos de microrganismos avaliados pelas técnicas de impressão em ágar e sedimentação, dentro de cada ambiente de processamento na indústria de laticínios	31
14. Valores médios e relação numérica entre as contagens de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios pelas técnicas de sedimentação e impressão em ágar, nos ambientes de processamento de uma indústria de laticínios	33
15. Variação em porcentagem do número de fungos filamentosos e leveduras e de mesófilos aeróbios após a pulverização de soluções sanificantes nos ambientes de processamento na indústria de laticínios	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Amostrador de ar por sucção	6
2. Princípio de funcionamento do amostrador de ar por sucção	7
3. Sanificação da tampa do amostrador de ar com álcool etílico 70% ..	16
4. Aplicação da solução sanificante por pulverização no ar dos ambientes	19
5. Números médios ($\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ de ar) de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, nas diferentes faixas de temperatura do ar dos ambientes de processamento na indústria de laticínios	29
6. Número médio ($\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ de ar) de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, nas diferentes faixas de umidade relativa do ar encontradas na indústria de laticínios	29
7. Número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios em diferentes tempos de análise do ar e em três aplicações de solução de digluconato de clorhexidina contendo 1.000 e 2.000 mg/L, pH 5,3 e 5,2, respectivamente, à temperatura de 20 a 25 °C. Dados transformados em \log_{10}	37
8. Número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios em diferentes tempos de análise do ar e em três aplicações de solução de ácido peracético a 45 e 75 mg/L, pH 4,0 e 3,8, respectivamente, à temperatura de 20 a 25 °C. Dados transformados em \log_{10}	38

9. Número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios em diferentes tempos de análise do ar e em três aplicações de solução de quaternário de amônia a 700 e 1.200 mg/L, pH 9,2 e 9,3, respectivamente, à temperatura de 20 a 25 °C. Dados transformados em \log_{10} 39

RESUMO

SALUSTIANO, Valéria Costa, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Avaliação da microbiota do ar de ambientes de processamento e seu controle por agentes químicos na indústria de laticínios.** Orientador: Nélio José de Andrade. Conselheiros: Sebastião César Cardoso Brandão e Raquel Monteiro C. Azeredo.

Foi avaliada a microbiota do ar dos ambientes de recepção, embalagem e pasteurização de leite e produção de queijos, iogurte, doce de leite e manteiga no Laticínios/Funarbe-UFV, pelas técnicas da impressão em ágar (IA) e da sedimentação (S). Avaliou-se, ainda, a eficiência da pulverização de soluções sanitizantes de digluconato de clorhexidina (DC) a 1.000 e 2.000 mg/L (pH 5,3 e 5,2, respectivamente), de ácido peracético (AP) a 45 e 75 mg/L (pH 4,2 e 3,8, respectivamente) e de quaternário de amônia (QA) a 700 e 1.200 mg/L (pH 9,2 e 9,3, respectivamente), à temperatura ambiente (20 a 25 °C) no controle da microbiota. As contagens de microrganismos mesófilos aeróbios (MA) e de fungos filamentosos e leveduras (FL) pela técnica IA ultrapassaram 90 UFC· m⁻³ de ar, valor máximo recomendado pela APHA. Pela técnica S, as contagens do ar de quatro ambientes também ultrapassaram 30 UFC· cm⁻²· semana⁻¹, conforme recomendação da APHA. Os ambientes diferiram (p<0,05) apenas quanto aos números de *Staphylococcus* spp. (<1,0 a 4,3 UFC· m⁻³). As contagens microbianas por IA foram de 2 a 10 vezes maiores

que as obtidas por S, evidenciando-se a maior capacidade da IA em determinar microrganismos do ar, inclusive patógenos. Quanto à distribuição da microbiota do ar, houve a predominância de FL pela técnica IA e de MA pela técnica S. A elevação da temperatura ambiente, ao contrário do aumento da umidade relativa do ar, não contribuiu para maiores contagens microbianas no ar. Avaliou-se o uso dos sanificantes nos diferentes tempos de análise do ar dos ambientes: T_0 antes e T_1, T_2 e T_3 , respectivamente, 0,5, 12 e 24 horas depois da pulverização. Em função da literatura disponível e dos resultados, considerou-se que houve ação antimicrobiana do sanificante quando a redução das contagens de T_1 foi de, pelo menos, 15%, em duas aplicações do agente químico. Considerou-se, ainda, que o sanificante apresentou efeito residual quando ocorreram reduções de pelo menos 10% nas contagens de T_0 , da primeira para a segunda e da segunda para a terceira aplicação. A ação antimicrobiana contra FL foi observada para DC/2.000 mg/L e para QA/700 mg/L. Contra MA, AP/45 mg/L apresentou ação antimicrobiana. Efeito residual foi constatado contra FL nas soluções de DC/1.000 mg/L e AP/75 mg/L. As contagens elevadas de 12 e 24 horas após as aplicações foram devidas à variabilidade das condições de análise, principalmente nesses tempos, como a atividade de pessoal. A pulverização do ar de ambientes pareceu uma técnica viável no controle da qualidade microbiológica do processamento de produtos lácteos.

ABSTRACT

SALUSTIANO, Valéria Costa, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2002. **Evaluation of the air microbiological quality in processing areas of a dairy plant and its control by the use of chemical agents.** Adviser: Nélío José de Andrade. Committee members: Sebastião César Cardoso Brandão and Raquel Monteiro C. Azeredo.

In a dairy plant (Funarbe-UFV), the airborne microorganisms were determined by using setting culture plates (SCP) and an Andersen one-stage sieve sampler (ASS), in the following ambients: milk reception, packing and pasteurization; production of cheese, yogurt and “doce de leite” (concentrated condensed milk). Air sanitation, by the pulverization with clorhexidin digluconate/CD (1000 and 2000 mg/L), peracetic acid/PA (45 and 75 mg/L) and amonium quaternary AQ (700 and 1200 mg/L), was evaluated against mesophilic aerobics (MA) and yeasts and molds (YM). The numbers of MA and YM, determined by the ASS, exceeded 90 CFU· m⁻³ of air, like a APHA’s suggestion. By the SCP, the microorganisms numbers of four ambients also exceeded 30 CFU· cm²· week⁻¹, according APHA recomendation. The ambients differed ($p < 0,05$) only for *Staphylococcus* spp. numbers (<1,0 a 4,3 CFU· m⁻³). The ASS microorganisms numbers were about 2 to 10 times larger than SCP

numbers, testifying the major ability of ASS on determining airborne microorganisms, including pathogens. There was a predominance at the environmental dairy plant air of YM, by the ASS and of MA, by SCP determinations. In opposition to air moisture increase, the temperature increase didn't contribute to the increase of airborne microorganisms numbers. An evaluation of the air pulverization was realized at these different air sampling times: T_0 before, and T_1, T_2, T_3 , respectively 0,5; 12; and 24 hours after the pulverization. Based on results and available literature, it was considered that the sanitizer antimicrobial activity occurred when the T_1 reduction was about, at least, 15% at two pulverizations. When the reduction was about 10% at T_0 , between the first and the second pulverization, it was considered a residual effect. The antimicrobial activity against YM was observed for CD/2000 mg/L and to QA/700 mg/L. Against MA, the chemical solution that shows antimicrobial action was PA/45mg/L. A residual effect was observed against YM for CD/1000 mg/L and PA/75 mg/L. The higher numbers of 12 and 24 hours after pulverizations were due to the experimental conditions variability, mainly at these times, like personal activity, for instance. For the microbiologic quality control at the dairy products manufacturing process, the environmental air pulverization shows to be a practicable technic.

1. INTRODUÇÃO

Tem sido constatada a importância da contaminação por microrganismos transportados pelo ar em ambientes de processamento de alimentos. Os microrganismos podem estar na forma de aerossóis, dispersos no ar agregados em partículas sólidas ou líquidas, e depositar-se sobre os alimentos e equipamentos durante o processamento. Os produtos lácteos e de panificação são, particularmente, suscetíveis a essa fonte de contaminação.

Uma das técnicas de monitoramento da qualidade microbiológica do ar, a técnica de sedimentação, envolve a deposição de microrganismos em placas de Petri contendo meio para contagem-padrão expostas ao ar. Outra técnica, a impressão em ágar, consiste na sucção de certo volume de ar, permitindo a coleta das partículas em ágar para contagem-padrão, visando à determinação da microbiota presente.

O controle da microbiota do ar dos ambientes de processamento na indústria de alimentos contribui para a qualidade e o aumento da "vida de prateleira" do produto. Esse controle pode ser realizado pela aplicação de agentes químicos sanificantes na forma de névoa fina no ar desses ambientes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a microbiota do ar, pelas técnicas de sedimentação e impressão em ágar, quantificando e identificando os grupos de microrganismos e o uso de soluções químicas sanificantes no controle da microbiota do ar dos ambientes de processamento em uma indústria de laticínios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O ar pode entrar em contato com produtos alimentícios durante as diversas etapas de manipulação, armazenagem, processamento e embalagem, na indústria. Deve ser dada atenção especial à possibilidade de o ar representar veículo de microrganismos patogênicos, comprometendo a segurança alimentar.

Outra consideração é que a "vida de prateleira" do alimento e sua qualidade também podem ser afetadas. A necessidade do aumento da "vida de prateleira" tem levado à maior preocupação com a qualidade microbiológica do ar dos ambientes de processamento da indústria de laticínios, considerando-se que, mesmo presentes em baixo número, os microrganismos oriundos do ar podem causar deterioração.

Verificou-se correlação elevada ($r=0,86$) entre o número de microrganismos presentes no ar, na área de embalagem de leite, e o número de microrganismos contaminantes do produto final. Calculou-se que, durante 60 segundos de exposição, com contagens de 3×10^2 a $3,9 \times 10^3$ UFC \cdot m⁻³ de ar, 1,5% dos microrganismos seriam capazes de contaminar um litro de um produto embalado em recipiente com abertura de 100 cm², reduzindo sua "vida de prateleira" (RADMORE et al., 1988).

A partir de fontes ambientais, microrganismos presentes em aerossóis podem ser transportados como células isoladas ou aglomerados, em partículas sólidas ou líquidas (SULLIVAN, 1979).

Os aërossóis podem ser definidos como partículas s3lidas ou l3quidas, suspensas no ar, contendo ou n3o c3lulas microbianas vi3aveis ou esporos (KANG e FRANK, 1989).

Muitos pesquisadores reconhecem como fontes de aëross3is, nas 3reas de processamento de produtos l3cteos, a atividade de pessoal, os drenos do piso, os sistemas de ventilaç3o, a comunicaç3o entre salas distintas, o leite derramado no piso e os sistemas de transporte de 3gua, principalmente quando esta 3 usada sob press3o (HEDRICK e HELDMAN, 1969; HELDMAN, 1974; KANG e FRANK, 1990). Quaisquer superf3cies onde microrganismos possam aderir ou se depositar ir3o agir como fontes de contaminaç3o do ar, em condiç3es apropriadas para a formaç3o de aëross3is (HELDMAN, 1967).

Em estudo realizado em quatro plantas de processamento de leite e derivados, evidenciou-se que a atividade de pessoal aumentou a contagem de microrganismos aer3bios totais e *Staphylococcus aureus* no ar (REN e FRANK, 1992a). Resultante da atividade de pessoal, a microbiota do ar 3 constitu3da por c3lulas vegetativas de bact3rias, especialmente *S. aureus*, estreptococos, micrococos e outros microrganismos associados com o trato respirat3rio humano, cabelos e pele (SVEUM et al., 1992).

