



# CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

ESTUDO DE DETERGENTES E DESINFETANTES ADEQUADOS PARA A  
INDÚSTRIA ALIMENTAR E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA MICROBIOLÓGICA DOS  
MESMOS PARA MÃOS E SUPERFÍCIES NAS UNIDADES FABRIS

por

Ana Cláudia Pinto Barbosa

Outubro 2019



CATÓLICA  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

ESTUDO DE DETERGENTES E DESINFETANTES ADEQUADOS PARA A  
INDÚSTRIA ALIMENTAR E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA MICROBIOLÓGICA DOS  
MESMOS PARA MÃOS E SUPERFÍCIES NAS UNIDADES FABRIS

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade  
Católica Portuguesa para a obtenção de grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Ana Cláudia Pinto Barbosa

Local: Imperial – Produtos Alimentares, S.A.

Orientação: Eng<sup>a</sup> Raquel Oliveira - orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Freni Tavoria – tutora

Outubro 2019



## Resumo

As empresas têm a responsabilidade de garantir a segurança e a higiene dos produtos, pois cada vez mais existem exigências e preocupações dos consumidores no momento da compra. Abordar conceitos e procedimentos de limpeza e desinfecção é essencial por forma a minimizar os riscos de contaminação.

A prática de higienização incorreta dos colaboradores leva grande parte das vezes à presença de microrganismos, tanto em superfícies como nas suas próprias mãos. Para garantir a segurança dos produtos produzidos, o presente estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia da higienização de diferentes detergentes e desinfetantes em mãos de manipuladores e superfícies ou equipamentos que entrem em contacto com os produtos alimentares.

Recolheu-se amostras, com recurso a zaragatoas, antes e após lavagem e desinfecção. Para a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, semeou-se em meio PCA, enquanto que para pesquisa de coliformes (fecais e não fecais) o meio utilizado foi o caldo Verde Bile Brilhante. Para as duas situações foram analisados microbiologicamente os dois desinfetantes e detergentes desinfetantes, com resultados satisfatórios em ambas, com taxas de redução na ordem dos 100 % e 98 % respetivamente, para mãos e superfícies.

Após análise microbiológica, para a seleção do desinfetante das mãos foi tido em consideração o facto de um dos desinfetantes apresentar odor floral após aplicação. Não sendo aconselhável para a indústria alimentar, o Desinfetante B foi o selecionado. Na escolha do detergente desinfetante para equipamentos, superfícies e utensílios após a mesma análise microbiológica, foi também considerado o preço por litro necessário em cada utilização bem como o tempo de atuação. Sendo assim, a empresa optou pelo Detergente Desinfetante Clorado 2, uma vez que apresentava vantagens em todos os níveis.

Num trabalho futuro, seria interessante desenvolver-se mais estudos utilizando meios de cultura mais específicos para determinados microrganismos, uma vez que estes apresentam um grupo amplo e diversificado e optar-se por técnicas de recolha mais eficientes e de mais rápida obtenção de resultados.

**Palavras-chave:** manipuladores; higiene; limpeza; desinfecção; indústria alimentar; microrganismos; formação; plano de higienização.

## **Abstract**

Companies have a responsibility to ensure product safety and hygiene, as there are increasing demands and concerns from consumers at the time of purchase. Addressing cleaning and disinfection concepts and procedures is essential to reduce the risk of contamination.

The practice of improper cleaning of employees often leads to the presence of microorganisms, both on surfaces and in their hands. To ensure the safety of the products produced, this study aimed to evaluate the effectiveness of cleaning different detergents and disinfectants in the hands of handlers and surfaces or equipment that come into contact with food products.

Swab specimens were collected before and after washing and disinfection, checking for the presence of different microorganisms. For the counting of aerobic mesophilic microorganisms, it was sown in PCA medium, while for coliforms (fecal and non-fecal), the medium used was Bright Blue Green. For both situations, the two disinfectants and disinfectant detergents were analyzed microbiologically, with satisfactory results in both, with reduction rates of 100% and 98%, respectively, for hands and surfaces.

After microbiological analysis, for the selection of hand sanitizer was taken into account the fact that one of the disinfectants has floral odor after application. Not being advisable for this industry, disinfectant B was selected. The choice of disinfectant detergent for equipment, surfaces and utensils after the same microbiological analysis was also considered the price per liter required in each use as well as the time of action. Therefore, the company opted for Disinfectant Detergent 2, as it had advantages at all levels.

In future work, it would be interesting to develop further studies using more specific culture media for particular micro-organisms, as they have a broad and diverse group and opt for more efficient and faster collection techniques.

**Keywords:** manipulators; hygiene; cleaning; disinfection; food industry; microorganisms; formation; sanitation plan

## **Agradecimentos**

O desenvolvimento deste trabalho não seria possível sem a ajuda e disponibilidade de várias pessoas, que de uma forma ou de outra contribuíram para o sucesso do mesmo.

Quero agradecer à empresa Imperial – Produtos Alimentares, S.A. que me deu a oportunidade de realizar o meu estágio e adquirir competências nesta experiência profissional.

Em particular, à Engenheira Raquel por toda ajuda, orientação e disponibilidade para me transmitir os seus conhecimentos, pois sem dúvida facilitou o meu trabalho e a minha aprendizagem.

À minha colega do Departamento do Controlo de Qualidade, Diana Campos, pois sem ela este trabalho tinha sido muito mais complicado, obrigada pela ajuda, ensinamentos e acima de tudo, pela amizade.

À Professora Doutora Freni Tavarã, por ter aceite ser minha orientadora, pela disponibilidade e pelo tempo dispensado.

Agradeço também às minhas amigas, que sempre me apoiaram nas horas mais difíceis na realização desta dissertação.

E claro, sem os meus pais isto não seria possível, um muito obrigada pela paciência, carinho e por acreditarem sempre em mim e nas minhas capacidades.

A todos os envolvidos neste trabalho, um muito obrigada!



# Índice

1. Enquadramento Teórico.....	1
1.1. A Indústria Alimentar.....	1
1.2. Higienização.....	2
1.2.1. Etapas do processo de higienização.....	2
1.2.2. Tipos de superfícies.....	3
1.2.3. Tipos, Origem e Natureza da Sujidade.....	4
1.2.4. Higienização dos manipuladores.....	5
1.2.5. Métodos de Higienização.....	6
1.3. Limpeza.....	8
1.3.1. Tipos de Limpeza.....	9
1.3.2. Detergentes.....	10
1.3.3. Fatores que afetam a eficiência dos detergentes.....	17
1.4. Desinfecção.....	17
1.4.1. Tipos de desinfecção.....	18
1.4.2. Desinfetantes.....	19
1.4.3. Fatores que afetam a eficácia dos desinfetantes.....	22
1.4.4. Problemas que surgem ao longo do processo de desinfecção.....	23
1.5. Testes para avaliar a eficácia das atividades de Limpeza e Desinfecção.....	25
1.5.1. Avaliação da presença de resíduos.....	25
1.5.2. Avaliação microbiológica.....	26
1.6. Análises Microbiológicas.....	28
1.6.1. Procedimentos de esterilização e assepsia.....	28
1.6.2. Métodos de cultura para contagem de microrganismos em placa <sup>[40] [48]</sup> .....	31
1.6.3. Meios de cultura para contagem de microrganismos.....	33
1.6.4. Preparação e esterilização dos meios de cultura.....	34

1.7. Legislação relativa à higienização na indústria alimentar .....	35
2. Apresentação do local de estágio .....	37
2.1. Departamento de Controlo de Qualidade Alimentar .....	38
2.2. Outras atividades desenvolvidas ao longo do estágio.....	38
3. Procedimento Experimental.....	39
3.1. Materiais e métodos utilizados .....	39
3.2. Locais de recolha .....	39
3.3. Plano de amostragem.....	39
3.4. Preparação de meios de cultura .....	40
3.5. Recolha de amostras .....	41
3.5.1. Mãos.....	42
3.5.2. Equipamentos e superfícies .....	43
3.6. Análises microbiológicas.....	44
3.7. Tratamento dos dados estatísticos .....	46
4. Resultados e Discussão .....	47
5. Conclusões Gerais e Trabalho Futuro .....	57
6. Referências Bibliográficas .....	59
7. Anexos .....	64

## **Abreviaturas**

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**HACCP** - *Hazard Analysis and Critical Control Points*

**CIP** – *Clean in place*

**NaOH** – Hidróxido de Sódio

**KOH** – Hidróxido de Potássio

**Si<sub>x</sub>O<sub>y</sub>** – Silicatos

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – Carbonato de Sódio

**NaHCO<sub>3</sub>** – Bicarbonato de Sódio

**H<sup>+</sup>** - Ião hidrogénio

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>** - Ácido fosfórico

**EDTA** - Ácido Etilenodiaminotetracético

**RNA** - Ácido Ribonucleico

**UFC** - Unidades Formadoras de Colónias

**RODAC** - *Replicate Organism Direct Agar Contact*

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**PCA** - *Plate Count Agar*

**DGS** - Direção Geral de Saúde

**B2C** – *Business to Commerce*

**IFS** - *International Food Standard*

***p*** – *p-value*

**MSA** – *Mannitol Salt Agar*

## **1. Enquadramento Teórico**

Ao longo dos anos por imposição da sociedade, as necessidades e hábitos alimentares têm-se alterado. As razões que levaram a estas mudanças devem-se ao aumento da carga de trabalho, à distância do local de trabalho à residência e ao ritmo frenético que atualmente se vive. Por estes fatores, torna-se fulcral retardar a deterioração dos produtos alimentares, de forma a aumentar o seu tempo de vida útil. Para tal, o consumo de refeições pré-preparadas tem vindo a aumentar, e em consequência, apesar dos avanços tecnológicos, o acréscimo de doenças de origem alimentar, tanto pela má confeção e mau cuidado como pela ingestão de alimentos contaminados que aparentemente consideram-se normais quanto ao sabor e odor. <sup>[1]</sup>

A contaminação pode facilmente começar na manipulação e no processamento alimentar, no entanto, o desenvolvimento de microrganismos pode ser propício caso os fatores intrínsecos e extrínsecos sejam favoráveis ao seu crescimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças de origem alimentar são maioritariamente da responsabilidade dos manipuladores, pelo desconhecimento ou por irresponsabilidade não cumprem as normas básicas de higiene e segurança alimentar. <sup>[1]</sup> De modo a evitar estes problemas em ambiente fabril, são implementadas regras básicas e obrigatórias de limpeza e desinfeção a equipamentos e superfícies, que ao longo do processo de fabrico se encontrem em contacto com o produto alimentar e a mãos de colaboradores, visto este representar um dos maiores problemas de transporte de microrganismos. <sup>[2]</sup>

### **1.1. A Indústria Alimentar**

O regulamento (CE) nº 852/2004 define a higiene dos géneros alimentícios como uma medida e condições necessárias para controlar os riscos e assegurar a segurança e conformidade do alimento para o consumidor. <sup>[3]</sup> Para este regulamento estar de acordo com a definição, todas as etapas da cadeia devem ser monitorizadas, para posteriormente serem aplicadas medidas, de forma a evitar possíveis contaminações desde o processo de transformação, transporte até ao momento do consumo. <sup>[4]</sup>

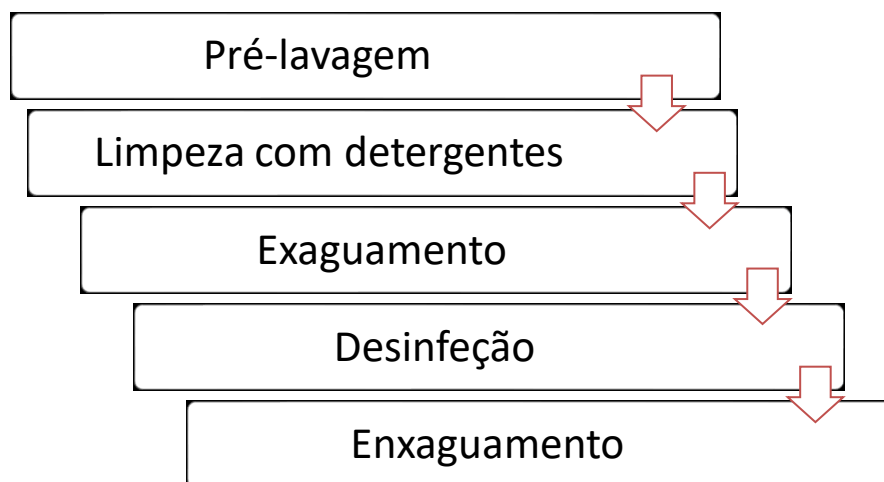
A segurança alimentar é importante para o bem-estar humano bem como para o crescimento de uma empresa. De forma a seguir os requisitos impostos pelo regulamento para uma produção de alimentos seguros, a empresa deve ter por base um sistema de pré-requisitos segundo o sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*). Neste

sistema deverá ter-se em consideração um programa de higienização, para instalações, equipamentos e utensílios, bem como um programa de higiene pessoal, no que diz respeito às mãos dos manipuladores de forma a evitar possíveis contaminações nas etapas de processamento. Os procedimentos devem ter em conta a extensão e a frequência das operações de higienização, que variam consoante o tipo de operação, natureza da superfície, grau de contacto com os alimentos e tipo de sujidade. [5] Para tal foi realizado um estudo através de análises microbiológicas de vários detergentes e desinfetantes com o intuito de se verificar a nível redutor o mais adequado à indústria alimentar.

## 1.2. Higienização

A palavra higienização deriva do grego *hygieiné* e significa saúde, consiste num conjunto de boas práticas com o intuito de remover materiais indesejados, como restos de alimentos, corpos estranhos, resíduos de produtos químicos e microrganismos, das superfícies de tal forma que os resíduos que persistem não apresentem qualquer risco para a qualidade e segurança alimentar do produto. [6][7]

### 1.2.1. Etapas do processo de higienização



**Figura 1** – Etapas do processo de higienização.

Os processos de higienização complementam-se, compreendendo as etapas de limpeza e desinfecção, como é possível observar na figura 1. A limpeza consiste num processo que inclui uma pré-lavagem com água fria a baixa pressão para a remoção de resíduos que se encontrem pouco agarrados à superfície, seguindo-se da aplicação de agentes químicos, como

detergentes. No caso de a sujidade ser composta por gorduras, é usual recorrer-se à utilização de água quente, no entanto, a temperatura não deverá ser demasiado elevada de modo a evitar a coagulação de proteínas no caso de estas se encontrarem presentes nas superfícies.<sup>[8]</sup> Posteriormente a este procedimento segue-se a desinfeção que é utilizada com o objetivo de reduzir o número de microrganismos, pela remoção ou destruição de forma a prevenir o crescimento microbiano no período de produção, este processo é obtido através da aplicação de desinfetantes nas diferentes áreas do processo de produção.

Para se obter um programa de higienização bem-sucedido é essencial perceber a natureza da sujidade que se pretende remover, o método mais adequado para essa remoção, bem como o método mais apropriado para avaliar a eficácia do processo usado.<sup>[9]</sup>

A implementação de um programa de higienização pressupõe a necessidade de:<sup>[10]</sup>

- Utilizar agentes de limpeza e desinfeção específicos para a área alimentar;
- Estabelecer programas de limpeza e desinfeção, segundo os requisitos definidos pela empresa para as instalações, superfícies, utensílios e equipamentos, respeitando a frequência, procedimentos e responsabilidades associados às respetivas atividades determinadas pela empresa;
- Testes que comprovem a eficácia dos detergentes e desinfetantes, como por exemplo microbiologicamente;
- Registo de desvios e da implementação de ações corretivas.

### **1.2.2. Tipos de superfícies**

As superfícies que estão em contacto com os alimentos devem se encontrar em boas condições e ser passíveis de ser facilmente limpas e desinfetadas, ou seja não devem ser corrosivas, porosas, absorventes e tóxicas para o produto.<sup>[6]</sup> O tipo de material influencia as características referidas anteriormente, sendo o melhor para entrar em contacto alimentício as designadas superfícies lisas, como é o caso do aço inoxidável. (Wildbrett, 2006) O aço inoxidável é resistente à corrosão, mas pode facilmente apresentar problemas e dificultar a limpeza e desinfeção, como no caso de ser utilizado um material que desgaste a superfície ou pela utilização de produtos químicos corrosivos, em que a superfície ficará riscada e a corrosão mais facilitada.<sup>[10]</sup> Contudo, até mesmo estas superfícies apresentam rugosidades, e tendo em conta que os microrganismos apresentam dimensões inferiores a 2 µm, facilmente

se podem fixar nessas zonas. (Baptista & Linhares, 2005) Considera-se que maior rugosidade acarreta maior fixação de microrganismos. (Wildbrett, 2006)

**Tabela 1** – Características e recomendações de algumas superfícies utilizadas na indústria alimentar.

(Fonte: Marriot, 1997) [6]

<b>Tipo de Material</b>	<b>Características</b>	<b>Recomendações</b>
<b>Madeira</b>	Absorve gorduras, óleos e humidade.	Não deve ser utilizado na área alimentar uma vez que não é higiénico e permite a fixação e desenvolvimento de microrganismos.
<b>Metal</b>	Enferrujamento aquando da utilização de detergentes ácidos ou clorados.	Galvanizar previne o enferrujamento.
<b>Vidro</b>	Impermeável e suave. Sensível a detergentes alcalinos fortes.	Utilizar detergentes alcalinos suaves ou neutros.
<b>Aço inoxidável</b>	Suave, impermeável e fácil de limpar. Resistente à corrosão e à oxidação a elevadas temperaturas.	Alguns tipos de este material podem ser alterados pelo uso de produtos de iodo, cloro, bromo ou flúor.

### **1.2.3. Tipos, Origem e Natureza da Sujidade**

A sujidade é constituída por um aglomerado de diversas partículas, do ponto de vista da sua origem, natureza química, estrutura física e tamanho, que se encontram unidas por uma matriz. [10]

A origem da sujidade divide-se em sujidade animal, vegetal e mineral. No que diz respeito à sujidade animal, esta inclui sujidades como gorduras, frequentemente existentes em unidades industriais ligadas a matérias-primas de origem animal, como por exemplo no setor de transformação de produtos cárneos, como matadouros ou salas de desmanche. As sujidades vegetais estão relacionadas com a produção de óleos e gorduras vegetais, quer em indústrias onde estes produtos são fabricados, como indústrias de azeite ou óleos vegetais, quer em indústrias onde estes produtos são incorporados no processo como matéria-prima, como por exemplo na indústria das conservas de peixe. Relativamente à sujidade mineral, consideram-se os óxidos e os depósitos minerais que se podem produzir em variadas situações, sobretudo

se forem induzidas pelo calor, este tipo de sujidade é muito frequente em indústrias como das cervejas ou lacticínios. <sup>[10]</sup>

Relativamente à composição e natureza da sujidade, esta divide-se em três grupos: orgânica, inorgânica e mista. A sujidade orgânica é constituída por proteínas, óleos e gorduras, secreções constituídas por materiais orgânicos. A sujidade inorgânica é composta por minerais, como óxidos e carbonatos. No caso de a sujidade incorporar material orgânico e inorgânico é classificada como mista. É crucial conhecer as características da sujidade para posteriormente se escolher o produto de limpeza mais adequado. <sup>[10]</sup>

#### **1.2.4. Higienização dos manipuladores**

Segundo o Anexo II, Capítulo VIII do Regulamento (CE) nº852/2004, relativamente à higiene pessoal, refere que pessoas que trabalhem em locais em que são manuseados alimentos, devem manter um elevado grau de higiene pessoal, usar vestuário adequado, limpo e se necessário que lhe conceda proteção. No caso de o manipulador sofrer ou ser portador de uma doença facilmente transmissível aos alimentos, este fica proibido de manipular ou entrar em locais de manuseamento alimentar, no caso de haver risco de contaminação direta ou indireta, e deverá avisar de imediato o operador do setor. <sup>[3]</sup>

Todo o manipulador deve retirar a barba ou bigode, usar cabelos presos e cobertos por toucas ou redes, evitar conversar, tossir ou espirrar sobre os alimentos, para evitar cair saliva sobre os mesmos; fumar apenas em locais permitidos; manter as unhas curtas e limpas, sem verniz e anéis; não usar adornos, como brincos, colares e pulseiras; lavar as mãos sempre que sair dos balneários, sempre que sair e voltar a entrar na área de produção, tocar no nariz, cabelo, sapatos, dinheiro e cigarros, tocar em alimentos estragados ou podres, ou seja, sempre que existir risco de contaminação para o alimento. <sup>[11]</sup>

A higiene pessoal dos operadores não é apenas responsabilidade dos próprios, as empresas que os empregam também apresentam um papel importante neste assunto, uma vez que devem garantir a formação, motivação, supervisionamento e monitorização para a implementação de boas práticas de higiene. (Sprenger, 2005) Portanto, a higiene pessoal representa uma grande importância para a higiene e segurança alimentar, prevenindo doenças e consequências a nível económico para as empresas, pois pode acarretar a perda de prestígio

e confiança dos consumidores, bem como ao pagamento de indenizações em casos mais extremos. [5]

### **1.2.5. Métodos de Higienização**

A escolha dos métodos de higienização, eficácia, custo e aconselhamento por parte de profissionais, são fatores de grande importância. Existem vários métodos, salientando-se a limpeza manual, imersão, alta pressão, espuma e gel e sistema CIP. [6]

- **Limpeza manual**

Este tipo de limpeza, requer muita mão-de-obra e atenção, uma vez que leva a resultados variáveis. Pouco sofisticada, é usual a limpeza manual usando equipamentos e complementos básicos (como escovas, raspadores, pistolas de água, lavagem com água quente) e água com detergente. (Antunes, 2008)

- **Imersão**

Esta técnica é usualmente utilizada para a lavagem de pequenas peças de equipamentos desmontáveis. Pode realizar-se com ou sem agitação, recorrendo ao uso de água quente e/ou detergente.

- **Alta Pressão**

Os equipamentos utilizados na alta pressão da água podem ser fixos ou portáteis, dependendo do tipo de operação e volume. As unidades portáteis têm dimensões inferiores e um compartimento que mistura os componentes de limpeza, bombeando de 40 a 75 L/min enquanto que as unidades fixas de 55 a 475 L/min, recorrendo ao uso de um pistão ou de uma turbina a bombagem altera-se para 300 L/min e 475 L/min, respetivamente. (Antunes, 2008)

- **Espuma e Gel**

Este método consiste em pulverizar a espuma ou gel nas superfícies do equipamento, deixando atuar durante um certo período de tempo. A utilização desta limpeza é muito aceite pela indústria alimentar, uma vez que evita a ação mecânica e poupança em termos de mão-de-obra.

- **Sistema CIP**

O sistema CIP (“*Cleaning In Place*”) é um método de limpeza que consiste na higienização de circuitos fechados, como tubagens, canalizações, tanques e bombas. Este sistema funciona com uma circulação, distribuição, aspersão e armazenamento de água e produtos de higienização sobre as superfícies a higienizar. [6] Com a ajuda de uma bomba faz-se circular o fluido, com uma turbulência, que está relacionada com a quantidade de sujidade que se arrasta. O caudal deve circular em sentido inverso ao utilizado habitualmente, para se conseguir arrastar, desta forma, a sujidade de zonas de mais difícil acesso, como espaços mortos. Este tipo de sistema tem as suas vantagens como ser muito mais rápido que um sistema de limpeza manual e exigir um trabalho menos intensivo, porém exige um investimento inicial elevado, justificando-se apenas a sua aplicação em empresas com grandes dimensões. [12] (Costa, 1994; Marriott, 2006)

A tabela seguinte permite verificar como certos fatores influenciam determinados métodos de higienização quando utilizados.