Os drenos para escoamento no piso contribuem para aumentar os n3veis de bioaëross3is quando a 3gua, ao fluir, espirra ou forma bolhas. O n3mero de partículas vi3aveis transportadas pelo ar reduziu-se com o n3mero de vezes em que os drenos foram usados, indicando que a populaç3o microbiana do interior dos drenos forma aëross3is pelo deslocamento do ar devido ao fluxo de 3gua (HELDMAN, 1974). Tamb3m, o sistema de ventilaç3o, presente na maioria das plantas de processamento, pode contribuir para a contaminaç3o microbiol3gica do ar. Para obter desenho e manutenç3o adequados desse sistema, deve-se conhecer o movimento do ar atrav3s da f3brica, assim como a difus3o das partículas pelo ar, cujo movimento deve ser de 3reas cr3ticas (salas destinadas ao envase e embalagem) para 3reas n3o-cr3ticas (MACHER, 2000). Um sistema de ventilaç3o eficiente pode, no entanto, auxiliar na remoç3o de microrganismos do ambiente, contribuindo para o controle da qualidade microbiol3gica, da temperatura e da umidade relativa do ar ambiente (HAYES, 1995).

Em muitas situações, a contaminação de produtos por bioaerossóis ocorre em função do transporte de microrganismos de áreas adjacentes à linha de processamento. Esse transporte depende do gradiente de concentração de microrganismos e de outros fatores, como ventilação, gradiente de temperatura e turbulência do ar no espaço de comunicação entre as salas (HELDMAN, 1974).

Dependendo das condições ambientais, a dimensão dos bioaerossóis varia de 0,1 μm a mais de 100 μm de diâmetro. Isso provoca um comportamento aerodinâmico diferenciado, o que influencia sobremaneira a difusão e a deposição de partículas, que podem ser bactérias, fungos filamentosos, leveduras, esporos, antígenos, toxinas, vírus, pólen de plantas e material fecal (LUTGRING et al., 1997).

Células bacterianas podem estar presentes em menor número no ar do que esporos bacterianos e de fungos. Isso se deve ao fato de que células vegetativas não sobrevivem no ar por longos períodos, a menos que a umidade relativa ou outros fatores sejam favoráveis ou, ainda, que essas células estejam em alguma matriz protetora (KANG e FRANK, 1990).

2.1. Avaliação da microbiota do ar de ambientes na indústria de alimentos

A determinação da qualidade microbiológica do ar pode ser realizada por uma variedade de métodos, incluindo-se sedimentação em placas, impressão em superfície de ágar, filtração, centrifugação, precipitação eletrostática, colisão em líquido e precipitação térmica (SVEUM et al., 1992).

Cada método possui suas vantagens e limitações. Assim, a seleção de um amostrador de ar e de um método adequado, ao que se pretende, é um ponto crítico para um bom monitoramento da qualidade do ar.

A sedimentação e a impressão em ágar são os métodos mais frequentemente usados e permitem a utilização tanto de meios seletivos quanto não-seletivos para determinação de microrganismos presentes nos bioaerossóis.

O método de sedimentação é baseado na deposição de partículas transportadas pelo ar na superfície de meio de cultura. As dimensões das partículas que contêm células viáveis influenciam a eficiência do método.

Aquelas que apresentam dimensões de 10 µm, aproximadamente, depositam-se mais facilmente do que partículas menores. No entanto, dependendo da velocidade e direção das correntes de ar, a deposição de partículas menores pode ser facilitada (KANG e FRANK, 1990; SVEUM et al., 1992).

Na 16ª edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*/APHA (1985), classificaram-se as metodologias de análises do ar de ambientes de processamento na indústria de alimentos em quatro categorias: classes O, A1, ou A2, classe B, classe C e classe D (Quadro 1). Não há um método classe A para testar a qualidade microbiológica do ar. O método de sedimentação é tido como classe D, recomendando-se 15 minutos de exposição para placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meios de cultura adequados à determinação microbiana desejada.

Quadro 1 – Classificação de metodologias de análise do ar de ambientes de processamento na indústria de alimentos, segundo a 16ª edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*

Classes	Descrição
O, A1 ou A2	Metodologias-padrão
B	Métodos testados e usados com sucesso em certas situações de pesquisas
C	Métodos não-testados
D	Métodos que eram classes O, A1 ou A2, mas foram substituídos por métodos mais eficientes

Fonte: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* - 16ª edição (APHA, 1985).

Os amostradores que succionam o ar e imprimem as partículas através de orifícios em meio de cultura (*sieve samplers*) podem ser de um ou múltiplos estágios, ou seja, contendo apenas uma placa ou uma série de placas de metal, com orifícios igualmente dispostos e sucessivamente menores. As placas em série permitem que partículas menores sejam coletadas nos

estágios finais, devido ao aumento da velocidade do ar, fornecendo também a informação da distribuição das partículas em função de suas dimensões (KANG e FRANK, 1989).

Com fluxo constante de 100 litros de ar por minuto, o MAS 100 Air Sampler - Merck (Figura 1) é um amostrador que tem capacidade para coletar e recuperar partículas viáveis acima de 1 μm (MERCK, 2001ab). Baseado no princípio do amostrador de ar de ANDERSEN (1958), esse amostrador coleta e imprime o ar em uma superfície de meio de cultura. O ar atravessa uma placa de metal com 400 poros, igualmente distribuídos, à velocidade de 0,45 m/segundo, por aspiração vertical ou horizontal (Figura 2). Compensando fatores como influência do fluxo de ar, volume de meio de cultura e dimensão da placa, o amostrador fornece resultados corretos e precisos, sendo classificado pela 16ª edição do *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* como método classe B.



Fonte: MERCK (2001a)

Figura 1 – Amostrador de ar por sucção.

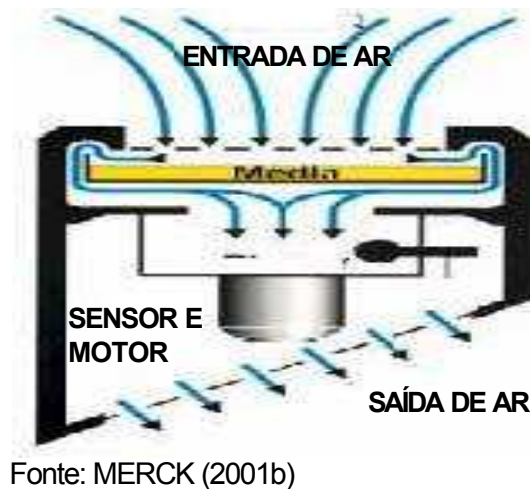


Figura 2 – Princípio de funcionamento do amostrador de ar por sucção.

O método de impressão em ágar requer certa distância entre o jato de ar e a superfície do meio de cultura. Essa distância deve ser aproximadamente quatro vezes o diâmetro desse jato, sendo mais importante para os amostradores de mais estágios (placas), isso porque, nos últimos estágios, essa distância é importante para que partículas menores se depositem no meio de cultura (ANDERSEN, 1958).

Recomenda-se, então, o uso de 27 mL de meio de cultura por placa de Petri, para esse método de análise. Esse volume de ágar na placa garante a distância necessária para que a coleta e impressão das menores partículas dispersas no ar tenham êxito (ANDERSEN, 1958).

A eficiência de qualquer avaliação microbiológica do ar irá variar, dependendo do amostrador utilizado e da natureza dos aerossóis a serem amostrados (MHETA et al.,1996).

2.2.Recomendações de números máximos permitidos de microrganismos presentes no ar para a indústria de alimentos

As recomendações para qualidade microbiológica do ar podem ser estabelecidas de acordo com os grupos de microrganismos pesquisados por volume de ar ou deposição de partículas viáveis em área e tempo definidos,

bem como por níveis críticos de contaminação para cada alimento em questão ou tipo de indústria alimentícia.

A partir de um estudo realizado em ambientes de embalagem de produtos lácteos, foi proposta uma recomendação para a qualidade microbiológica do ar, de acordo com os níveis máximos de microrganismos, em relação ao tempo de exposição do produto (Quadro 2). Esses níveis máximos foram estabelecidos de forma a garantir que a contaminação resultante em um litro de produto não venha provocar alterações indesejáveis. Esses níveis são dados para embalagens de diferentes tamanhos de abertura e vários períodos de exposição desse produto ao ar, durante o envase (RADMORE et al., 1988).

Quadro 2 – Níveis máximos aceitáveis de microrganismos, expressos em UFC· m⁻³ de ar, em função do tempo de exposição e da dimensão da abertura do recipiente de embalagem

Abertura da Embalagem cm ²	Tempo de Exposição (seg.)							
	1	2	3	4	5	10	15	20
5	785	390	262	197	157	79	52	40
10	392	161	130	100	78	38	25	20
15	260	130	86	65	52	25	17	13
20	195	98	65	50	40	20	13	10
50	78	40	25	20	16	8	6	4
100	40	20	13	10	8	4	3	1

Fonte: RADMORE et al. (1988).

Nas recomendações sugeridas pela NASA – National Air Spacial Agency - e adotadas pela APHA – American Public Health Association (SVEUM et al., 1992) são definidas três classes de limpeza (100, 10.000 e 100.000), com níveis de exigência diferentes, com ambas as técnicas de sedimentação e por amostradores de sucção de ar (Quadro 3). A classe 100 é a mais rígida, utilizada para produção de microchips, sendo a classe 100.000 a utilizada na indústria de alimentos.

Quadro 3 – Recomendação da APHA para o controle microbiológico ambiental

Técnica	Classes de Limpeza Sistema Métrico Internacional		
	100	10.000	100.000
Nº máximo de partículas viáveis/ m ³ de ar	3,5	17,6	88,4
Nº médio de partículas viáveis/ cm ³ /semana	1,3	6,5	32,0

Fonte: SVEUM et al. (1992).

2.3. Controle e desinfecção do ar de ambientes de processamento na indústria de alimentos

2.3.1. Considerações gerais

Um programa de monitoramento da qualidade do ar pode ser aplicado em plantas de processamento de alimentos, com a finalidade de controlar patógenos e aumentar a "vida de prateleira" dos produtos. Um acréscimo de sete dias na "vida de prateleira" de leite pasteurizado foi obtido com o uso de um sistema asséptico de embalagem, que eliminou o risco de contaminação por microrganismos transportados pelo ar (JOOSTEN, 1985).

As alternativas de se reduzir a contaminação do ar são numerosas, mas a complexidade e as situações impõem a necessidade de análises cuidadosas, com a finalidade de estabelecer a metodologia mais eficiente. A análise dos vários fatores que contribuem para a contaminação dos produtos por microrganismos transportados pelo ar e o nível dessa contaminação podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de possíveis técnicas de controle.

A eficácia de qualquer forma de tratamento do ar, segundo WILSON (1958), um autor clássico, pode ser avaliada por meio da taxa de morte da população de microrganismos transportados pelo ar, sob a influência do agente germicida. Também, pode ser avaliada pela medida do percentual de redução de microrganismos viáveis no ar após a aplicação de determinado tratamento.

A desinfecção química do ar de ambientes requer o emprego de um germicida que tenha fácil acesso aos bioaerossóis. Por essa razão, sanificantes na forma de gás ou névoa fina são os mais efetivos (WILSON, 1958).