**Tabela 2** – Comparação entre diferentes métodos de higienização em diferentes situações. [6] Fonte: ICMSF 1991

	<b>Manual</b>	<b>Baixa Pressão</b>	<b>Alta Pressão</b>	<b>Espuma/Gel</b>	<b>CIP</b>
<b>Tipo de sujidade</b>					
Aderida	++	+	++	-	++
Solúvel em água	++	++	++	++	++
<b>Nível de sujidade</b>					
Elevado	++	+	++	-	++
Baixo	++	++	++	++	++
<b>Equipamento Aberto</b>					
Fácil acesso	++	++	++	++	-
Difícil acesso	-	-	+	++	-
Superfície Horizontal	++	+	++	++	-
Superfície Vertical	+	-	++	++	-
Espaços vazios	++	+	++	-	-
<b>Equipamento Fechado</b>					
Sem espaços vazios	-	-	++*	-	++
Com espaços vazios	+	-	++*	-	+

(\*) - no caso de recipientes; (++) - adequado; (+) – pode ser adequado; (-) – inadequado

A utilização de métodos de limpeza manuais e de baixa pressão são adequados para a limpeza de zonas de fácil acesso.

Resíduos alimentares que adiram fortemente às superfícies têm a necessidade da aplicação de muita energia para se obter um rendimento de limpeza satisfatório. Portanto, sistemas de baixa pressão e de Espuma/Gel podem ser inadequados. No entanto, restos solúveis em água podem ser usualmente eliminados por qualquer tipo de sistema de limpeza.

Em instalações abertas não é coerente a utilização de técnicas de limpeza CIP, sendo este sistema usual para tubagens fechadas e para equipamentos abertos com espaços vazios. Em equipamentos fechados, a existência de espaços vazios reduz a eficácia do sistema CIP. Para recipientes de grandes dimensões o sistema de limpeza mais adequado é o de alta pressão.

Para a limpeza de superfícies horizontais qualquer um dos sistemas de limpeza é adequado, enquanto que para superfícies verticais estas são limpas com maior facilidade com a utilização de sistemas de alta pressão ou espuma/gel. <sup>[6]</sup>

### **1.3. Limpeza**

Processo que tem como objetivo a eliminação de todo o tipo de sujidade em superfícies, utensílios e equipamentos e ainda o enxaguamento com água. (Batista & Linhares, 2005) <sup>[5]</sup> Este método pode ser executado por uma ação mecânica (bombas de água de alta pressão), química (utilização de detergentes) ou física (escovar, varrer, etc) sobre superfícies. A indústria alimentar recorre na maioria dos seus procedimentos à utilização de agentes químicos, os detergentes, combinados com a ação mecânica ou física. <sup>[8]</sup>

A reação de agentes ativos presentes nos detergentes com os componentes da sujidade facilita a eliminação e evita a deposição noutras partes ao longo da limpeza.<sup>[10]</sup> Além desta operação eliminar resíduos alimentares presentes nas superfícies, este processo permite eliminar parte de microrganismos que eventualmente possam estar presentes, particularmente nos restos de alimentos e não diretamente nas superfícies.<sup>[8]</sup> (Baptista, 2003; Antunes, 2008)

A limpeza é o primeiro passo para um plano de higienização eficaz. É um processo necessário para a obtenção de uma desinfeção eficaz, pois para que esta ação seja feita sem problemas é conveniente eliminar restos de sujidade. Além deste tipo de sujidade, a remoção de proteínas e de gorduras exige que ocorra uma reação de saponificação, uma vez que o

sabão é facilmente solubilizado pela água ou por uma emulsificação. No entanto, estas reações apenas ocorrem quando se utiliza detergentes alcalinos muito fortes.<sup>[8]</sup>

### **1.3.1. Tipos de Limpeza**

A seleção do método de limpeza adequado deve ter em conta a otimização dos resultados de limpeza final. Podendo ser classificados em limpeza alcalina, limpeza ácida, limpeza neutra e limpeza enzimática.<sup>[6][10]</sup>

- **Limpeza alcalina**

Neste tipo de limpeza são utilizados detergentes alcalinos desengordurantes, incluindo o hidróxido de sódio (soda cáustica), hipoclorito de sódio (lixívia) e o amoníaco.

A limpeza alcalina é utilizada para a lavagem de superfícies e resíduos orgânicos, como óleos, gorduras e proteínas. Estes detergentes são mais eficazes que os detergentes neutros para as sujidades de alimentos. No ponto seguinte irá ser abordado mais aprofundadamente as características e aplicações dos detergentes alcalinos na indústria alimentar.

- **Limpeza ácida**

Como o próprio nome indica, a limpeza ácida tem por base a utilização de detergentes ácidos, como o ácido acético, cítrico, clorídrico, entre outros. Estes ácidos podem ser subdivididos em duas categorias, ácidos fortes e ácidos moderados, que serão abordados de seguida.

- **Limpeza neutra**

A limpeza neutra utiliza detergentes neutros, os designados detergentes de uso geral, que incluem produtos de limpeza doméstico e produtos produzidos para o contacto frequente com as mãos. A ação destes detergentes advém da combinação das propriedades e ação tensioativa com a ação mecânica de escovar. Por apresentarem características suaves, são seguros para a utilização em superfícies pintadas ou corrosivas, no entanto, não são muito adequadas em indústrias alimentares, exceto se estas superfícies se encontrarem pouco sujas ou se existir tempo necessário para o contacto.

- **Limpeza enzimática**

A utilização de detergentes enzimáticos é uma alternativa aceitável em situações em que a aplicação de agentes alcalinos ou ácidos sejam um problema, como por exemplo na corrosão de um equipamento. <sup>[10]</sup> Para além disso, a quantidade de detergente utilizado é menor, conduzindo a um baixo consumo de água e energia. <sup>[5]</sup>

A indústria dos detergentes já recorre a este tipo de limpeza há algumas décadas, particularmente para lavagem de loiça, em restaurantes, cozinhas industriais, e em lavagem de têxteis. <sup>[10]</sup> Os detergentes enzimáticos são ainda adequados para eliminar sujidades que tenham por base gorduras, hidratos de carbono e proteínas. <sup>[5]</sup>

A utilização destes agentes acarreta grandes vantagens tanto a nível económico como ambiental, pois são biodegradáveis e podem ser utilizados a baixas temperaturas e pH próximo da neutralidade, para além disso são facilmente armazenados e constituem uma maior segurança para o operador. Com estes valores de pH as águas residuais não necessitam de ser previamente neutralizadas, sendo enviadas diretamente para estações de tratamento, poupando tempo e dinheiro. <sup>[5]</sup>

Este tipo de limpeza está em contínuo desenvolvimento e a sua aplicação poderá ser cada vez mais divulgada e utilizada. <sup>[5]</sup>

### **1.3.2. Detergentes**

Os detergentes são substâncias tensioativas com propriedades anfifílicas, ou seja, que apresentam na sua estrutura uma parte polar e outra apolar. A palavra detergente deriva do latim *detergens/detergentes* e significa limpar. <sup>[13]</sup>

Este termo aplica-se a materiais e produtos que promovam a remoção de resíduos numa dada superfície, pois permitem modificar a penetração e remoção da sujidade pela água, como por exemplo, comida de um prato ou sujidade numa toalha. Esta remoção é alcançada através da degradação de proteínas, gorduras e pela dissolução de sais minerais, impedindo que a sujidade se volte a depositar. No entanto, a eficácia que cada detergente apresenta depende de certas características, como por exemplo a formulação, condições de utilização, tipo de superfície que se pretende limpar e o tipo de sujidade a remover. <sup>[8]</sup> (Marriott, 1997; Showell, 2006)

### 1.3.2.1. Superfícies

Os detergentes podem-se dividir, dependendo da sua formulação, em diferentes grupos representando diferentes tipos de limpeza, tais como alcalinos, ácidos, surfactantes ou tensoativos e agentes quelantes.

- **Agentes alcalinos**

Os detergentes de limpeza alcalinos têm um pH compreendido entre 7 (neutro) e 14 (mais alcalino) e representam o maior composto ativo de limpeza presente na indústria alimentar. [14]

Conforme o grau de alcalinidade dos agentes de limpeza, os seus compostos adaptam-se a diferentes situações, como à limpeza manual ou à lavagem em circuito fechado (CIP). [5]

A sua utilização é indicada para a remoção de sujidades orgânicas, particularmente gorduras e proteínas, pois as suas propriedades são caracterizadas pela saponificação das gorduras e solubilização das proteínas de forma a facilitar a remoção das mesmas pela água. [5] (Lelieveld et al., 2005)

Existem três tipos de agentes de limpeza alcalinos, classificados como altamente alcalinos, moderadamente alcalinos e alcalinos suaves.

- **Agentes altamente alcalinos**

Produtos utilizados para a remoção de impurezas queimadas ou incrustadas. [14] Nas concentrações habitualmente utilizados são extremamente corrosivos para diferentes tipos de materiais, como alumínio, estanho e metal galvanizado e em contacto com a pele podem provocar queimaduras muito graves. [5]

O hidróxido de sódio (NaOH) é o agente mais utilizado na indústria alimentar, pelo seu custo reduzido bem como pela sua eficácia na remoção de alimentos ricos em lípidos, uma vez que permite que ocorra a saponificação dos mesmos. [15] Utilizado em preparações cáusticas, a sua capacidade de limpeza é elevada, tornando-se o agente alcalino mais utilizado e mais importante. [5]

No entanto, o NaOH, tem fracas características emulsificantes, dispersantes e molhantes, quando não estão na presença de aditivos funcionais. [5] A desvantagem da utilização deste tipo de detergente está associada ao facto de este precipitar sais de cálcio e magnésio

presentes em águas duras, criando depósitos nas superfícies dos equipamentos. Tal problema pode ser removido recorrendo à adição de outros ingredientes aos detergentes, dependendo das propriedades dos materiais em questão, tais como agentes anti-corrosivos, enzimáticos e quelantes. <sup>[15]</sup>

O Hidróxido de Potássio (KOH) e Silicatos ( $\text{Si}_x\text{O}_y$ ) são outros exemplos de agentes altamente alcalinos. <sup>[14]</sup>

#### - **Agentes fortemente alcalinos**

Eficazes na remoção de gorduras, no entanto a sua utilização não é eficiente em resíduos minerais. O poder de dissolução destes compostos é moderado e podem ser considerados desde ligeiramente corrosivos a nada corrosivos. <sup>[15]</sup>

O Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) é um agente moderadamente alcalino utilizado com grande frequência na composição de variados compostos de limpezas, tal como em limpeza manual como em sistemas de produção de vapor. <sup>[5]</sup>

#### - **Agentes alcalinos suaves**

Este tipo de compostos, como é o caso por exemplo do Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), são muito utilizados para limpeza manual de áreas superficialmente sujas. <sup>[5]</sup> Não removem resíduos minerais, no entanto são eficazes em águas sem calcário. <sup>[15]</sup>

#### • **Agentes ácidos**

A utilização de agentes ácidos na higienização da indústria alimentar denota-se pela necessidade de eliminar incrustações minerais formadas tanto pelo tipo de água utilizado no processo, como ao produto em si, resultando em depósitos de calcário. Removem ainda materiais secos ou incrustados nas superfícies. <sup>[5]</sup><sup>[15]</sup>

Habitualmente estes detergentes são compostos por ácidos orgânicos ou inorgânicos. Os ácidos orgânicos são ácidos fracos, que não corroem as superfícies, não irritam a pele e são removidos facilmente pela água, são exemplos deste tipo o ácido acético, cítrico e láctico. Os ácidos inorgânicos são designados por ácidos fortes e apresentam excelentes propriedades de remoção e controlo de depósitos minerais, contudo, podem ser bastante corrosivos para as superfícies e irritantes para a pele, incluem o ácido nítrico, sulfúrico e fosfórico. <sup>[5]</sup><sup>[14]</sup><sup>[15]</sup>

Ao contrário dos agentes alcalinos estes compostos são indicados para a remoção de sujidades inorgânicas, eficazes na eliminação dos depósitos minerais criados pelos agentes de limpeza alcalinos.

Como o poder de corrosão e perigosidade deste tipo de agentes é elevado, os detergentes que têm por base ácidos inorgânicos contêm apenas uma pequena quantidade deste princípio ativo, de forma a manter o pH apropriado para a atividade desincrustante pretendida. [15]

O íão hidrogénio ( $H^+$ ) é o principal composto nestes agentes, no entanto, a sua concentração varia resultando em detergentes com diferentes valores de pH. [5]

Os agentes ácidos são utilizados em condições muito particulares e não para uso geral. Ao contrário dos agentes alcalinos, a sua utilização é menos frequente uma vez que a sua eficácia é inferior na remoção de sujidades como gorduras, óleos e proteínas. [5]

#### - **Agentes fortemente ácidos**

Estes agentes removem a matéria incrustada nas superfícies de equipamentos de vapor, caldeiras e equipamentos utilizados no processamento alimentar. Dissolvem minerais depositados de forma a facilitar a sua remoção, porém, os minerais podem voltar a depositar-se e formar uma película quando a solução se encontra muito quente. [14]

Estes compostos são corrosivos para a maioria dos metais e estruturas de aço, são irritantes para a pele e o aquecimento dos mesmos leva à produção de gases tóxicos e corrosivos podendo afetar os pulmões. [6]

Um exemplo deste tipo de agente é o ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ).

#### - **Agentes moderadamente ácidos**

Compostos com um menor poder desincrustante comparativamente aos ácidos fortes. [5] São menos corrosivos e podem causar reações sensíveis, podendo em certos casos provocar irritações na pele e nos olhos. Os ácidos orgânicos são apropriados para limpezas manuais e conseguem diminuir a dureza da água. No entanto, são mais caros relativamente aos outros agentes ácidos. [6]

Ácido Levulínico, Hidroacético e Glucónico são exemplos de agentes moderadamente ácidos. [14]

- **Surfactantes ou Tensioativos**

Os surfactantes, também designado por tensioativos, são moléculas anfipáticas constituídas por uma parte hidrofóbica (apolar) ligada a uma cadeia hidrofílica (polar), estas moléculas são capazes de modificar a tensão superficial através da interface de duas fases imiscíveis, sólido-líquido, líquido-líquido e gás-líquido. <sup>[16]</sup>

Nos produtos de limpeza, estes compostos servem de auxílio para molhar as superfícies (poder molhante) e diminuir a tensão superficial entre a água e a sujidade, de modo que a sujidade seja eliminada da superfície, mas se mantenha dispersa na fase aquosa. As moléculas dos tensioativos diminuem a adesão da gordura na superfície sempre que as suas extremidades hidrofóbicas se juntam às suas partículas. <sup>[8]</sup> (Smulders, 2002; Showell, 2006)

A estrutura da parte apolar afeta as propriedades do surfactante, pois os que têm poucas ramificações nos seus grupos alquilo, normalmente apresentam melhor poder de limpeza, no entanto, reduzido poder molhante. Surfactantes com muitas ramificações, são o oposto, apresentam uma boa capacidade de molhagem, mas o seu poder detergente é insuficiente. <sup>[8]</sup>

Pode-se classificar um surfactante como iónico e não iónico, segundo a carga presente na cadeia lateral da molécula, após a sua dissociação em solução aquosa. No entanto, os iónicos dividem-se em três sub-classes: aniónico, catiónico e anfotérico. <sup>[8]</sup>

- **Surfactantes aniónicos** <sup>[5]</sup>

Cadeia hidrofílica com carga negativa, este tipo de surfactantes caracterizam-se pela sua elevada ação detergente e capacidade moderada-elevada de formação de espuma. É eficaz em todos os tipos de sujidades, podendo esta ser afetada na presença de águas duras.

Representam os tensioativos mais utilizados industrialmente. Habitualmente são combinados com surfactantes não iónicos com o objetivo de formar detergentes comerciais, como por exemplo detergente para lavagem de loiça.

- **Surfactantes catiónicos** <sup>[5]</sup>

Grupo polar com carga positiva, os surfactantes catiónicos são comumente constituídos por quaternários de amónio e apresentam boas propriedades microbianas, sendo utilizados como desinfetantes ou agentes higienizantes. No entanto, o seu poder detergente é reduzido, logo a sua aplicação em operações de limpeza é escassa.

#### - **Surfactantes anfotéricos**

Surfactantes constituídos por grupos hidrofílicos aniônico e catiónicos ligados a uma cadeia lipofílica. Este tipo de tensoativos depende do pH da solução onde são dissolvidos, no caso, de solução ácidas ( $\text{pH} < 3$ ), a molécula comporta-se como um tensoativo catiónico (carga positiva), no entanto, em soluções alcalinas ( $\text{pH} > 6$ ), a molécula atua como um tensoativo aniônico (carga negativa). <sup>[16]</sup>

São utilizados para melhorar as propriedades do surfactante principal e melhorar o desempenho do produto final quanto ao seu poder detergente, capacidade de formar espuma, espessamento e redução da irritação da pele. <sup>[16]</sup> Obtendo-se assim um composto com boa ação de desinfecção e de detergência. <sup>[5]</sup>

#### - **Surfactantes não iônicos** <sup>[5]</sup>

Agentes com elevada ação detergente, afetados somente pela dureza da água. A capacidade espumante varia de alta a baixa, consoante a razão hidrofílico/hidrofóbico, que por sua vez é afetada pela temperatura da solução de limpeza. Ou seja, se aumentar a temperatura da solução, a cadeia hidrofóbica e a solubilidade do composto não iônico diminui, chegando a poder atuar como antiespumante no ponto de solubilidade mínimo.

#### • **Agentes quelantes ou sequestrantes**

Estes compostos têm como objetivo eliminar os efeitos indesejáveis dos sais que contribuem para a dureza da água. Em muitas formulações de detergentes é necessário ter em conta o controlo de iões metálicos, pois nos processos de limpeza, por exemplo, a presença de iões de cálcio na água, leva à precipitação de tensoativos aniônicos, interferindo negativamente nos processos de limpeza. <sup>[5]</sup> Para tal, os agentes quelantes são adicionados à formulação do detergente, promovendo a remoção de iões de cálcio e magnésio, em soluções aquosas, evitando precipitações e mantendo a presença destes iões em solução. <sup>[8]</sup> (Sprenger, 2005)

Os sequestrantes mais utilizados na indústria são o Ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA) e os polifosfatos. (Wildbrett, 2006)

O EDTA é um composto que através dos seus sais de sódio e potássio consegue-se ligar aos íons de cálcio, ferro e magnésio da água. Tem a vantagem de ser estável a elevadas temperaturas, não é corrosivo e é compatível com quaternários de amónio. Através do EDTA desenvolveu-se compostos “tensioativos quelatantes”, que adaptam a atividade intersuperficial de um tensioativo com características que o EDTA tem para formar complexos com íons metálicos. <sup>[5]</sup> (Wildbrett, 2006)

O ácido fosfórico e os fosfatos inorgânicos também são utilizados como sequestrantes, pois influenciam de uma forma positiva o processo de limpeza e são resistentes à hidrólise a elevadas temperaturas. O ácido cítrico, é outro exemplo com propriedades quelantes, no entanto a sua eficácia diminui com elevadas temperaturas. <sup>[5]</sup>

Concluindo, para que a utilização de um detergente seja eficaz na remoção de resíduos que se encontram em superfícies ou utensílios, devem apresentar características essenciais, tais como: <sup>[8]</sup>

- Poder dissolvente (em resíduos minerais);
- Capacidade de saponificação e emulsificação em gorduras;
- Capacidade sequestrante ou quelante (em minerais responsáveis pela dureza da água);
- Bom poder de molhagem (pela ação dos surfactantes).

#### **1.3.2.2.Mãos**

- **Sabonete comum (sem efeito microbiano)**

Os sabonetes ditos comuns possuem características detergentes, mas não possuem propriedades antimicrobianas. No entanto, a lavagem utilizando este tipo de sabonete e água reduz o número de microrganismos presentes, pela ação mecânica exercida, mas não tem qualquer efeito na flora presente. Estudos demonstram que o tempo de duração da lavagem das mãos está relacionada com a redução da flora microbiana. Contudo, o uso deste tipo de sabonete pode estar ligado a irritações e secura na pele, para reduzir estes efeitos é necessário adicionar emolientes/ cremes hidratantes à formulação inicial. <sup>[5][17]</sup>

- **Sabonete antimicrobiano**

Os sabonetes antimicrobianos combinam as características de um detergente com a ação antimicrobiana, tendo por isso uma ação mais ampla que os sabonetes comuns. Estes sabonetes apresentam na sua constituição agentes antissépticos, que em conjunto com a ação mecânica reduzem os microrganismos presentes.

O agente químico mais utilizado neste tipo de sabonetes é o triclosan. Em concentrações de 1%, apresenta elevado poder fungicida e bactericida, sendo este maior em bactérias gram-positivas do que em gram-negativas. Inibe a síntese de proteínas, lípidos e ácido ribonucleico (RNA). A sua ação de limpeza é afetada pelas variações de pH, na presença de surfactantes e pode influenciar na presença de matéria-orgânica. [5] [17]

### **1.3.3. Fatores que afetam a eficiência dos detergentes**

Para que um detergente seja eficaz no momento da sua utilização, é necessário ter em conta vários fatores, tais como:

- a concentração utilizada da solução detergente;
- o tempo de contacto, que depende da quantidade e do tipo de sujidade, seguindo as recomendações do fornecedor;
- a temperatura da solução, pois acelera as reações químicas;
- da ação mecânica necessária, para retirar a sujidade das superfícies e dispersá-las pela solução de limpeza.

Estes fatores estão relacionados uns com os outros para se obter uma limpeza eficaz, o que implica que ocorrendo uma mudança numa destas condições influenciará a alteração de outras. [8] [14]

## **1.4. Desinfeção**

Após a limpeza, dependendo das necessidades, poderá ser necessário recorrer-se à desinfeção, que consiste numa operação que tem como objetivo final a redução de microrganismos viáveis, em especial patogénicos, por inibição ou destruição, que se

encontram nas mãos, superfícies, ambiente e por consequência no alimento, durante o período de produção. [8]

A desinfecção, é uma operação unitária do processo de higienização, devendo apenas ser aplicada após limpeza e respetivo enxaguamento, pois sem esta operação a desinfecção torna-se desnecessária. No caso de existir matéria orgânica presente nas superfícies, esta cria uma fonte de alimento e proteção aos microrganismos, dificultando assim o contacto do desinfetante com a superfície. [5]

Numa superfície previamente limpa, o processo de desinfecção pode ser obtido pela aplicação de agentes químicos e/ou métodos físicos, sem comprometer a segurança do alimento. Em superfícies húmidas, ou outras com condições que favorecem o crescimento de microrganismos é normal recorrer-se à utilização de desinfetantes. [6]

#### **1.4.1. Tipos de desinfecção**

A desinfecção pode ser aplicada de diferentes formas, por métodos químicos e/ou físicos (calor e radiação), sendo o mais comum, a desinfecção química, a desinfecção por calor e a desinfecção por radiação. A desinfecção por radiação, é habitualmente utilizada em grandes superfícies, como em unidades hospitalares e laboratórios. Na indústria alimentar este método é pouco utilizado, pois resíduos alimentares e outros tipos de sujidades absorvem a radiação, ou seja, esta exerce um efeito protetor nos microrganismos, dificultando a sua eliminação.