2.3.2. Agentes químicos empregados na desinfecção do ar na indústria de alimentos

O hipoclorito de sódio (NaOCl) foi o primeiro sanificante empregado para desinfecção do ar ambiente, antes mesmo de 1928, quando os pesquisadores Douglas, Hill e Smith demonstraram a capacidade desse agente químico em reduzir substancialmente o número de microrganismos presentes no ar. Entretanto, desvantagens desse sanificante logo foram apontadas: sua estabilidade e eficácia mantinham-se por apenas alguns minutos, além de ser muito corrosivo e irritante (WILSON, 1958).

Atualmente, outros sanificantes químicos têm sido utilizados para desinfecção do ar de ambientes na indústria de alimentos, principalmente por empresas de reconhecido nível tecnológico, como Perdigão, Parmalat e Nestlé. Entre esses sanificantes estão o ácido peracético, os quaternários de amônia e o digluconato de clorhexidina, utilizados por indústrias de produtos lácteos, produtos cárneos, produtos de panificação e outras (NISHIO, 2001). Geralmente, esses sanificantes são pulverizados logo após o processamento do alimento pela indústria, aplicados por pessoal devidamente protegido com máscaras contra gases, toucas, luvas e uniformes.

A Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988, publicada no Diário Oficial da União em 5 de setembro de 1988, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamenta o emprego desses sanificantes na indústria de alimentos. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), do Ministério da Saúde (MS), é o órgão responsável pela avaliação laboratorial desses sanificantes e pela comprovação de sua eficácia aos fins propostos (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

O ácido peracético é um sanificante constituído por mistura estabilizada de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo

estabilizante. Sabe-se que é excelente sanificante, com grande capacidade de oxidação dos componentes celulares. Além de sua baixa toxicidade, esse sanificante é eficaz contra bactérias Gram-positivas, fungos, leveduras, vírus e esporos bacterianos. Nas concentrações recomendadas de uso (300 a 700 mg/L), não é corrosivo ao aço inoxidável, vidro, PVC, polietileno, polipropileno e teflon. Ataca ferro, cobre, níquel, titânio, cromo, prata, zinco, alumínio e borrachas naturais ou sintéticas (ANDRADE e MACÊDO,1996).

As vantagens e desvantagens do emprego do ácido peracético estão resumidas no Quadro 4.

Quadro 4 – Vantagens e desvantagens do ácido peracético como sanificante na indústria de alimentos

Vantagens	Desvantagens
Excelente ação sanificante	Irritante da pele
Excelente atividade esporicida	Vapores irritantes
Age sob baixas temperaturas	Incompatível com ferro, cobre e alumínio
Baixo efeito residual	Baixa estabilidade à estocagem
Concentração facilmente determinada	Exigente de cuidados no manuseio

Fonte: ANDRADE e MACÊDO (1996).

As soluções de ácido peracético são mais eficientes em temperaturas abaixo de 35 °C e pH entre 2 e 4. Um monitoramento da concentração dos princípios ativos deve ser realizado nos lotes de produto comercial adquiridos para uso industrial, por titulações de volumetria de oxirredução, por iodometria e permanganometria, devido à instabilidade do produto (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

O mecanismo de ação das soluções de ácido peracético está associado à oxidação de componentes celulares, interferindo nos processos metabólicos e no equilíbrio químico-osmótico da membrana, podendo causar seu rompimento (FRASER, 1987).

Os compostos quaternários de amônia, também conhecidos como “quats”, são tensoativos catiônicos que apresentam atividade germicida mais relevante do que sua capacidade de atuar como detergente. As substâncias desse grupo contêm, em sua estrutura, um átomo de nitrogênio ligado covalentemente a quatro grupos alquil ou aril. Uma carga positiva é, então, formada no átomo de nitrogênio. Essa carga se mantém no composto, independentemente do pH, o que diferencia essas substâncias dos compostos anfóteros. Assim, a solução aquosa dos quaternários de amônia liberam carga positiva. O cátion é um radical orgânico e o ânion, um halogênio. A modificação desses radicais dá origem a grande número de derivados com atividade germicida (ANDRADE e MACEDO, 1996).

Esses compostos são afetados pela dureza da água e atuam melhor na faixa de pH entre 5 e 10 (WILDBRETT, 2000).

Quanto à sua atividade sobre microrganismos, os compostos quaternários de amônia atuam com maior eficiência sobre bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.) e fungos filamentosos e leveduras. São menos eficazes contra bactérias Gram-negativas, como coliformes e algumas espécies de psicotróficos e não agem contra esporos bacterianos. Vários mecanismos de ação parecem estar relacionados, originando a atividade germicida dos compostos quaternários de amônia: inibição enzimática, desnaturação protéica e lesão da membrana citoplasmática, com vazamento dos constituintes celulares (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

A clorhexidina é um composto químico sintético pertencente à série das bisbiguanidas. Geralmente é comercializada na forma de solução aquosa de digluconato de clorhexidina em concentração de 20% p/v do princípio ativo. É mais eficaz contra bactérias Gram-positivas e possui menor ação contra fungos filamentosos (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

A clorhexidina pode ser inativada por precipitação por sais minerais, inclusive aqueles que respondem pela dureza da água. As soluções aquosas desse germicida não possuem cor e odor, parecendo apresentar baixa toxicidade em animais, além de não provocar danos à pele, às membranas e às mucosas de manipuladores, nas concentrações que apresentam efeito germicida (WILDBRETT, 2000).

As concentrações recomendadas desses sanificantes para desinfecção do ar em ambientes de processamento de alimentos são variadas, mas com limites máximos de uso preconizados pelos fabricantes (Quadro 5). Esses limites, segundo os próprios fabricantes, ainda carecem de base científica sólida, tendo sido realizados apenas alguns estudos internos e empíricos de sua eficácia.

Quadro 5 – Concentrações para uso, preconizadas pela Diversey Lever, de alguns agentes químicos usados para desinfecção do ar de ambientes na indústria de alimentos

Agentes Químicos Sanificantes	Concentrações de Uso
Ácido peracético	Entre 45 e 75 mg/L
Quaternário de amônio	Entre 700 e 1.200 mg/L
Digluconato de clorhexidina	Entre 1.000 e 2.000 mg/L

Fonte: TOSHIO (2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado na Planta de Laticínios da Fundação Arthur Bernardes e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

3.1. Avaliação da qualidade microbiológica do ar de ambientes de processamento

As amostras de ar para avaliação da qualidade microbiológica foram coletadas em seis ambientes de processamento predeterminados: plataforma de recepção, pasteurização de leite, embalagem de leite pasteurizado e processamentos de manteiga, doce de leite, queijos e iogurte. Os locais de amostragem foram assim escolhidos, em consequência da separação física já existente. Por exemplo, o processamento de manteiga e doce de leite ocorre numa mesma área e, portanto, em um único ambiente.

A avaliação da qualidade microbiológica do ar dos ambientes foi pelos métodos de sedimentação e de impressão em ágar. Três repetições foram realizadas em cada determinação e cada ambiente avaliado. As análises ocorreram em triplicata para cada repetição.

Simultaneamente à coleta de amostras, também foram medidas a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar de cada local de amostragem, por meio de psicrômetro giratório, com termômetros de bulbos úmido e seco.

Em cada ambiente de processamento, foram determinadas as contagens de microrganismos mesófilos aeróbios, de coliformes totais, de fungos filamentosos e leveduras e de *Staphylococcus* spp., por meio de PCA (Plate Count Agar), VRBA (Violet Red Bile Agar), PDA (Potato Dextrose Agar) e BPA (Baird–Parker Agar), conforme metodologias propostas pela APHA (SVEUM et al., 1992).

3.1.1. Técnica de sedimentação

Foram distribuídas, nos ambientes avaliados, placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 20 mL dos meios de cultura adequados, permanecendo expostas entre 15 e 30 minutos, para determinação de microrganismos mesófilos aeróbios, de fungos filamentosos e leveduras, de *Staphylococcus* spp. e de coliformes totais. Posteriormente, as placas foram invertidas e incubadas em condições ideais para cada determinação, de acordo com a APHA (1992): 25 °C/3-5 dias para fungos filamentosos e leveduras, 35 °C/48 horas para microrganismos mesófilos aeróbios e 37 °C/48 horas para coliformes totais e *Staphylococcus* spp. Após a contagem, os resultados foram expressos em UFC· m⁻²· semana⁻¹, calculados conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Partículas viáveis por m}^2/\text{semana} = \frac{\text{UFC} \times 10080^*}{\pi r^2 \cdot t}$$

em que

r = raio da placa de Petri, em metros;

* = minutos por uma semana;

π = 3,141516; e

t = tempo de exposição das placas de Petri.

3.1.2. Técnica de impressão em ágar

Foi utilizado o amostrador de ar MAS 100 da Merck, de um estágio. Foram coletados 100 L de ar para determinação de microrganismos mesófilos aeróbios e de fungos filamentosos e leveduras e entre 500 e 1.000 L para coliformes totais e *Staphylococcus* spp., em função da facilidade de recuperação desses microrganismos do ar.

Para as determinações dos grupos de microrganismos analisados, foram utilizadas placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 27 mL dos respectivos meios de cultura, conforme recomendações da APHA (SVEUM et al., 1992).

Durante os procedimentos de coleta de amostras de ar, a tampa do amostrador (pré-autoclavada a 121 por 15 minutos) foi repetidamente sanitificada, usando-se algodão com álcool etílico 70%, após cada amostragem (Figura 3).



Figura 3 – Sanificação da tampa do amostrador de ar com álcool etílico 70%.

Após cada coleta, as placas removidas do amostrador foram tampadas e incubadas em condições ideais em função do microrganismo pesquisado

(SVEUM et al., 1992), para posterior contagem, da mesma forma que para a técnica de sedimentação.

A contagem de UFC foi corrigida por meio de uma tabela desenvolvida e baseada no cálculo mostrado a seguir (ANDERSEN, 1958):

$$Pr = N [1/N + 1/N-1 + 1/N-2 + \dots + 1/N-r+1]$$

em que

Pr = número provável total de UFC/volume de ar;

N = número total de poros da placa de metal (400); e

r = número de poros através dos quais já passaram partículas viáveis.

Essa correção é uma função que reflete a pressuposição de que, quanto maior for o número de partículas viáveis impressas na placa, menor será a probabilidade de as próximas partículas passarem em orifícios vazios, subestimando a contagem. Dessa forma, o número de UFC por volume de ar em m³ pode ser determinado (ANDERSEN, 1958):

$$\text{UFC} \cdot \text{m}^3 = \frac{Pr}{V}$$

sendo

V = volume de ar coletado em m³.

3.2. Avaliação de sanificantes químicos no controle da microbiota do ar de ambientes de processamento de produtos lácteos

3.2.1. Agentes químicos sanificantes avaliados

Foram utilizados os seguintes agentes químicos sanificantes nas respectivas concentrações:

- a) Soluções de digluconato de clorhexidina a 1.000 mg/L e 2.000 mg/L, pH igual a 5,3 e 5,2, respectivamente, à temperatura

ambiente (20-25 °C), preparada a partir do produto concentrado (Polyorganic) contendo 20% de clorhexidina.

- b) Soluções de ácido peracético a 45 mg/L e 75 mg/L, pH igual a 4,2 e 3,8, respectivamente, à temperatura ambiente (20-25 °C), preparada a partir de produto concentrado (Divosan Forte da Diversey Lever), contendo 15% de ácido peracético.
- c) Soluções de quaternário de amônia a 700 mg/L e 1.200 mg/L, pH igual a 9,2 e 9,3, respectivamente, à temperatura ambiente (20-25 °C), preparadas a partir de produto concentrado (Divosan Divoquat Forte da Diversey Lever), contendo 23,4% de cloreto de alquil dimetilbenzil amônio.

3.2.2. Aplicação e avaliação das soluções químicas sanificantes utilizadas

A aplicação de cada sanificante foi feita por pulverização nas áreas de embalagem de leite pasteurizado e de processamentos de doce de leite, manteiga e queijos, previamente selecionadas, após o término do expediente, para avaliação de sua eficácia no controle da contaminação microbiológica do ar ambiente. Um bico pulverizador ligado à linha de ar comprimido da própria indústria foi utilizado, com aplicação de uma fina névoa, com pressão de aproximadamente 9 kg/cm² (Figura 4). Na proporção de 1L/160 m³ de ar, foram aplicadas as soluções sanificantes nos ambientes de processamento de queijos (330 m³ de ar), doce de leite e manteiga (330 m³ de ar) e de embalagem de leite (80 m³ de ar). Equipamentos de proteção, como luvas, máscaras de gás, óculos de proteção e gorros, foram utilizados para segurança e proteção do aplicador.

O intervalo para as aplicações com mesma concentração foi de três dias e para soluções com concentrações diferentes, de uma semana.

Para avaliação da eficiência dos sanificantes, foram realizadas as análises de microrganismos mesófilos aeróbios e fungos filamentosos e leveduras presentes no ar. Neutralizantes para os sanificantes aplicados e avaliados foram adicionados aos meios PCA (Plate Count Agar) e PDA (Potato Dextrose Agar), para inibir a interferência dos sanificantes nas análises, de acordo com as recomendações usuais (Quadro 6).



Figura 4 – Aplicação da solução sanificante por pulverização no ar dos ambientes.

Quadro 6 – Neutralizantes adicionados aos meios de cultura, ação e concentração de uso em meios sólidos ou líquidos

Neutralizante	Compostos a Neutralizar	Concentração Usada
Tween 80	Digluconato de clorhexidina e quaternário de amônia	1,5%
Lecitina	Digluconato de clorhexidina e quaternário de amônia	0,5%
Tiosulfato de sódio	Ácido peracético	0,5%

Fonte: adaptado de WILDBRET (2000).

As determinações desses grupos de microrganismos foram efetuadas em quatro tempos distintos: antes da aplicação e após 0,5, 12 e 24 horas, pelas técnicas de sedimentação e impressão em ágar. Assim, após realizar a análise no “tempo zero” (T_0), a aplicação foi feita após o expediente, às

17 horas, com término até 17h30; o “tempo um” (T₁) foi analisado às 18 horas, o “tempo dois” (T₂) às 5h30 do dia seguinte e, finalmente, “o tempo três” (T₃) às 17h30 também do dia seguinte.

3.3. Análise estatística

A microbiota do ar de ambientes de processamento no ‘Laticínios Funarbe’ foi avaliada por duas técnicas: sedimentação e impressão em ágar.

Os resultados obtidos nas determinações de mesófilos aeróbios, fungos filamentosos e leveduras, coliformes totais e *Sataphylococcus* spp. foram expressos em UFC· m⁻³ de ar e UFC· cm⁻²· semana⁻¹, bem como testados, quanto à sua normalidade e homogeneidade, pelos testes de Lilliefors e Cochran, respectivamente.

O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com seis ambientes avaliados. Três repetições foram realizadas nas determinações de cada microrganismo pesquisado, para cada ambiente avaliado. As análises ocorreram em triplicata (três placas de Petri contendo o meio de cultura) para cada repetição.

Os ambientes foram comparados quanto aos números microbianos encontrados no ar, por meio das duas técnicas. Os dados foram analisados por meio da análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

Para comparação das duas técnicas empregadas e avaliação da eficiência dos sanificantes pulverizados no ar dos ambientes, utilizou-se a análise descritiva dos dados obtidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da microbiota do ar de ambientes de processamento na indústria de laticínios pela técnica de impressão em ágar

No Quadro 7, mostram-se as faixas de contagem, as médias e os desvios-padrão dos números de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, presentes no ar de seis ambientes de processamento da indústria de laticínios onde a pesquisa se ambientou, avaliados pela técnica de impressão em ágar.

Os resultados da determinação de microrganismos mesófilos aeróbios foram comparados com a recomendação da APHA (SVEUM et al., 1992), para contagem total em placas. Não havendo recomendação específica da APHA para o número máximo sugerido de fungos filamentosos e leveduras, tomou-se como base para comparação o mesmo valor recomendado para contagem total em placas. Pode-se observar que as contagens médias em todos os ambientes estiveram acima de $90 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ de ar, ou seja, acima da recomendação daquela associação. No entanto, deve-se salientar que recomendações menos exigentes para ambientes de processamento na indústria de laticínios são encontradas na literatura (KANG e FRANK, 1989). Esses autores sugeriram de 180 a $360 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ de ar para microrganismos mesófilos aeróbios e de 70 a $430 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ para fungos filamentosos e leveduras, dependendo do ambiente de processamento. Outros autores recomendaram contagens menores que

Quadro 7 – Faixa de contagem, médias e desvio-padrão de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, em UFC· m⁻³, no ar de ambientes de processamento da Planta de Laticínios da Funarbe/UFV, pela técnica de impressão em ágar

	Fungos Filamentosos e Leveduras		Microrganismos Mesófilos Aeróbios	
	Faixa de contagem UFC· m ⁻³	X ± s UFC· m ⁻³	Faixa de contagem UFC· m ⁻³	X ± s UFC· m ⁻³
Pasteurização de leite	70 – 160	111,1 ± 6,9	110 – 600	313,3 ± 6,6
Recepção de leite	90-260	176,7 ± 49,8	20-380	161,1 ± 98,0
Processamento de doce de leite	60-1310	410,0 ± 490,8	10-440	135,6 ± 119,3
Processamento de queijos	90-610	342,2 ± 39,1	100-920	381,1 ± 289,8
Processamento de iogurte	100-940	294,4 ± 238,3	100-320	212,2 ± 47,6
Embalagem de leite	100-280	184,4 ± 38,6	60-170	100,0 ± 47,6

200 UFC· m⁻³ para salas de embalagem de produtos lácteos e menores que 1.400 UFC· m⁻³ de ar para plantas de processamento de sorvete (REN e FRANK, 1992b). Neste trabalho, realizado no ‘Laticínios Funarbe’, adotaram-se para comparação os valores recomendados pela APHA, entidade reconhecida internacionalmente.

As contagens dos diferentes grupos microbianos variaram entre 10 e 1.310 UFC· m⁻³ de ar nos ambientes de processamento. Esses resultados são similares aos obtidos em pesquisa que avaliou ambientes de processamento na indústria de laticínios, utilizando-se diferentes amostradores de ar (SULLIVAN, 1979). Em meios de cultura não-seletivos, esses pesquisadores encontraram contagens na faixa de 0,1 – 100 UFC/10 litros de ar, ou de 10 – 10.000 UFC· m⁻³ de ar.

Em pesquisa realizada em quatro indústrias de laticínios, foram encontradas contagens de $2.200 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ de ar, para microrganismos mesófilos aeróbios (REN e FRANK, 1992c). O experimento foi executado com as plantas em funcionamento, incluindo atividade de pessoal, de forma semelhante à condução desta pesquisa. Em outros trabalhos, determinaram-se contagens de 600 a $2.800 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ de ar, em uma indústria de processamento de sorvete (REN e FRANK, 1992b) e contagens de 1.100, 1.850 e $2.600 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ de ar nos ambientes de estocagem de leite cru, de processamento e de embalagem, respectivamente, em indústria de leite pasteurizado (REN e FRANK, 1992a). Constatou-se, portanto, que as condições higiênicas do ar dos ambientes de processamento da Planta de Laticínios da Funarbe são melhores do que aquelas mencionadas nessas pesquisas.

Com relação à atividade de pessoal, verificou-se, em determinadas condições experimentais, a relação desse fator com o aumento da contaminação do ar dos ambientes de processamento. Constatou-se que um manipulador de alimentos contribui com aproximadamente 20 a 70 bactérias por minuto (HELDMAN, 1967). No presente experimento, realizado no 'Laticínios/Funarbe' durante a avaliação da microbiota do ar, havia entre três e cinco manipuladores em atividade, por ambiente de processamento.

Valores de contagens microbianas como as encontradas neste experimento podem originar problemas de qualidade nos diversos produtos lácteos. Por exemplo, SULLIVAN (1979) constatou que 40% da variação da "vida de prateleira" de queijo "cottage" pode ser devida à contaminação do ar. O predomínio da contaminação de iogurte por coliformes, na superfície do produto envasado em potes plásticos, evidenciou que esses microrganismos foram transportados pelo ar e contaminaram o produto. A qualidade de um produto lácteo à base de açúcar, ovo e farinha de trigo, esterilizado pelo processo UAT, também foi afetada pela contaminação do ambiente de processamento. A contaminação intencional do ar em torno da máquina de embalagem (procedimento não-asséptico) com pulverização de três esporos/L de *Bacillus* spp. causou alteração em 24% das amostras desse produto. No entanto, apenas 2,5% das amostras apresentaram alteração quando foram pulverizados 210 esporos/L ao redor de uma máquina de empacotamento asséptico.

Segundo a literatura, vários fatores podem ter contribuído para a contaminação do ar dos ambientes de processamento no 'Laticínios/Funarbe' (VICKERS, 1986). A localização do laticínios e o controle das possíveis fontes de contaminação dentro da indústria são fatores importantes para a qualidade do ar que devem ser observados. As áreas críticas onde os produtos e as superfícies que entram em contato com os alimentos estão expostos ao ar devem estar fisicamente separadas de áreas não-críticas, como salas de administração e estocagem de leite cru. Outros pontos que deveriam ser observados são os sistemas de ventilação e exaustão, o próprio desenho e estrutura da planta e as práticas de fabricação.

No Quadro 8, encontra-se o resumo da análise de variância dos números de fungos filamentosos e leveduras e microrganismos mesófilos aeróbios nos ambientes de processamento. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os ambientes nas contagens de fungos filamentosos e leveduras, nem nas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios.

Quadro 8 – Resumo da análise de variância do \log_{10} do número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, em $\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$, no ar de ambientes de processamento da indústria de laticínios

F.V.	G.L.	Quadrados Médios	
		Microrganismos Mesófilos Aeróbios	Fungos Filamentosos e Leveduras
Ambiente	5	0,1619 ^{ns}	0,0841 ^{ns}
Resíduo	12	0,0652	0,0681
C.V.		11,385	11,306

n. s. = F não-significativo a 5% de probabilidade.

Os números de coliformes totais e de *Staphylococcus* spp. variaram de <1,0 a 1,7 e <1,0 a 4,3 $\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$, respectivamente. São contagens inferiores àquelas obtidas por SULLIVAN (1979), na faixa de 0,1–1,0 $\text{UFC}/10$ litros de ar, o que corresponde a 10,0 e 100,0 $\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$. Esses baixos números observados,

tanto neste experimento quanto no de SULLIVAN (1979), em relação aos obtidos na determinação de outros grupos microbianos, evidenciam que esses microrganismos parecem não sobreviver muito bem em aerossóis. Essas contagens baixas podem, ainda, ser devidas à associação do uso de meios seletivos e ao estado de estresse dos microrganismos em aerossóis. Segundo SVEUM et al. (1992), essa associação pode dificultar o crescimento e a determinação de microrganismos.