A desinfecção por calor, é um método capaz de eliminar todo o tipo de microrganismos e não é corrosivo, contudo, tem como desvantagem ser um procedimento caro e a impossibilidade de poder ser utilizada para a desinfecção de superfícies sensíveis ao calor. Contudo, caso toda a superfície que se pretende desinfetar se encontrar à temperatura e tempo necessário para a destruição dos microrganismos, este tipo de desinfecção é eficaz, como por exemplo, em circuitos fechados.

Na indústria alimentar, o método mais utilizado é a desinfecção química, ou seja, recorrendo à utilização de produtos químicos, como desinfetantes, sendo este tipo de desinfecção abordada de seguida. [5][6][8]

## **1.4.2. Desinfetantes**

Consoante o tipo de microrganismos que se pretende eliminar, seleciona-se o tipo de desinfetante apropriado, podendo este ser considerado como, desinfetante bactericida (eliminação de bactérias) e desinfetante antifúngico (eliminação de bolores). Podem-se apresentar na forma líquida (como álcoois), sólida (pó para diluir na água, como por exemplo pastilhas de cloro) e gasosa (como gás de cloro). [6] [8]

### **1.4.2.1. Superfícies**

A gama de desinfetantes existentes no mercado é bastante diversificada, no entanto os mais comuns utilizados na indústria alimentar são o cloro, o iodo, o peróxido de hidrogénio e os compostos de amónio quaternário. [6] [8] [14]

- **Cloro e compostos de cloro**

Desinfetante mais usado na indústria alimentar. São compostos muito utilizados pelo seu custo reduzido, o que torna rentável a nível económico e industrial. Bom poder antibacteriano de amplo espectro de ação, quando utilizados em concentrações adequadas não deixam sabor nos produtos alimentares. Contudo, a sua utilização não é eficaz na presença de alguns produtos orgânicos, podendo decompor-se com facilidade e formar substâncias cancerígenas. Em superfícies de alumínio, a utilização destes desinfetantes pode ser corrosiva se a concentração utilizada for superior ao indicado. Os compostos de cloro mais utilizados são os hipocloritos, nomeadamente o hipoclorito de cálcio e o hipoclorito de sódio.

- **Compostos de iodo**

Agentes que podem ser utilizados em conjunto com agentes de limpeza ácidos. Comparativamente aos compostos de cloro, são menos eficazes na inativação bacteriana, contudo a presença de matéria orgânica e a dureza da água não afeta significativamente a sua eficiência.

Necessitam de pouco tempo de contacto com a superfície para eliminar um grande espectro de bactérias, no entanto, na presença de resíduos alimentares ou outro tipo de sujidades, estes compostos são inativados. Para verificar que o iodo se mantém presente, estes apresentam uma cor amarelada, quando esta cor é perdida significa a inatividade do composto. Como este tipo de solução pode ser corrosiva, é necessário efetuar um

enxaguamento final abundante com água para se certificar que o agente desinfetante foi removido.

- **Peróxido de hidrogénio**

Descomposto em água e oxigénio, origina produtos inócuos sendo considerado como “amigo do ambiente”. Embora seja uma solução estável, é usual adicionar-se estabilizadores de forma a evitar a decomposição. Estes agentes são bons na eliminação de bactérias, vírus, leveduras e esporos bacterianos.

- **Compostos de quaternário de amónio**

Estes compostos apresentam uma boa capacidade de higienização em especial em meio alcalino, não são tóxicos e têm um nível de corrosão baixo, contudo, tendem a manter-se nas superfícies, sendo necessário o enxaguamento abundante com água depois de desinfetar. Não devem ser utilizados em simultâneo com detergentes ou agentes higienizantes aniónicos pois estes inativam os compostos de amónio quaternário. Apresentam bom poder bactericida, exceto em bactérias gram-negativas.

**Tabela 3** – Propriedades de desinfetantes utilizados na indústria alimentar. <sup>[5]</sup>

<b>Propriedades</b>	<b>Compostos de cloro</b>	<b>Compostos de iodo</b>	<b>Amónio Quaternário</b>
Ação contra bactérias gram-negativa	Bom	Bom	Mau
Ação contra bactérias gram-positiva	Bom	Bom	Bom
Ação contra esporos	Bom	Mau	Regular
Ação corrosiva	Sim	Ligeiramente	Não
Irritação na pele	Sim	Sim, em algumas pessoas	Não
Afetados pela matéria orgânica	Muito	Um pouco	Pouco
Presença de resíduos ativos	Não	Sim	Sim
Custo	Baixo	Baixo	Elevado

#### 1.4.2.2.Mãos

- **Desinfetantes à base de álcool** <sup>[5] [17]</sup>

A grande parte de antissépticos alcoólicos para as mãos, contém etanol, isopropanol, 1-propanol ou 2-propanol, ou uma combinação de dois destes compostos.

Atuam por desnaturação e coagulação proteica da lise celular e interrupção do metabolismo celular. Após a aplicação do desinfetante alcoólico as bactérias reaparecem na pele de uma forma mais lenta devido à sua atividade residual. Apresentam uma ação rápida e eficaz na destruição de bactérias e alguns vírus e fraca na remoção de esporos.

Os desinfetantes, para serem mais eficientes, devem ter na sua formulação a presença de 60 a 95 % de álcool, pois em concentrações maiores é mais difícil desnaturar as proteínas, uma vez que é necessário a presença de água.

Tal como para as superfícies, o álcool nas mãos não deve ser aplicado quando estas estão visivelmente sujas ou contaminadas com algum material proteico (como o sangue), pois estes não apresentam propriedades detergentes, para tal, antes da desinfeção deve-se recorrer à lavagem utilizando um sabonete que ajuda na redução microbiana.

A partir das características supracitadas acima, a escolha do desinfetante ideal deve seguir determinados requisitos, tais como: <sup>[5] [6] [10] [14]</sup>

- Largo espectro de ação;
- Boa solubilidade e doseamento fácil;
- Destruição rápida de microrganismos, mesmo a baixas temperaturas e concentrações;
- Aptidão para atuar mesmo na presença de sujidades;
- Não danificar as superfícies/utensílios com os quais entra em contacto;
- Segurança na utilização;
- Não irritante em contacto com a pele e olhos;
- Inócuo e inodoro;
- Sem transporte de sabor ou odor para o produto alimentar;
- Fácil remoção e enxaguamento;
- Económico.

Encontrar um composto com estas características é impossível, no entanto, para escolher o desinfetante certo, deve-se ter em conta as características e o fim para o qual se destina a sua utilização.

### **1.4.3. Fatores que afetam a eficácia dos desinfetantes**

De forma a se garantir a utilização e eficácia dos desinfetantes, é necessário ter em conta vários fatores: <sup>[6] [8] [14]</sup>

- **O tempo de contacto**

Característica importante para a utilização de um desinfetante, pois para além de se seguir as recomendações do fornecedor, é preciso ter em conta que quanto mais contaminada for uma superfície, mais tempo de contacto é necessário para se obter uma correta desinfeção.

- **Temperatura**

A temperatura é um fator que varia consoante o tipo de desinfeção que está a ocorrer, pois em muitos casos a forma geral de utilização é acima da temperatura ambiente, contudo o aumento da temperatura é restringido pela volatilidade dos desinfetantes.

- **Concentração**

A concentração a utilizar do desinfetante deve seguir as recomendações das fichas técnicas, no entanto, quanto maior for a concentração menor é o tempo de contacto necessário para ocorrer a desinfeção de forma positiva.

- **pH**

Cada tipo de desinfetante tem um espectro de valores de pH, onde é ideal ser utilizado e, portanto, onde é mais eficiente.

- **Dureza da água**

A dureza da água afeta a eficácia de certos desinfetantes, além de contribuir para formações de incrustações nas superfícies. No caso de dureza excessiva os agentes que têm na sua composição amónio quaternários não são tão eficazes.

- **Limpeza prévia**

Torna-se importante garantir a limpeza das superfícies antes da aplicação dos desinfetantes, uma vez que na presença de resíduos alimentares, estes formam uma barreira protetora de defesa sobre os microrganismos, dificultando ou anulando a ação do desinfetante. Assim, é fundamental garantir a remoção de toda a sujidade antes desta ação de desinfecção.

É interessante ter em conta que os microrganismos morrem de uma forma logarítmica, ou seja, se supusermos que em 10 minutos morrem 90% dos microrganismos presentes, os restantes 90% demoram outros 10 minutos a morrer, e assim sucessivamente. Portanto, no final dos 20 minutos apenas estariam presentes 1% dos microrganismos iniciais, conclui-se assim que quanto maior a contaminação, maior é o tempo despendido para eliminar de uma forma segura todos os microrganismos, ou seja, obter uma desinfecção eficaz. [6][8]

#### **1.4.4. Problemas que surgem ao longo do processo de desinfecção**

- **Formação de biofilmes** [5][8][14]

Devido à incorreta higienização ao longo do processo, equipamentos e superfícies tendem a desenvolver e acumular microrganismos, e conseqüentemente, a formar biofilmes.

Os biofilmes são conjuntos de células microbianas que aderem às superfícies, com uma matriz extracelular protetora, composta por glicoproteínas e polissacarídeos. (Lelieveld et al., 2005) São constituídos maioritariamente por água (de 80 a 95 %), sendo que a presença de microrganismos representa uma pequena percentagem inferior a 10 % da massa de biofilme.

Superfícies que permanecem húmidas durante um longo período de tempo, tendem a facilitar o desenvolvimento de microrganismos e de biofilmes, o mesmo acontece quando a temperatura é inferior a 50°C.

Para que estes sejam removidos de forma eficaz, deve-se garantir uma limpeza logo após o processamento, pois esta formação tem origem em locais de difícil acesso ou onde a higienização não é eficiente. O crescimento de biofilmes é mais comum em sistemas

fechados, como tubagens ou canalizações. Outra forma de remoção é recorrendo à utilização de soluções alcalino-cloradas.

Tanto para a indústria alimentar como para a economia da empresa, a formação de biofilmes, por movimentos ou vibrações do equipamento durante a produção, provoca a separação de alguns microrganismos do filme, levando à deterioração do alimento. O crescimento de microrganismos, em especial de patogénicos, requer o processo de desinfeção de forma a remover os microrganismos em forma de biofilme. (Forsythe, 2002)

De forma a prevenir e controlar a formação de biofilmes, a indústria alimentar deve ter em conta certos fatores, tais como, o material da superfície, o design do equipamento, a correta seleção de detergentes e desinfetantes, formação dos operadores e boas práticas de fabrico. (Kumar & Anand, 1998; Lilielveld et al., 2005)

- **Resistência a desinfetantes** <sup>[8]</sup>

Atualmente a indústria tem como preocupação garantir a higiene e segurança dos produtos alimentares que produzem, para tal uma forma de assegurar é garantindo a desinfeção de superfícies e equipamentos, através de métodos químicos. Pela vasta utilização deste método de desinfeção, surge o aparecimento da pressão seletiva, e posteriormente de microrganismos resistente aos desinfetantes.

Os microrganismos podem ser classificados de diferentes formas consoante a sua resistência às concentrações aplicadas de desinfetante, como por exemplo, se um microrganismo conseguir crescer ou sobreviver a elevadas concentrações, mais do que o habitual, considera-se que apresenta elevada resistência. No caso de dentro da mesma espécie existirem estirpes que não são inibidas ou conseguirem crescer quando as concentrações aplicadas do desinfetante têm o objetivo de matar ou inibir, consideram-se estirpes resistentes.