Com relação a coliformes totais, não houve diferença ($p>0,05$) entre os ambientes avaliados. Entretanto, em *S. aureus*, observou-se diferença ($p<0,05$) entre os ambientes na indústria de laticínios, objeto desta pesquisa, pelo teste de Duncan (Quadros 9 e 10). As maiores contagens foram obtidas nos ambientes de embalagem de leite pasteurizado, produção de queijos, doce de leite e manteiga.

Quadro 9 – Resumo da análise de variância do \log_{10} do número coliformes totais e de *Staphylococcus aureus*, em $\text{UFC} \cdot \text{m}^{-3}$, no ar de ambientes de processamento da indústria de laticínios

F.V.	G.L.	Quadrados Médios	
		Coliformes Totais	<i>Staphylococcus</i> spp.
Ambiente	5	0,0098 ^{n.s.}	4,8802 *
Resíduo	12	0,0074	1,5679
C.V.		35,95	92,64

n. s. F não-significativo a 5% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 10– Valores médios de *Staphylococcus* spp., expresso em UFC· m⁻³, nos ambientes de processamento avaliados em uma indústria de laticínios

Ambiente	Médias
Embalagem de leite pasteurizado	3,00 a
Processamento de queijos	2,89 ab
Processamento de doce de leite e manteiga	1,11abc
Processamento de iogurte	0,55 bc
Pasteurização de leite	0,44 c
Plataforma de recepção	0,11 c

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

4.2. Avaliação da microbiota do ar de ambientes de processamento na indústria de laticínios pela técnica de sedimentação

No Quadro 11, encontram-se as faixas de contagem, médias e desvios-padrão dos números de fungos filamentosos e leveduras e microrganismos mesófilos aeróbios, expressos em UFC· cm⁻²· semana⁻¹, obtidos pela técnica de sedimentação, nos ambientes de processamento da indústria de laticínios.

Os valores foram comparados com o número máximo de 30 UFC· cm⁻²· semana⁻¹ de microrganismos presentes no ar de ambientes na indústria de alimentos, conforme recomendação da APHA (SVEUM et al., 1992) para contagem total em placas. Não havendo recomendação específica da APHA para número máximo sugerido de fungos filamentosos e leveduras, tomou-se como base para comparação o valor recomendado para contagem total em placas, da mesma forma como para a técnica de impressão em ágar. Dois ambientes atenderam à recomendação da APHA: a sala de processamento de leite pasteurizado para fungos filamentosos e leveduras e a sala de embalagem de leite pasteurizado para microrganismos mesófilos aeróbios.

Quadro 11 – Faixas de contagem, médias e desvios-padrão de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, obtidos pela técnica de sedimentação (UFC· cm⁻²· semana⁻¹)

	Fungos Filamentosos e Leveduras		Mesófilos Aeróbios	
	Faixa de contagem UFC· cm ⁻² · semana ⁻¹	X ± s UFC· cm ⁻² semana	Faixa de contagem UFC· cm ⁻² · semana	X ± s UFC· cm ⁻² semana
Pasteurização de leite	10-42	21,7 ± 6,7	11-89	64,9 ± 11,6
Plataforma de recepção	21-52	31,4 ± 4,0	10-73	73,6 ± 55,6
Processamento de doce e manteiga	10-87	39,6 ± 28,0	18-95	46,9 ± 53,6
Processamento de queijos	15-79	45,2 ± 5,4	15-84	37,6 ± 8,3
Processamento de iogurte	10-97	45,5 ± 30,2	10-79	54,0 ± 58,5
Embalagem de leite	13-42	36,1 ± 6,6	10-50	26,4 ± 58,5

No Quadro 12, apresentam-se as análises de variância dos números de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, expressos em UFC· cm⁻²· semana⁻¹, nos ambientes de processamento. Constatou-se que não houve diferença (p>0,05), com relação a ambos os grupos microbianos avaliados, entre os diferentes ambientes.

A técnica de sedimentação não se mostrou capaz de recuperar, de forma considerável, células viáveis de coliformes totais e *Staphylococcus* spp. do ar, tendo em vista que as contagens, quase que em sua totalidade, foram menores que 10 UFC· cm⁻²· semana⁻¹ em todos os ambientes avaliados.

Quadro 12– Resumo da análise de variância do número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, pela técnica de sedimentação, expresso em UFC· cm⁻²· semana, nos ambientes de processamento da indústria de laticínios

F.V.	G.L.	Quadrados Médios	
		Microrganismos Mesófilos Aeróbios	Fungos Filamentosos e Leveduras
Ambiente	5	5,9112 x 10 ¹⁰ n.s.	2,7636 x 10 ¹⁰ n.s.
Resíduo	12	9,8335 x 10 ¹⁰	3,0468 x 10 ¹⁰
C.V.		64,61	49,26

n. s.- F não-significativo a 5% de probabilidade.

4.3. Influência da umidade relativa do ar e da temperatura ambiente sobre a microbiota presente no ar de ambientes de processamento na indústria de laticínios

Na Figura 5, apresentam-se os números médios expressos em UFC· m⁻³ de ar, de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, nas diferentes faixas de temperatura ambiente (°C) encontradas nos ambientes de processamento na indústria de laticínios.

Apesar das evidências de que a temperatura afeta a microbiota do ar, não pareceu haver relação entre as contagens dos dois grupos microbianos avaliados e a temperatura nos ambientes de processamento na indústria de alimentos. Isso ocorreu, possivelmente, devido às grandes variações climáticas no local, num mesmo dia, e à presença de vapor ou outras fontes de aquecimento nos ambientes de processamento. Em um trabalho de revisão, por exemplo, demonstrou-se a influência de diferentes temperaturas e umidades relativas do ar na viabilidade e no transporte de células vegetativas dispersas no ar: um gradiente de temperatura, na mesma direção do gradiente de transporte dos aerossóis, intensificou o transporte, enquanto o gradiente de temperatura, na direção oposta, afetou a viabilidade e o transporte da população microbiana dispersa no ar (HELDMAN, 1974).

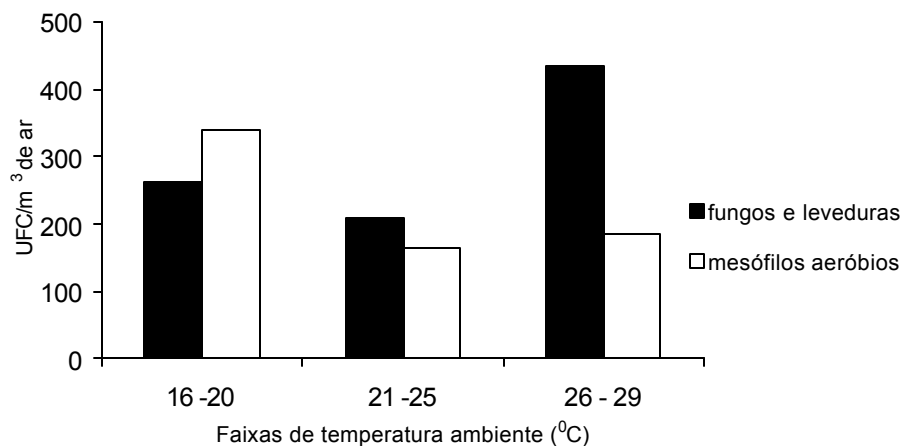


Figura 5 – Números médios (UFC· m⁻³ de ar) de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, nas diferentes faixas de temperatura do ar dos ambientes de processamento na indústria de laticínios.

Na Figura 6 estão apresentados os números médios de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, nas diferentes faixas de umidade relativa do ar encontradas na indústria de laticínios.

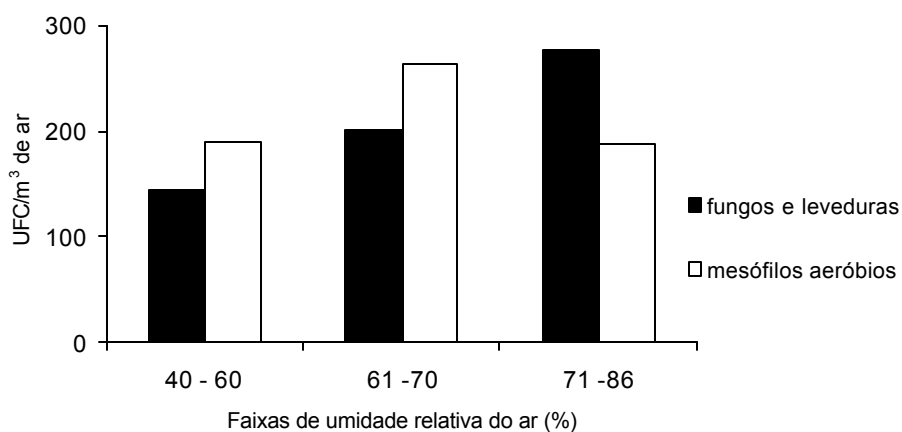


Figura 6 – Número médio (UFC· m⁻³ de ar) de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios, nas diferentes faixas de umidade relativa do ar encontradas na indústria de laticínios.

Pode-se observar, na determinação de fungos filamentosos e leveduras, que o aumento da umidade relativa elevou os números de microrganismos presentes no ar. Quanto à determinação dos microrganismos mesófilos aeróbios, o mesmo aconteceu até um limite de 70% de umidade relativa, ocorrendo, a partir daí, decréscimo nas contagens em razão, provavelmente, das grandes variações climáticas do local num mesmo dia e da presença de vapor ou de outras fontes de aquecimento. A influência da umidade relativa do ar na microbiota pode ser explicada pela maior facilidade das células microbianas em permanecer viáveis em aerossóis, com maiores umidades (KANG e FRANK, 1990). Essa influência pode ser observada também em esporos (MADELIN e JOHNSON, 1992). Esporos dispersos no ar, em condições de 95% de umidade relativa e 38 °C, apresentaram aumento em seu diâmetro e conseqüente modificação em seu comportamento aerodinâmico, em comparação com esporos dispersos em condições de 40% de umidade relativa do ar e temperatura de 20 °C. Em conseqüência, houve tendência de quebra dos aglomerados de esporos dispersos no ar com umidade de 95%, levando a alterações no comportamento aerodinâmico dessas partículas.

4.4. Distribuição dos diferentes grupos de microrganismos nos ambientes de processamento na Planta de Laticínios da Funarbe/UFV

No Quadro 13, encontra-se a distribuição dos diferentes grupos de microrganismos avaliados pelas técnicas de impressão em ágar e sedimentação, dentro de cada ambiente de processamento.