A resistência aos desinfetantes varia, os príões são os mais resistentes, enquanto que os vírus revestidos por lípidos são os mais facilmente inibidos. No caso das bactérias, as gram-negativas são mais resistentes que as gram-positivas e em geral as bactérias isoladas após a desinfeção tornam-se mais resistentes, sendo um problema para a segurança alimentar.

Para contrariar esta resistência, a indústria deve ter em conta vários fatores, tais como a otimização dos processos de higienização, o controlo da temperatura do processamento alimentar, a secagem das superfícies após a desinfeção, entre outros aspetos.

- **Manchas e sabores nos alimentos** <sup>[8]</sup><sup>[18]</sup>

Também designados de “*taints and off-flavours*”, estes apresentam grandes problemas para a indústria alimentar. “*Taint*” são manchas que surgem através de sabores ou odores desagradáveis, como resultado da contaminação por algum agente químico, enquanto que um “*off-flavour*” cria um sabor ou odor desagradável devido à deterioração natural do alimento.

Os *taints* podem se formar quando resíduos de detergente ou desinfetante permanecem nas superfícies que irão entrar em contacto com o produto alimentar. Os *off-flavours*, são mais suscetíveis de se formarem quando a indústria utiliza desinfetantes à base de iodo, cloro ou oxigénio, pois estes podem reagir com os compostos que existem no alimento.

## **1.5. Testes para avaliar a eficácia das atividades de Limpeza e Desinfeção**

De forma a implementar um correto programa de higienização, é importante conhecer a natureza da sujidade que pretendemos remover, selecionar o método mais indicado para a remover, bem como o mais adequado para avaliar a eficácia deste processo. <sup>[8]</sup>

Para a higienização ser eficaz deve-se ter em conta que toda a sujidade e resíduos foram removidos, os materiais de limpeza ou desinfeção bem enxaguados e removidos, e verificar que de um ponto de vista microbiológico as superfícies estão num nível aceitável. <sup>[14]</sup>

### **1.5.1. Avaliação da presença de resíduos**

A presença de resíduos pode ser detetada pela realização de uma inspeção visual, no entanto, este método de avaliação por ser tão simples, é bastante vulgarizado pelas empresas. Devido à subjetividade que apresenta não é totalmente fiável, no entanto, falhas que possam ocorrer no processo de limpeza e desinfeção, como a presença de sujidade, podem ser facilmente identificadas, sem que comprometam a segurança alimentar. Na deteção de

superfícies ou equipamentos sujos, é possível às empresas identificarem áreas onde o plano de higienização apresenta falhas e medidas corretivas devem ser implementadas. A inspeção neste tipo de análise deve ser realizada por pessoas qualificadas, de forma a que erros e problemas que possam ser detetados sejam a tempo corrigidos, recorrendo ainda a análises microbiológicas para avaliar a eficácia da higienização, por apresentar resultados mais fiáveis. Outro recurso que pode ser utilizado nesta técnica é a luz ultravioleta, e conjuntos especiais de iluminação e fibra ótica. [5] [6] [14]

### **1.5.2. Avaliação microbiológica**

Recorre-se à utilização de várias técnicas de microbiologia com o objetivo de avaliar os níveis de contaminação presentes e a eficácia da higienização, sendo importante saber se estamos na presença de bolores, leveduras, microrganismos fecais ou outro tipo de organismos. [6] [10] Para tal, os métodos utilizados são:

#### **- Zaragatoa**

A recolha pela técnica da zaragatoa é a mais utilizada pela indústria alimentar. O procedimento é simples, e consiste em mergulhar a extremidade da zaragatoa num tubo com uma solução diluída estéril, retira-se e passa-se na superfície que se pretende analisar, de seguida coloca-se novamente a zaragatoa no meio, agitando de forma a que os microrganismos presentes passem para a solução. Posteriormente, para a contagem em placa dos microrganismos, retira-se a zaragatoa do líquido e esfrega-se a mesma no meio de cultura selecionado, o qual pode ser de crescimento ou seletivo, caso se pretenda determinar as espécies presentes.

Após colocação na estufa à temperatura e tempo adequado ao crescimento dos microrganismos, procede-se à contagem das unidades formadoras de colónias (UFC) por área (cm<sup>2</sup>) presentes nas placas. [5] [6] [8]

#### **- Placas de contacto**

Técnica que recorre à utilização de placas (RODAC – *Replicate Organism Direct Agar Contact*) com um meio de cultura selecionado. Económica, rápida e eficaz na verificação da eficácia dos procedimentos de higienização. O procedimento neste caso é simples e consiste em inverter a placa na superfície que se pretende analisar, pressionando tipo carimbo,

conseguindo desta forma transferir grande parte dos microrganismos presentes. Depois de incubadas a uma temperatura e tempo ótimos de crescimento procede-se à contagem das UFC's.

Apesar de esta técnica, bem como o método da zaragatoa, serem muito fiáveis, são mais lentas, o que não permite identificar os problemas a tempo de corrigi-los, como evitar possíveis contaminações e problemas alimentares. De forma a contornar estes problemas, outra técnica que se pode utilizar é a bioluminescência. <sup>[5][6][8][10]</sup>

#### - **ATP Bioluminescência**

O ATP bioluminescência apesar de ser uma técnica mais dispendiosa, tem vindo a obter uma grande aceitação por parte da indústria alimentar pois a obtenção dos resultados é quase imediata, ao contrário das técnicas anteriores. Consiste em detetar nas superfícies em análise a matéria orgânica, resíduos alimentares e microrganismos, através da presença de ATP (adenosina trifosfato) por meio de uma reação química com emissão de luz, quantificada através de um fotómetro.

Este método mede o ATP presente nas células vivas ou mortas (de plantas, bactérias, bolores, leveduras e animais), e é possível obter uma indicação da presença e nível de sujidade da superfície testada, revelando assim ser muito eficaz na verificação da eficácia da limpeza e higienização realizada. No entanto, caso uma superfície não se apresente suja esta técnica não é eficiente, pois não deteta valores baixos de bactérias (inferiores a  $10^3$  UFC/cm<sup>2</sup>), sendo assim importante recorrer-se aos métodos de análise microbiológica convencionais. <sup>[5][6][8][10][14][19]</sup>

## **1.6. Análises Microbiológicas**

As análises microbiológicas apresentam diferentes metodologias consoante o que se pretende analisar, os métodos aplicados diferem quando se trata de uma análise a um alimento ou a uma superfície, que tipo de microrganismos se pretende quantificar e o meio apropriado ao seu crescimento (bactérias, fungos, algas ou vírus).

### **1.6.1. Procedimentos de esterilização e assepsia**

O método de esterilização consiste em eliminar todos os microrganismos que se encontrem num determinado material, tanto à sua superfície como no seu interior. O modo de esterilizar materiais ou meios de cultura, depende da natureza dos materiais bem como do meio de trabalho. <sup>[47]</sup>

Em microbiologia assepsia designa-se como uma técnica que tem como objetivo trabalhar em ambiente ausente de microrganismos. <sup>[47]</sup>

- **Esterilização em autoclave**

A forma mais usual para esterilizar materiais e métodos de cultura é pela utilização da autoclave. As autoclaves laboratoriais funcionam normalmente a uma pressão de 1,02 bar e atingem temperaturas de 121°C, durante 15 minutos na maioria dos casos, podendo este variar consoante a relação superfície/volume dos materiais a esterilizar.

Para que este procedimento seja eficaz e seguro, deve-se seguir os seguintes passos: <sup>[47]</sup>

- Ligar a água até que esta sobreponha a resistência elétrica;
- As tampas dos frascos não devem estar muito apertadas, uma vez que devem permitir a troca de gases com o exterior;
- Introduzir o material e fechar a autoclave com os cuidados recomendados;
- Aguardar que a temperatura desejada seja atingida (121°C) e iniciar a contagem de 15-20 minutos para a esterilização do material;
- Desligar a autoclave e abrir com cuidado a torneira de saída de água;
- Aguardar que a pressão diminua até aos 0 bar;
- Abrir a autoclave e retirar os materiais esterilizados (é conveniente apertar bem os frascos).

- **Assepsia dos materiais laboratoriais**

Existem procedimentos e cuidados a ter para evitar a contaminação das culturas, do ambiente ou do produto que se estiver a analisar, tais como: <sup>[48]</sup>

- Garantir que antes de iniciar as análises, todo o material necessário se encontra próximo;
- Desinfetar e arrumar a bancada de trabalho, de forma a só ter presente o material necessário;
- Todo o trabalho deve ser executado à chama do bico de Bunsen;
- Os recipientes apenas devem ser abertos o mínimo tempo possível e uma vez abertos devem ser flamejados prontamente;
- Ter especial cuidado para que as extremidades das pipetas estéreis não toquem em superfícies não estéreis, como roupa, área de trabalho ou em qualquer outro material.

Após garantir que o local de trabalho está estéril para se executar as análises, deve-se garantir que a utilização e manipulação de pipetas, ansas, frascos e tubos de ensaio, são manuseados de forma cautelosa.

- Pipetas

As pipetas são utilizadas para transferir meios, culturas e soluções, como se trata de um material estéril, para evitar contaminações no momento do transporte, existem cuidados a ter, tais como: <sup>[48]</sup>

1. Remover a pipeta do invólucro de plástico pela extremidade, sempre junto à chama;
2. Colocar a pompete;
3. Retirar a quantidade de meio necessário, apertando a pompete;
4. Uma vez utilizada a pipeta, esta é descartada;
5. Coloca-se no involucro de plástico inicial e retira-se a pompete (de forma a evitar que o meio de cultura ali presente contamine a superfície de trabalho).

Deve-se ter em conta a quantidade de meio que se quer retirar, para se utilizar a pipeta indicada.

- Ansas

Como as ansas são materiais de consecutivas utilizações, devem ser bem esterilizadas na chama do bico de Bunsen, antes e após o seu manuseamento. Como explica na figura 2, devemos agarrar quase no topo da ansa, num ângulo quase vertical, aquecer até ficarem ao rubro, de forma a garantir que todos os esporos são eliminados. [48]

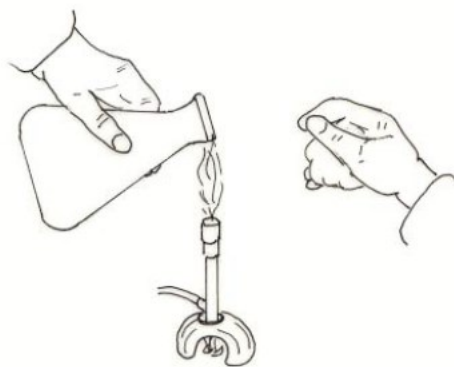


**Figura 2** – Esterilização de uma ansa à chama do bico de Bunsen. [48]

- Frascos e tubos de ensaios

Existem cuidados a ter no momento do manuseio de frascos e tubos de ensaio em condições de assepsia. Para se garantir que a cultura não é contaminada, deve-se proceder da seguinte forma, tal como demonstra a figura 3:

1. Desapertar ligeiramente a tampa dos balões ou dos tubos de ensaio, por forma a ser mais fácil de retirar num passo seguinte;
2. Segurar com uma mão o frasco ou tubo e com a outra retirar a tampa;
3. Flamejar na chama do bico de Bunsen o gargalo do tubo/frasco;
4. Com uma pipeta, colocar o meio de cultura em análise no frasco ou tubo;
5. Voltar a colocar novamente a tampa, apertando bem.



**Figura 3** - Esterilização do gargalo de um frasco à chama do bico de Bunsen. [48]

### **1.6.2. Métodos de cultura para contagem de microrganismos em placa [40] [48]**

A contagem em placas é o método mais utilizado em laboratórios de microbiologia para a contagem de microrganismos. Consiste na capacidade dos microrganismos crescerem na presença de meios de cultura apropriados e à temperatura ótima. Com tempos de inoculação de 24 a 48 horas, as colónias formam-se na placa de forma a ser visível ao olhar humano. O resultado, é expresso em UFC por unidade (área, volume, peso, etc.). [48]

Para a contagem dos UFC por placa, manuais de análise e legislações específicas em microbiologia alimentar, estipulam limites máximos e mínimos de contagem, em que normalmente o limite está compreendido entre 25 e 250 UFC, podendo existir noutros casos limites superiores ou inferiores a este. Estes limites são estabelecidos consoante a dificuldade para a contagem de placas com muitas colónias. [48]

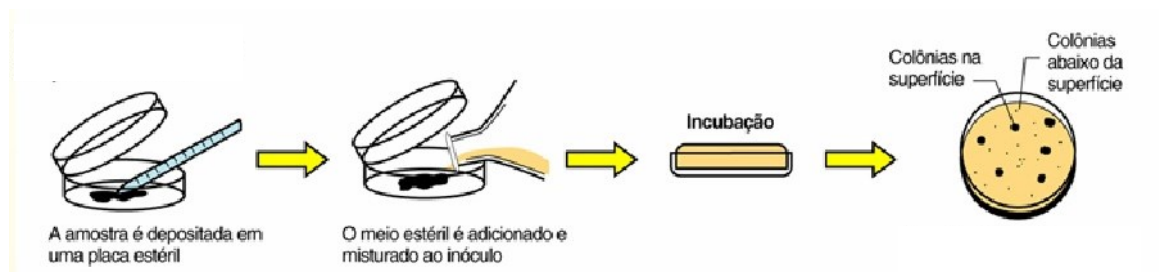
De forma a obter resultados mais significativos, cada inoculação de cada diluição é realizada em duplicado, ou seja, o resultado final é a média da contagem das duas placas.

As técnicas mais utilizadas em alimentos para isolamento de microrganismos são pela técnica do riscado, por incorporação e por espalhamento.

- **Técnica por incorporação**

Para uma contagem de microrganismos, é necessário proceder-se às diluições da amostra em análise, inicialmente prepara-se a diluição 1:10 e a partir desta é possível obter-se as diluições seguintes. Para tal, são pipetados 1 ml de amostra diluída para uma placa de Petri

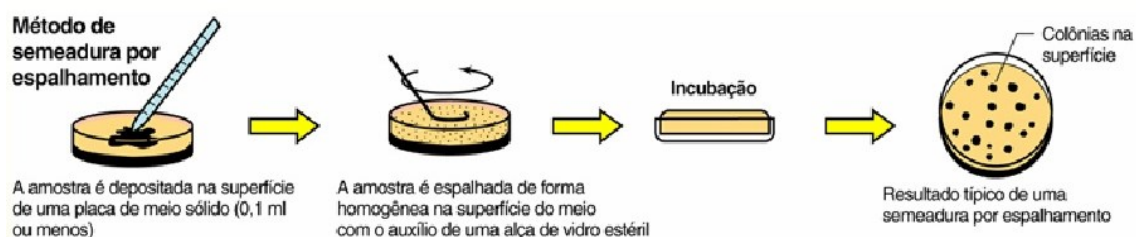
estéril e vazia, adicionando-se posteriormente o meio de cultura pretendido na forma líquida, como mostra a Figura 4. No caso de contagem total de bactérias o meio utilizado é o PCA (Plate Count Agar) e para bolores e leveduras o Rose Bengal. Para a homogeneização são realizados movimentos suaves em forma de “8” sobre a bancada. Após solidificar, as placas são incubadas a uma temperatura e tempo ideal ao crescimento microbiano. [46][47]



**Figura 4** – Método de cultura por incorporação. [46]

- **Técnica por espalhamento**

Nesta técnica, o passo inicial consiste em adicionar o meio de cultura agar numa placa de Petri esterilizada, deixar arrefecer e solidificar para posterior adição da amostra em análise. Esta amostra pode ser adicionada através do auxílio de uma ansa (Figura 5) ou no caso de uma análise em superfície utilizando uma zaragatoa. Após realizado o procedimento, as placas são incubadas a uma temperatura e tempo ótimos de crescimento. [46][47]

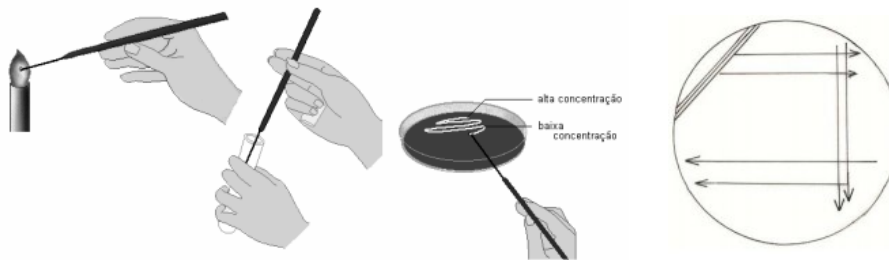


**Figura 5** – Método de cultura por espalhamento. [46]

- **Técnica do riscado**

Com uma ansa contendo o inóculo, a superfície da placa com o meio de cultura sólido é riscada cuidadosamente, como ilustrado na figura 6. Sempre que se muda de direção, a ansa deve ser esterilizada a fim de diluir o inóculo, garantindo o seu arrefecimento subsequente. O objetivo desta técnica é obter colônias bem individualizadas, a partir de uma suspensão de células concentradas, após incubação. [47]

As placas são colocadas em posição invertida, tal como nas anteriores técnicas, numa estufa a uma temperatura e tempo ideal para o crescimento das colónias.



**Figura 6** – Técnica do riscado para o isolamento de microrganismos. [47]

### 1.6.3. Meios de cultura para contagem de microrganismos

Os meios de cultura permitem isolar, crescer e manter os microrganismos em laboratório. Estes meios podem ser sólidos (agar), líquidos (sem agente solidificante, agar) e semi-sólidos (com agar, mas em quantidades insuficientes para solidificar). [45] Os meios de cultura sólida permitem a contagem de colónias de microrganismos, enquanto que meios líquidos o desenvolvimento de espécies presentes em populações mistas para estudos de crescimento e nutrição. [48] Os principais meios de cultura podem ser classificados como: meios de enriquecimento, de isolamento e diferenciais.

- **Meios de enriquecimento**

Meios maioritariamente líquidos que devido à sua composição nutricional em conjunto com as condições favoráveis permitem a multiplicação dos microrganismos mais exigentes. Podem ser classificados em meios de enriquecimento seletivo e não seletivo. Em que os primeiros consistem na multiplicação de microrganismos específicos e na inibição parcial ou total do crescimento de outros microrganismos, devido à presença de substâncias inibitórias ou pelas condições de supressão dos mesmos, enquanto que os não-seletivos favorecem o crescimento da grande maioria dos microrganismos. [40] [45]

- **Meios de isolamento**

Meios sólidos ou semi-sólidos que favorecem o crescimento microbiológico devido à formulação dos requisitos nutricionais para um determinado grupo de microrganismos.

Classificam-se em meios de isolamento seletivos e não seletivos. Meios não seletivos, não inibem seletivamente os microrganismos e os meios seletivos favorecem o crescimento de determinados microrganismos, inibindo outros. [40] [45]

- **Meios diferenciais**

Permitem testar características fisiológicas ou bioquímicas dos microrganismos pela presença de substâncias, como o pH. Como o nome indica permitem diferenciar microrganismos que crescem no mesmo meio, através da cor das colónias ou da região envolvente do meio de cultura. [40] [45] [47]

#### **1.6.4. Preparação e esterilização dos meios de cultura**

Os meios de cultura utilizados em laboratório podem ser líquidos ou sólidos, e a sua preparação requer certas regras, mesmo que seja um procedimento simples de executar: [47] [48]

- Todo o material de vidro utilizado deve ser bem lavado e enxaguado com água destilada, por forma a evitar a contaminação pela presença de detergentes ou outros resíduos químicos;
- Na pesagem dos meios de cultura, a espátula ou colher utilizada devem estar bem limpas;
- Adicionar à água previamente pesada, a quantidade indicada no rótulo de meio, dissolvendo na sua totalidade;
- Apenas se devem preparar os meios de cultura se forem no momento esterilizados;
- Os frascos que contém o material a autoclavar não deve exceder mais de metade da sua capacidade;
- As tampas não devem estar totalmente apertadas durante a esterilização na autoclave.

## 1.7. Legislação relativa à higienização na indústria alimentar

Os agentes químicos destinados à limpeza e desinfecção na indústria alimentar, não apresentam nenhuma regulamentação específica, tendo unicamente de obedecer a normas gerais relativas a biocidas e detergentes. No entanto, todos os produtos químicos que tenham na sua composição biocidas devem ser registados na Direção Geral de Saúde (DGS).<sup>[8]</sup>

Considera-se um produto biocida uma substância ou mistura que contenha uma ou mais substâncias ativas, com o objetivo de destruir ou controlar um organismo prejudicial por meios biológicos ou químicos. São classificados em 22 tipos, agrupados em quatro grupos principais, tais como, desinfetantes, conservantes, produtos de controlo de animais prejudiciais (pesticidas) e outros produtos biocidas.<sup>[20][21]</sup>

Em relação aos pesticidas, surge inicialmente a Portaria nº 17980 de 30 de setembro de 1960, que estabelece normas relativamente à importação, fabrico e comércio de pesticidas e produtos correlativos, como forma de assegurar a saúde pública e oferecer garantias de confiança ao consumidor, ao abrigo dos artigos 25º e 26º do Decreto-Lei nº 30270, de 12 de janeiro de 1940.<sup>[22]</sup>

A Diretiva nº98/8/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de fevereiro de 1998, relativamente à colocação no mercado de produtos biocidas, foi substituída na íntegra em 1 de setembro de 2013 com a entrada em vigor do Regulamento (UE) nº528/2012. De forma a assegurar a execução e garantia do referido regulamento, na ordem judicial interna surge o Decreto-Lei nº 140/2017, de 10 de novembro de 2017.<sup>[23][24][25]</sup>

A 9 de março de 1988, através da Portaria 149/88 são estabelecidas regras de asseio e higiene na manipulação de alimentos, com o intuito de impedir a manipulação por pessoas portadoras de doenças, existindo regras de higienização na preparação, embalagem e venda de produtos alimentares, com a anulação do boletim de sanidade.<sup>[26]</sup>

De forma a que os operadores do setor alimentar cumpram as regras de higiene dos géneros alimentícios, baseado nos princípios do HACCP e das regras de boas práticas de higiene, é promulgado o Regulamento (CE) nº852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, garantindo a segurança dos alimentos ao longo da cadeia, respeitando os critérios microbiológicos, a manutenção da cadeia de frio e critérios de

temperatura, bem como a recolha e análise de amostras, como descrito no Artigo 1º do Capítulo I. [2]

## 2. Apresentação do local de estágio

O estágio curricular decorreu na Imperial – Produtos Alimentares, S.A., situada em Azurara, Vila do Conde, no período de 12 de fevereiro de 2018 a 1 de junho de 2018.

A Imperial foi fundada em 1932, mas a sua origem remonta aos anos 20. Em 1973 é adquirida pelo grupo RAR e em 2015 vendido a um fundo privado. <sup>[27]</sup>

Considerada o maior produtor nacional de chocolates, e detentora de marcas de renome como Regina, Jubileu, Pintarolas, Pantagruel e Allegro, tem vindo ao longo dos anos a apresentar um bom desempenho no mercado português dos chocolates com um aumento na capacidade produtiva e resultados alcançados. Destacando-se a liderança da marca Regina no que diz respeito a Frutos secos cobertos com chocolate e uma posição também de destaque para a marca Jubileu. <sup>[28]</sup>

Jubileu é uma marca *premium* que privilegia a inovação e o uso de ingredientes de requinte para os seus consumidores mais exigentes. Regina, marca mais reconhecida e popular a nível nacional, fundada em 1928 acolhe afeto ao longo de gerações. A marca Pintarolas reconhecida pelas suas pastilhas de chocolate coloridas, trouxe reputação a nível Europeu no segmento infantil. Pantagruel marca conceituada a nível do chocolate para culinária, considerado de grande qualidade, sabor intenso a cacau, permitindo uma confeção de deliciosas sobremesas. Para amantes de caramelos cobertos com chocolate, a Imperial tem no seu portfólio a marca Allegro. <sup>[29] [30] [31] [32] [33]</sup>

A empresa tem vindo a crescer e consolidar a sua posição no mercado internacional, através da comercialização das suas marcas em variados mercados em mais de 45 países, distribuídos pelos continentes Europeu, Americano, Africano e Asiático.