Quatro dos seis ambientes de processamento avaliados pela técnica de impressão em ágar apresentaram maiores porcentagens de fungos filamentosos e leveduras, à exceção das salas de pasteurização e de processamento de queijos. Os dados obtidos em literatura são contraditórios quanto à maior ocorrência de um ou outro grupo microbiano. Por exemplo, em trabalho de revisão, obteve-se a informação da menor ocorrência de fungos filamentosos em relação a outros grupos microbianos, em 10 indústrias de processamento de leite pasteurizado (SULLIVAN, 1979). Na mesma revisão, há informações sobre a maior ocorrência de fungos filamentosos no ar de ambientes da indústria de laticínios, de forma que o número de fungos filamentosos e leveduras variou de 10 a 110.000 UFC· m⁻³ e o de

Quadro 15 – Variação em porcentagem do número de fungos filamentosos e leveduras e de mesófilos aeróbios após a pulverização de soluções sanificantes nos ambientes de processamento na indústria de laticínios

Grupos Microbianos	Sanificantes	Concentrações mg/L	Redução nas Contagens nos Dias de Aplicação (%)			Efeito Residual (%)	
			0	3	6	T ₀ ¹ – T ₀ ²	T ₀ ² – T ₀ ³
Fungos Filamentosos e Leveduras	Digluconato de clorexidina	1.000	- 55,5	- 12,5	0	- 32,1	- 29,9
		2.000	- 29,6	- 28,75	+8,6	+12,7	+22,5
	Ácido peracético	45	- 6,1	+10,7	+44,8	- 8,9	- 2,8
		75	- 12,3	- 10,6	+34,7	- 13,5	- 13,9
	Quaternário de amônia	700	- 26,3	- 43,1	- 45,0	- 1,0	+3,5
		1.200	0	- 6,9	+6,4	+53,3	- 37,6
Mesófilos Aeróbios	Digluconato de clorexidina	1.000	- 5,1	+32,8	- 19,1	- 44,5	+77,9
		2.000	- 34,8	- 2,44	- 9,4	- 9,7	+9,3
	Ácido peracético	45	+24,9	- 22,2	- 29,8	+23,8	+12,5
		75	+29,6	+14,4	+5,8	- 19,1	+25,2
	Quaternário de amônia	700	- 79,5	+3,5	- 4,4	- 11,3	- 9,6
		1.200	+8,9	- 5,2	+18,1	+3,9	- 19,7

T₀¹ = contagem inicial na primeira aplicação, T₀² = contagem inicial na segunda aplicação e T₀³ = contagem inicial na terceira aplicação.

+ = acréscimo.
- = redução.

microrganismos mesófilos aeróbios, de 60 a 11.000 UFC· m⁻³ de ar. No entanto, na mesma revisão, mencionou-se um trabalho em que apenas 30% da microbiota do ar dos ambientes de processamento era composta de fungos filamentosos, sendo os 70% restantes constituídos de *Micrococcus* spp., bastonetes Gram-negativos, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., coliformes e outros.

Com relação à sala de pasteurização, pesquisa efetuada por REN e FRANK (1992a) em quatro plantas de laticínios apresentou resultados semelhantes aos deste experimento, com a predominância de microrganismos mesófilos aeróbios nas contagens. Naquela pesquisa, entre 40 e 65% das contagens de microrganismos mesófilos aeróbios foram maiores que 1.000 UFC· m⁻³, enquanto apenas 15% das contagens de fungos filamentosos e leveduras atingiram esses valores.

A técnica de sedimentação, que depende da deposição de partículas viáveis nas placas de Petri expostas ao ambiente, proporcionou resultados diferentes dos encontrados pela técnica de impressão em ágar. Cinco ambientes avaliados apresentaram contagens superiores de microrganismos mesófilos aeróbios, em relação à contagem de fungos filamentosos e leveduras. Isso pode ser explicado pelo comportamento aerodinâmico dos aerossóis, o que pode ter afetado a deposição de fungos filamentosos e leveduras nas placas de Petri expostas ao ar. Influenciado por características físicas e biológicas, o comportamento aerodinâmico dessas partículas é diferente para cada microrganismo, tendo interferência do diâmetro da partícula da umidade e temperatura ambientes, da ventilação, da atividade de pessoal, das forças gravitacionais e eletrostáticas (KANG e FRANK, 1989).

4.5. Comparação das técnicas de sedimentação e impressão em ágar

No Quadro 14, encontra-se a relação numérica entre as técnicas de sedimentação e impressão em ágar para fungos filamentosos e leveduras e para microrganismos mesófilos aeróbios. Para facilitar a análise dos dados, estabeleceu-se uma relação numérica entre as recomendações da APHA (SVEUM et al., 1992) para as técnicas avaliadas, ou seja, 30 UFC· cm⁻²/semana⁻¹ equivalentes a 90 UFC· m⁻³ de ar, numa relação 1:3.

Quadro 14 – Valores médios e relação numérica entre as contagens de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios pelas técnicas de sedimentação e impressão em ágar, nos ambientes de processamento de uma indústria de laticínios

Grupo Microb.	Técnicas	Pasteurização de Leite	Plataforma de Recepção	Processamento de Doce de Leite Manteiga	Processamento de Queijo	Processamento de Iogurte	Embalagem de Leite Pasteurizado
Fungos Filamentosos e Leveduras	Impressão em ágar UFC · m ³ de ar	111,1	176,7	410	342,2	294,4	184,4
	Sedimentação UFC · cm ⁻² sem ⁻¹	21,7	31,4	39,6	45,2	45,5	36,1
	Relação	1:5	1:5	1:10	1:7	1:6	1:5
Mesófilos Aeróbios	Impressão em ágar UFC · m ³ de ar	313,3	161,1	135,6	381,1	212,2	100,0
	Sedimentação UFC · cm ⁻² sem ⁻¹ .	64,9	73,6	46,9	37,6	54,0	26,4
	Relação	1:5	1:2	1:3	1:10	1:4	1:4

Para fungos filamentosos e leveduras, a técnica de impressão em ágar proporcionou contagens que variaram de 5 a 10 vezes mais que as contagens da técnica de sedimentação. Constatou-se, portanto, que a técnica de impressão em ágar foi capaz de recuperar do ar maior número de fungos filamentosos e leveduras.

Para microrganismos mesófilos aeróbios, a técnica de impressão em ágar proporcionou contagens que variaram de 2 a 10 vezes mais que as contagens pela técnica de sedimentação. Verificou-se que, na plataforma de recepção e na sala de processamento de doce e manteiga, as relações obtidas foram de 1:2 e 1:3, respectivamente. Mesmo assim, os resultados permitem concluir que a técnica de impressão em ágar novamente apresentou maior capacidade de recuperar microrganismos mesófilos aeróbios do ar, em relação à técnica de sedimentação. Quatro dos seis ambientes de processamento apresentaram relações entre as contagens obtidas pelas duas técnicas maiores do que 1:3.

Essa menor capacidade da técnica de sedimentação em recuperar microrganismos do ar pode ser explicada pela necessidade de certo tempo de exposição, para deposição das partículas nas placas de Petri. Por exemplo, partículas de diâmetro igual ou superior a 10 μ se deslocam verticalmente entre 30 e 60 cm por minuto, e partículas menores necessitam de maior tempo para deslocarem essa distância, caso não haja interferência de fatores como ventilação, atividade de pessoal (SULLIVAN, 1979). Da mesma forma, a dimensão dos esporos também influencia a deposição. Diversos gêneros de fungos foram listados e classificados em três categorias, quanto às suas dimensões: esporos maiores (*Alternaria*, *Stemphiliium*, *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Diplospora*, *Monotospora* e *Sepedonium*); esporos intermediários (*M. sitophilia*, *Geotrichum*, *Cândida*, *Pullularia*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Homodendrum* e *Penicillium*) e esporos menores (*Ustilago*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Oospora*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Hemispora* e *Streptocyces*). Analisados pelas técnicas de sedimentação simples e impressão em ágar, para esporos maiores, intermediários e menores, as relações encontradas entre as duas técnicas foram de aproximadamente 1:5, 1:14 e 1:19, respectivamente (SAYER et al., 1969). Portanto, quanto menor a dimensão do esporo, mais visível a diferença entre as duas técnicas e a superioridade da técnica de impressão em ágar.

Os números de coliformes totais e de *Staphylococcus* spp., obtidos pela técnica de impressão em ágar, variaram entre <1,0 a 1,7 e <1,0 a 4,3 UFC· m⁻³, respectivamente. Entretanto, pela técnica de sedimentação, a maioria das placas não apresentou contagem desses grupos de microrganismos, sendo essas menores que 10 UFC· cm⁻²· semana⁻¹, valor mínimo medido pela técnica. Com base nesse resultado, evidencia-se a maior capacidade da técnica de impressão em ágar para determinar patógenos.

O tempo de análise requerido também é um fator importante para a comparação das técnicas, pois a sedimentação exige tempo maior de exposição das placas de Petri ao ar ambiente. Período longo de exposição dessas placas pode resultar em ressecamento do meio de cultura, dificultando o crescimento das colônias e subestimando as contagens (SAYER et al., 1969). Na técnica de impressão em ágar, embora o ar que entra no amostrador seja tido como seco, a umidade dentro do amostrador aumenta rapidamente, não permitindo o ressecamento do meio de cultura. Em um estudo, essa umidade do ar era de 23% antes de entrar no amostrador e passou para 39% dentro deste. Esse estudo também evidenciou que a passagem do ar pelo amostrador, durante uma hora, não reduziu as contagens de *Serratia marcescens* (ANDERSEN, 1958).

Comparando as duas técnicas em relação à classificação dos ambientes de processamento da indústria quanto às recomendações da APHA (SVEUM et al., 1992), como já mencionado (itens 4.1 e 4.2), verificou-se que os números obtidos pela técnica de impressão em ágar não indicaram nenhum ambiente atendendo a tais recomendações. Entretanto, a técnica de sedimentação indicou a sala de pasteurização de leite e de embalagem de leite pasteurizado como estando dentro das recomendações para fungos filamentosos e leveduras e microrganismos mesófilos aeróbios, respectivamente. Este último resultado permitiria aprovar dois ambientes de processamento na indústria, como estando dentro das recomendações quanto às condições de higiene do ar, devido à menor capacidade da técnica em recuperar microrganismos transportados pelo ar.

Apesar de a técnica de impressão em ágar ter custo mais elevado devido à necessidade de aquisição de amostrador de ar, é uma técnica que permite maior rapidez nas análises, recupera maior número de microrganismos

do ar e, conseqüentemente, tem maior sensibilidade para determinar a presença de patógenos. Além disso, a técnica de sedimentação é atualmente classificada pela APHA (1992) como classe D, ou seja, um método que era considerado padrão - classes O, A1 ou A2 -, mas, devido a tecnologias mais avançadas, foi substituído por métodos classificados como superiores. Já a técnica de impressão em ágar é superior, considerada como classe B, um método testado e usado com sucesso em pesquisas. A maior qualidade e a rapidez da avaliação pela técnica de impressão em ágar compensam, sem dúvida, o investimento inicial do amostrador de ar.

4.6. Avaliação do uso e da eficiência de agentes químicos no controle da microbiota do ar de ambientes de processamento na indústria de laticínios

Três ambientes foram selecionados para pulverização dos sanificantes: embalagem de leite pasteurizado e processamento de doce de leite e manteiga e produção de queijos. Os ambientes foram selecionados para serem os mais separados possíveis um do outro no 'Laticínios da Funarbe/UFV', desfavorecendo a interferência de um sanificante em outro.

Em razão dos resultados e de informações da literatura (OTTAVIANI, 1982; OTTAVIANI e FRANCESCHETTI, 1982), considerou-se que houve ação antimicrobiana do sanificante quando a redução das contagens microbianas foi de, pelo menos, 15% em duas das três aplicações do agente químico, 30 minutos após a pulverização ambiental. Considerou-se, ainda, que a solução sanificante apresentou efeito residual quando ocorreram reduções de pelo menos 10% nas contagens determinadas antes da pulverização, da primeira para a segunda aplicação e da segunda para a terceira aplicação. A avaliação do uso dos sanificantes foi realizada nos diferentes tempos de análise do ar dos ambientes: T_0 antes e T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente, 0,5, 12 e 24 horas após a pulverização.

Nas Figuras 7, 8 e 9 e no Quadro 15, apresentam-se os resultados das aplicações das seguintes soluções sanificantes, à temperatura ambiente (20-25 °C), para fungos filamentosos e leveduras e para microrganismos mesófilos aeróbios: digluconato de clorhexidina a 1.000 e 2.000 mg/L (pH 5,3 e

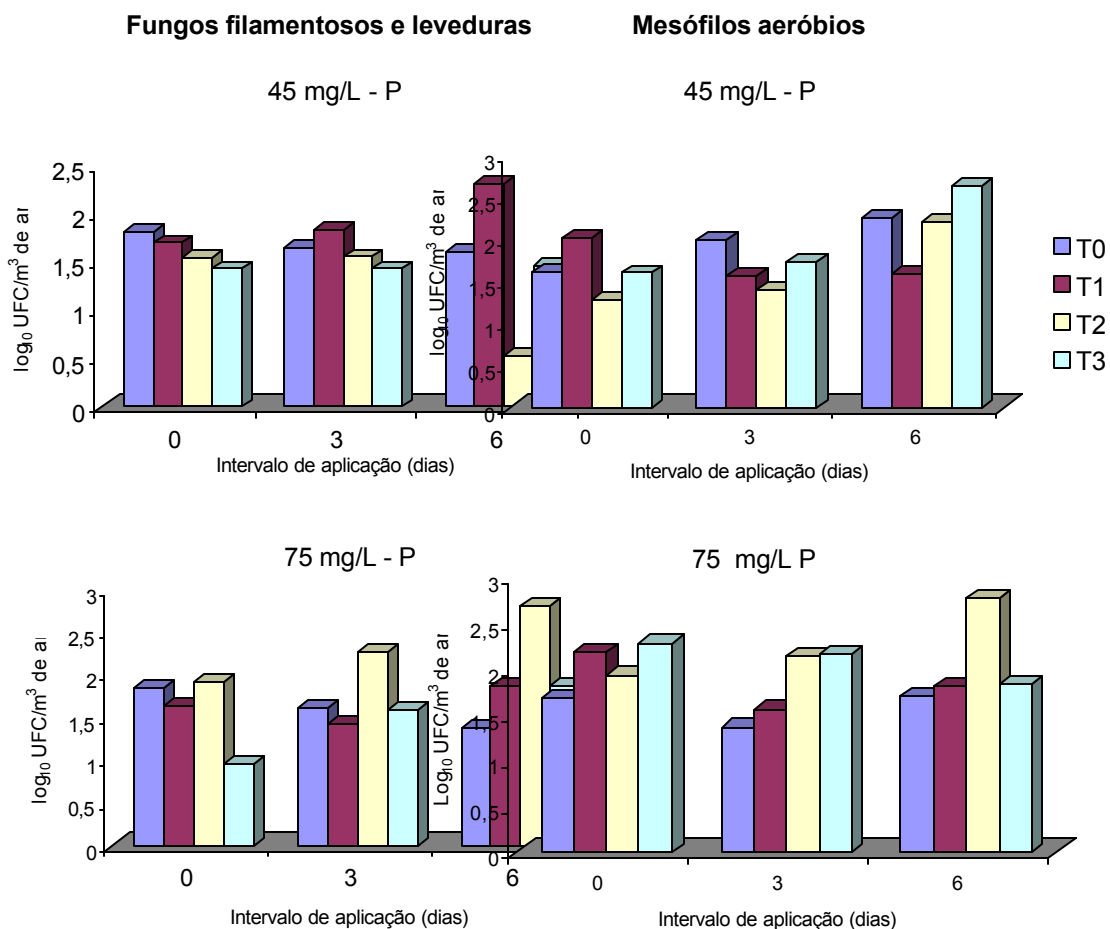


Figura 8 – Número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios em diferentes tempos de análise do ar e em três aplicações de solução de ácido peracético a 45 e 75 mg/L, pH 4,0 e 3,8, respectivamente, à temperatura de 20 a 25 °C. Dados transformados em log₁₀.

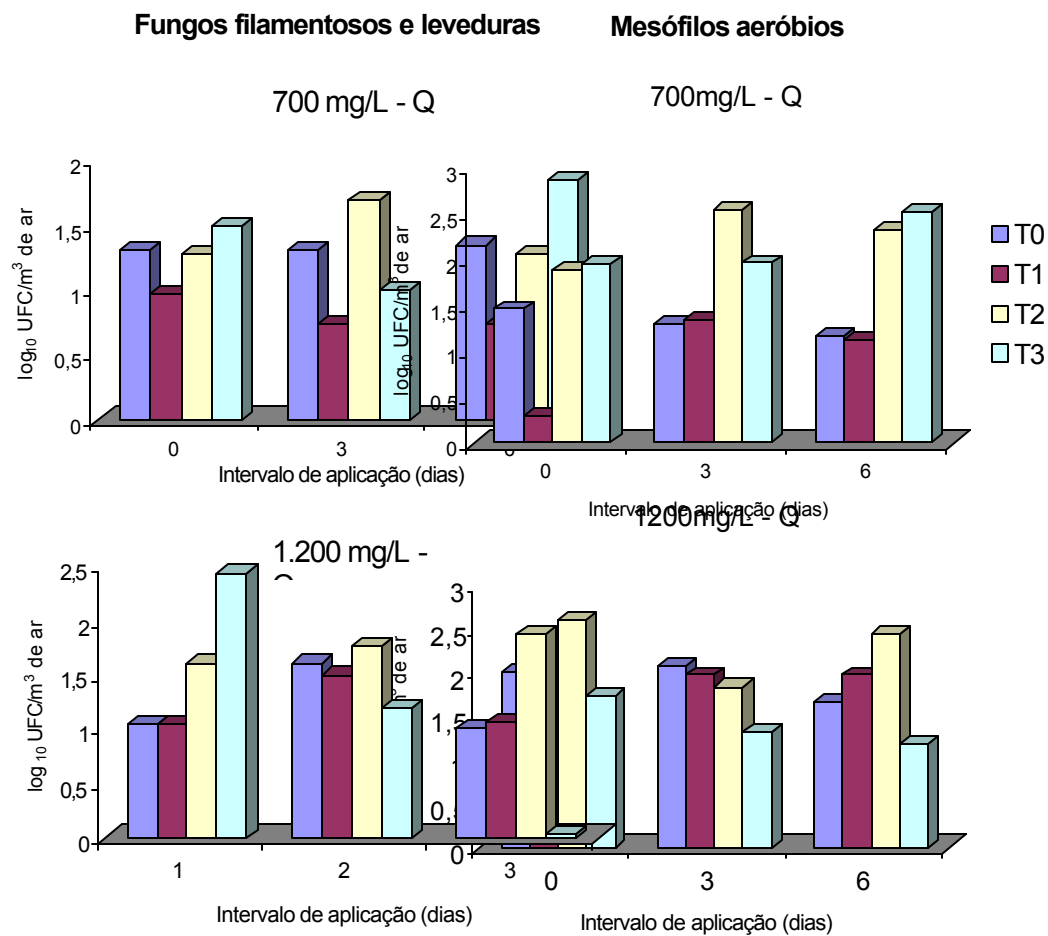


Figura 9 – Número de fungos filamentosos e leveduras e de microrganismos mesófilos aeróbios em diferentes tempos de análise do ar e em três aplicações de solução de quaternário de amônia a 700 e 1.200 mg/L, pH 9,2 e 9,3, respectivamente, à temperatura de 20 a 25 °C. Dados transformados em log₁₀.

Quadro 13 – Porcentagens dos diferentes grupos de microrganismos avaliados pelas técnicas de impressão em ágar e sedimentação, dentro de cada ambiente de processamento na indústria de laticínios

Técnica	Grupos Microbianos	Ambientes					
		Pasteurização de Leite	Plataforma de Recepção de Leite	Processamento de Doce de Leite e Manteiga	Processamento de Queijos	Processamento de Iogurte	Embalagem de Leite Pasteurizado
Impressão em ágar	Mesófilos Aeróbios	73,82	47,70	24,85	52,69	41,88	35,16
	Fungos Filamentosos e Leveduras	26,18	52,30	75,15	47,31	58,12	64,84
Sedimentação	Mesófilos Aeróbios	74,92	70,09	54,30	45,40	53,30	42,30
	Fungos Filamentosos e Leveduras	25,08	29,91	45,70	44,60	45,70	57,70

5,2, respectivamente), ácido peracético a 45 e 75 mg/L (pH 4,2 e 3,8, respectivamente) e quaternário de amônia a 700 e 1.200 mg/L (pH 9,2 e 9,3, respectivamente). O intervalo entre as aplicações, para uma mesma concentração do sanificante, foi de três dias. Em concentrações diferentes, o intervalo entre as aplicações foi de uma semana.

Nas aplicações de digluconato de clorhexidina a 2.000 mg/L e de quaternário de amônia a 700 mg/L, foi observada a ação antimicrobiana da solução sanificante contra fungos filamentosos e leveduras. Contra microrganismos mesófilos aeróbios, foi constatada a ação antimicrobiana do ácido peracético a 45 mg/L. Nas aplicações de digluconato de clorhexidina a 1.000 mg/L, foi constatado efeito residual dos sanificantes contra fungos filamentosos e leveduras. Constatou-se, também, efeito residual da aplicação de ácido peracético a 75 mg/L contra fungos filamentosos e leveduras.

As soluções de digluconato de clorhexidina a 1.000 mg/L (para fungos filamentosos e leveduras), de digluconato de clorhexidina a 2.000 mg/L (para microrganismos mesófilos aeróbios), de ácido peracético a 75 mg/L (para fungos filamentosos e leveduras) e de quaternário de amônia a 700 mg/L (para microrganismos mesófilos aeróbios) apresentaram tendência de redução nas contagens de 30 minutos após as aplicações, embora não atendam ao critério adotado para considerá-las como de ação antimicrobiana. A solução de quaternário de amônia a 700 mg/L para microrganismos mesófilos aeróbios teve também tendência ao efeito residual, com reduções próximas a 10% nas contagens.

Em pesquisa realizada em uma indústria de alimentos, a pulverização, duas vezes por semana, do ar de ambientes de processamento com p-hidroxifenilsalicilamida para controle da contaminação por fungos apresentou reduções de 20-25% na contagem de esporos de fungos do ar após algumas semanas de tratamento (OTTAVIANI, 1982). Outra pesquisa também indicou reduções similares quando se utilizou o mesmo agente químico, em indústrias de laticínios, com contagens iniciais de fungos de $2.000 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ de ar. Após tratamento com $1,5 \text{ g/m}^3$ de p-hidroxifenilsalicilamida e tratamento de manutenção com $1,0 \text{ g/m}^3$ de ar duas semanas depois, houve redução de 15% nas contagens; após mais cinco tratamentos, a redução passou para 23-25%.

Nessa indústria de laticínios, a contaminação da manteiga que vinha ocorrendo em torno de 1.200 esporos de fungos por grama foi completamente eliminada (OTTAVIANI e FRANCESCHETTI, 1982). Essas reduções estão compatíveis com as encontradas no experimento desta tese.

As contagens de 12 e 24 horas após a aplicação das soluções sanitizantes (T_2 e T_3) apresentaram números elevados em relação aos outros tempos de análise. Uma possível explicação para essas maiores contagens é a variabilidade das condições de análise, que nem sempre puderam ser controladas nos ambientes, principalmente nesses tempos de análise. A atividade de pessoal, por exemplo, foi um fator de interferência importante nas análises. Os funcionários da indústria de laticínios em análise já haviam iniciado o expediente após 12 horas da aplicação, e 24 horas depois não era possível precisar e controlar há quanto tempo os funcionários haviam deixado o 'Laticínios/Funarbe'.

A dificuldade no controle das condições de análise pode ser comprovada por trabalho realizado na indústria de laticínios (KANG e FRANK, 1990). Constatou-se que, uma vez formados os aerossóis, são necessários 40 minutos ou mais para que o número de microrganismos presentes no ar dos ambientes de processamento retorne aos valores iniciais, ou seja, aos valores de antes da geração dos aerossóis. Assim, os ambientes de processamento avaliados neste experimento precisariam estar sem funcionamento há aproximadamente meia hora, para que as condições de análise fossem mais bem controladas.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho, avaliou-se a microbiota do ar de seis ambientes de processamento no 'Laticínios/Funarbe-UFV': recepção de leite cru, embalagem e pasteurização de leite e produção de queijos, iogurte, doce de leite e manteiga. Foram utilizadas as técnicas da impressão em ágar e da sedimentação. Avaliou-se, ainda, a eficiência de soluções diluídas de sanificantes à base de digluconato de clorhexidina, de ácido peracético e de quaternário de amônia, pulverizadas no ar (9 Kgf/cm²) em temperatura ambiente (20 a 25 ° C) .

As contagens de microrganismos mesófilos aeróbios em todos os ambientes, pela técnica da impressão em ágar, ultrapassaram 90 UFC· m³ de ar, conforme a recomendação da APHA (1985). Resultados semelhantes foram determinados para fungos filamentosos e leveduras, usando-se essa mesma base de comparação. Pela técnica de sedimentação, as contagens microbianas do ar de quatro ambientes também ultrapassaram 30 UFC· cm⁻²· semana⁻¹, conforme recomendado por essa associação. As contagens variaram de 70 a 1.310 UFC· m⁻³ e de 10 a 97 UFC· cm⁻²· semana⁻¹.

Constatou-se diferença (p<0,05) entre os ambientes apenas nas contagens de *Staphylococcus* spp., que estiveram entre <1,0 e 4,3 UFC· m⁻³. As contagens de coliformes totais estiveram na faixa de <1,0 a 1,7 UFC· m⁻³.

Quanto à distribuição da microbiota do ar, houve a predominância de fungos filamentosos e leveduras pela técnica de impressão em ágar e de

microrganismos mesófilos aeróbios pela técnica de sedimentação. Isso pode ser explicado pelo comportamento aerodinâmico diferenciado dos microrganismos.

Apesar de haver dados na literatura sobre a influência da temperatura no aumento da microbiota do ar, neste experimento não pareceu existir essa relação entre as contagens obtidas, em razão da variabilidade das condições de análise. A influência da umidade relativa nas contagens obtidas neste trabalho pode ser explicada pela maior facilidade de as células microbianas permanecerem viáveis em aerossóis na presença de maiores teores de umidades.

As técnicas de análise foram comparadas com base na relação de 1:3, estabelecida entre as recomendações da APHA de $30 \text{ UFC} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{semana}^{-1}$ e de $90 \text{ UFC} \cdot \text{m}^{-3}$ de ar. Pela técnica da impressão em ágar, houve contagens que variaram de 5 a 10 e de 2 a 10 vezes mais, respectivamente, que as obtidas por sedimentação. Tal resultado evidencia a maior capacidade da técnica de impressão em ágar de determinar microrganismos do ar, inclusive patógenos.

Neste trabalho, em razão da literatura disponível e dos resultados obtidos, considerou-se que houve ação antimicrobiana do sanificante quando a redução das contagens microbianas foi de pelo menos 15%, em duas das três aplicações do agente químico, 30 minutos após a pulverização ambiental. Considerou-se que a solução sanificante apresentou efeito residual quando ocorreram reduções de pelo menos 10% nas contagens determinadas antes da pulverização, da primeira para a segunda aplicação e da segunda para a terceira aplicação. A avaliação do uso dos sanificantes foi realizada nos diferentes tempos de análise do ar dos ambientes: T_0 antes e T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente, 0,5, 12 e 24 horas após a pulverização.

Nas aplicações de digluconato de clorhexidina a 2.000 mg/L e quaternário de amônia a 700 mg/L, foi observada a ação antimicrobiana do sanificante contra fungos filamentosos e leveduras. Na aplicação de ácido peracético a 45 mg/L, também foi constatada a ação antimicrobiana contra microrganismos mesófilos aeróbios. Nas aplicações de digluconato de clorhexidina a 1.000 mg/L e ácido peracético a 75 mg/L, foi constatado efeito residual do sanificante contra fungos filamentosos e leveduras. Um efeito residual da aplicação de ácido peracético a 75 mg/L também foi constatado.

Embora não estando dentro do critério adotado para consideração como ação antimicrobiana, as soluções de digluconato de clorhexidina a 1.000 mg/L para fungos filamentosos e leveduras, de digluconato de clorhexidina a 2.000 mg/L para microrganismos mesófilos aeróbios, de ácido peracético a 75 mg/L para fungos filamentosos e leveduras e de quaternário de amônia a 700 mg/L para microrganismos mesófilos aeróbios apresentaram tendência de redução nas contagens de 30 minutos após as aplicações. A solução de quaternário de amônia a 700 mg/L para microrganismos mesófilos aeróbios também apresentou tendência ao efeito residual, com reduções próximas a 10% nas contagens.

Com base nos resultados, sugere-se o seguinte: avaliar, pela técnica da impressão em ágar, a aplicação de sanificantes por períodos mais longos; fazer o rodízio de agentes químicos; e realizar e avaliar a associação da pulverização desses agentes com o controle de fontes na indústria que possam contribuir para a contaminação do ar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, A.A. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. **Journal of Bacteriology**, Washington, D.C., v. 76, p. 471-484, 1958.

ANDRADE, N.J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 1996. 182 p.

APHA – **Standard methods for the examination of dairy products**. 16. ed. Washington, D.C.: G.H. Richardson, American Public Health Association, 1985.

FRASER, J.A.L. Novel application of peracetic acid in industrial disinfection. **Specific. Chem.**, v.7, p. 180- 182, 1987.

HAYES, P.R. **Food microbiology and hygiene**. 2. ed. London: [s.n.], 1995. p.515.

HEDRICK, T.I.; HELDMAN, D.R. Air quality in fluid and manufactured milk products plants. **Journal of Milk and Food Technology**, Alban, N.Y., v. 32, p. 265-269, 1969.

HELDMAN, D.R. Significance and control of airborne contamination in milk and food plants. **Journal of Milk and Food Technology**, Alban, N.Y., v. 30, p. 13-17, 1967.

HELDMAN, D.R. Factors influencing air-borne contamination of foods. A review. **Journal of Food Science**, Chicago, I.L., v. 39, p. 962-969, 1974.

JOOSTEN, R.L. Methods to extend the shelf life of pasteurized milk. **Dairy Packaging Newsletter**, Brussels, n.12., p. 1-3, 1985.

KANG, Y.J.; FRANK, F.J. Biological aerosols: a review of airborne contamination and its measurement in dairy processing plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, I.A., v. 52, n. 7, p. 512-524, jul. 1989.

KANG, Y.J.; FRANK, F.J. Characteristics of biological aerosols in dairy processing plants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, I.L., v. 73, p 621-626, 1990.

LUTGRING, R.K. et al. Distribution and quantification of bioaerosols in poultry-slaughtering plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 7, p. 804-810, 1997.

MACHER, M.J. Air sampling methods for biological contaminants. Net. U.S.A., 2000. Disponível em: <<http://anderseninstruments.com/Macher.htm>>. Acesso em mar./2001.

MADLIN, T. M.; JOHNSON, H. E. Fungal and actinomycete spore aerosols measured at different humidities with an aerodynamic particle sizer. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, v. 72, p. 400-409, 1992.

MERCK. Microbial air monitoring- MAS 100 air sampler: technical information. Net. Taiwan, 2001a. Disponível em:<<http://www.merck.com.tw/>>. Acesso em mar/ 2001.

MERCK. Air sampler MAS 100 system. Net. U.S.A., 2001b. Disponível em: <<http://www.merck.de/english>>. Acesso em abr./2001.

MEHTA, S.K.; MISHRA, S.K.; PIERSON, D.L. Evaluation of three portable samples for monitoring airborne fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 62, n. 5, p. 1835-1838, maio 1996.

NISHIO, J. **Uso de sanificantes para a desinfecção ambiental**. São Paulo: Departamento de Marketing – Diversey Lever/ Brasil, 2001. (Comunicação pessoal).

OTTAVIANI, F. Detection and control of fungal contamination of the air. Experience and methodological proposals. **Tecnologie Alimentari**, Itália, v. 5, n. 4, p. 16-26, 1982.

OTTAVIANI, F.; FRANCESCHETTI, E. Air – borne moulds in the dairy industry - Review. **Latte**, Milan, v. 7, n. 6, p. 446-455, 1982.

RADMORE, K.; HOLZAPFEL, W.H.; LUCK, W. Proposed guidelines for maximum acceptable airborne microorganism levels in dairy processing and packaging plants. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam Netherlands, v. 6, p. 91-95, 1988.

REN, T.J.; FRANK, F.J. A survey of four fluid milk processing plants for airborne contamination using various sampling methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 1, p 38-42, jan.1992a.

REN, T.J.; FRANK, F.J. Measurement of airborne contamination in two commercial ice cream plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 1, p 43-47, jan.1992b.

REN, T.J.; FRANK, F.J. Sampling of microbial aerosols at various locations in fluid milk and ice cream plants. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 55, n. 4, p 279-283, abr.1992c.

SAYER, W.J.; SHEAN, D.B.; GHOSSEIRI, B.S. Estimation of airborne fungal by the Andersen sampler versus the gravity settling culture plate. **Journal of Allergy**, St. Louis, p. 214-227, out. 1969.

SULLIVAN, J.J. Air microbiology and dairy processing. **Aust. Journal of Dairy Technology**, Highett Victoria, v. 34, p. 133-138, 1979.

SVEUM, W.H. et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd. [S.I.]: APHA, 1992. cap. 3, p. 51.

TOSHIO, E. D. G. Departamento de Microbiologia – Diversey Lever/ Brasil. Publicação eletrônica [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <valeriacosta@tdnet.com.br> em 4 de jun. 2001.

VICKERS, VT. Control of airborne contamination in dairy processing plants. **N. Zeal. Journal of Dairy Science Technology**, v. 21, p. 89-98, 1986.

WILDBRETT, G. **Limpieza y desinfección en la industria alimentaria**. Zaragoza (España): Acribia, S.A., 2000. 349 p.

WILSON, G.S. **Disinfection and sterilization**: theory and practice. [S.I.]: D. Van Nostrand Company, INC., 1958. 396 p.