Além das marcas Imperial, e do modelo de negócio B2C (*Business to Commerce*) a empresa possibilita aos seus clientes a subcontratação do desenvolvimento e produção dos seus produtos através das suas marcas próprias.

De forma a abranger um maior número de consumidores, houve uma adaptação de produtos com requisitos muito específicos para os diferentes segmentos do mercado, tais como chocolates sem açúcar, Kosher, Halal. <sup>[28]</sup>

Tendo como estratégia a melhoria contínua e a excelência dos Sistemas de Segurança Alimentar, estão presentes diversas certificações como IFS (International Food Standard).<sup>[34]</sup>

## **2.1. Departamento de Controlo de Qualidade Alimentar**

O departamento de qualidade tem como objetivo garantir que sejam cumpridas as políticas impostas pela empresa, ou seja, adaptar e implementar as exigências do Sistema de Gestão da Qualidade.

É responsável pelo produto final que chega ao consumidor, pois deve verificar se este segue os parâmetros estabelecidos antes de ser expedido para o mercado.

O departamento de qualidade tem diversas funções a seu cargo, entre as quais realizar auditorias, executar e impulsionar políticas de qualidade com o intuito de melhoria contínua e garantir que os trabalhadores são aptos e capazes para que um sistema de gestão da qualidade seja implementado, seguindo os parâmetros da norma ISO 9001:2015.

Portanto garantir que uma empresa tenha um bom sistema de qualidade é a chave para criar processos de otimização, permitindo aumentar a competitividade com a garantia que o produto vendido deve ser de elevada qualidade, com o risco mínimo de problemas e sem perdas. Fidelizar o cliente é o principal objetivo.<sup>[35]</sup>

## **2.2. Outras atividades desenvolvidas ao longo do estágio**

No âmbito do estágio curricular, foi proposto para além do tema dado inicialmente, ajudar no departamento de qualidade da empresa nas tarefas que fossem necessárias, tais como:

- Análises microbiológicas e físico-químicas a matérias-primas e produto acabado;
- Verificação do lote e validade do produto acabado antes da expedição;
- Contacto com fornecedores de matérias-primas, para a obtenção de documentação, como fichas técnicas, certificados e análises que comprovem a conformidade do produto;
- Recolha e análise da conformidade na receção de matérias-primas e materiais de embalagem;
- Leitura e validação de rótulos de embalagens.

### **3. Procedimento Experimental**

#### **3.1. Materiais e métodos utilizados**

Para a recolha de amostras para análise em laboratório, utilizou-se zaragatoas com meio estéril, tubos de ensaios e placas de Petri. O método utilizado foi através do esfregaço das zaragatoas numa área superficial previamente definida de 25 cm<sup>2</sup>. Para a contagem de microrganismos totais o meio utilizado foi o PCA (Plate Count Agar) e para a pesquisa de coliformes totais, o meio Caldo Verde Bile Brillhante.

#### **3.2. Locais de recolha**

Ao longo do estágio curricular, com o intuito de verificar a eficácia de diferentes detergentes e desinfetantes apropriados à indústria alimentar, para mãos, superfícies e utensílios, procedeu-se à análise através de zaragatoas em locais nas três unidades fabris da empresa, bem como a vários colaboradores de diferentes setores, com especial interesse os que estão em contacto direto com o produto. Selecionou-se as superfícies mais suscetíveis de contaminação, tendo por base o *design* do equipamento, natureza das incrustações e presença de pontos mortos na limpeza.

#### **3.3. Plano de amostragem**

Para garantir que os testes em análise cumprem o desempenho pretendido na higienização de mãos e superfícies numa situação real, recorreu-se inicialmente à utilização de peças de equipamentos inutilizadas até à obtenção dos resultados microbiológicos, de forma a garantir que os cuidados e os resultados obtidos eram os mais favoráveis possíveis e não prejudiciais para a produção.

Dividiu-se assim em duas etapas, a primeira referente à avaliação da higienização das mãos e a segunda avaliação em superfícies. Na primeira situação, dividiu-se a análise em três ações, a inicial - antes da limpeza e desinfeção, segunda - após limpeza com detergente e por fim após desinfeção com diferentes desinfetantes de forma a verificar qual o desinfetante mais eficaz. A recolha de amostras em superfícies e utensílios teve por base duas etapas, antes e após a aplicação do detergente desinfetante em estudo e posteriormente em equipamentos

com pontos de difícil acesso, tendo especial cuidado por se tratar de uma limpeza e desinfecção realizada manualmente.

Após verificação, validação e monitorização, a empresa, segundo o seu plano de higienização, deve manter este controlo microbiológico com periodicidade normal de quinze dias.

### **3.4. Preparação de meios de cultura**

Todos os meios após dissolução e armazenamento nos respetivos frascos e tubos, são esterilizados numa autoclave, a uma temperatura de 121°C por 15 minutos.

- **Meio Plate Count Agar (PCA)**

Meio recomendado para a determinação e contagem em placa de microrganismos totais a 30°C em alimentos, água, águas residuais e amostras clínicas. Contém triptona, glucose e extrato de levedura, e os seus nutrientes servem de fonte de energia promovendo o crescimento de um alargado número de bactérias. <sup>[1][36]</sup>

O meio PCA por 1 litro tem a seguinte composição: <sup>[36]</sup>

- Triptona ----- 5 g
- Extrato de levedura ----- 2,5 g
- Dextrose (Glucose) ----- 1 g
- Agar ----- 15 g

Para a preparação do meio, procedeu-se à pesagem de 23,5 g de PCA em 1000 mL de água destilada, aquecendo-se até à ebulição para a dissolução total do meio. Após esterilização, antes da utilização o meio deve arrefecer até uma temperatura de aproximadamente 40-45°C.

- **Caldo Bilis Verde Brillante**

Para a deteção de coliformes em alimentos, água e produtos lácteos, o meio utilizado é o caldo verde bile brilhante. A sua composição contém digestão enzimática de gelatina, uma fonte de carbono e azoto que são utilizados para o crescimento dos organismos no caldo, o verde brilhante e a bile bovina inibem as bactérias gram-positivas e as bactérias gram-

negativas que não pertencem ao grupo dos coliformes. A lactose é uma fonte de carboidrato. As bactérias que fermentem a lactose e produzam gases são detetadas. <sup>[1][37]</sup>

O caldo Verde Brilhante por 1 litro tem a seguinte composição: <sup>[37]</sup>

- Bile Bovina ----- 20 g
- Digestão Enzimática de Gelatina ----- 10 g
- Lactose ----- 10 g
- Verde Brilhante ----- 0,0133 g

O modo de preparação deste caldo consiste em dissolver 40 g do meio em 1000 mL de água destilada, agitando até que este se dissolva totalmente, aquecendo se necessário de forma a ajudar. Após a homogeneidade do meio este é distribuído pelos tubos de ensaio preparados com um tubo de Durham no seu interior. Após esterilização, procede-se à inoculação e incubação, em que a presença de coliformes é confirmada pela formação de gás nos tubos de Durham. Esta pesquisa é importante e essencial uma vez que a presença deste tipo de contaminação é um excelente indicador de contaminação fecal e de má higienização.

### **3.5. Recolha de amostras**

Como os processos de limpeza e desinfeção são realizados separadamente, há a necessidade de avaliar a eficácia de cada processo, uma vez que sem a limpeza, a desinfeção não é eficaz na presença de resíduos. Existem alguns métodos de análise diretos para avaliar a higienização de mãos e superfícies, como por exemplo, o esfregaço através de zaragatoas ou a utilização de placas de contacto direto com o meio de cultura adequado. No caso das mãos dos manipuladores é possível através da inserção direta das mesmas no meio de cultura.

O método mais utilizado por investigadores na área da microbiologia para a verificação da eficácia dos processos de limpeza e desinfeção, é através da utilização de um kit estéril constituído por uma zaragatoa e um tubo com meio neutralizante. O meio serve para manter a viabilidade das bactérias entéricas patogénicas durante o transporte desde a recolha à análise em laboratório. <sup>[38]</sup>

O procedimento consiste em retirar do invólucro estéril a zaragatoa, podendo esta ser mergulhada na solução ou utilizada seca. Posteriormente coloca-se a zaragatoa em contacto com a superfície que se pretende analisar numa área de aproximadamente 25 cm<sup>2</sup>, através de

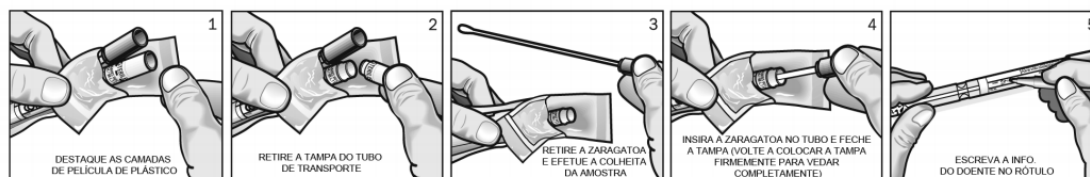
movimentos rotativos, de forma a garantir que toda a ponta entrou em contacto com a superfície. Depois de recolher a amostra, coloca-se a zaragatoa no tubo, fechando de seguida para garantir que a solução não seja vertida, como demonstra na Figura 7. O tubo utilizado nas análises contém um gel agar-agar *Amies*, meio muito utilizado para microrganismos aeróbios e anaeróbios, pois contém agentes desintoxicantes que absorvem e neutralizam o oxigénio, superóxido e radicais livres, permitindo interromper a oxidação e assegurar um ótimo desempenho para as bactérias, fornecendo uma elevada proteção às bactérias que possam estar presentes na amostra em estudo. [8] [39]

As amostras devem ser sempre identificadas antes ou logo após a recolha, procedendo-se à análise microbiológica no espaço de 24 horas e durante esse tempo transportadas numa caixa térmica, sem nunca serem congeladas ou mantidas em contacto com o gelo. [38]

Para verificar a solidez e veracidade dos resultados obtidos do desempenho dos processos de limpeza e desinfeção aplicados, procedeu-se a várias recolhas e análises, como demonstrado no ponto “Resultados”.

A técnica de contacto direto, atualmente já é muito utilizada pois permite que os microrganismos adiram diretamente nos meios de cultura presente nas placas de contacto.

### **SISTEMA DE TRANSPORTE COM ZARAGATOA DE CULTURA GUIA DE UTILIZAÇÃO DA ZARAGATOA**



**Figura 7** – Guia de utilização de uma zaragatoa. [38]

#### **3.5.1. Mãos**

Para alcançar os objetivos propostos procedeu-se à realização de vários testes com diferentes desinfetantes a colaboradores de cada setor. Para além das análises microbiológicas realizadas, analisou-se as fichas técnicas dos desinfetantes juntamente com uma análise sensorial através da primeira impressão quando o produto entra em contacto com as mãos, como demonstra a tabela 4. Dois dos quatro desinfetantes não foram analisados

microbiologicamente uma vez que a empresa excluiu por não serem apropriados à indústria por apresentar odores. Na recolha, tal como referido, teve-se em conta três parâmetros: análise antes da higienização, após a limpeza e após a desinfeção, com recurso a métodos de análise diretos tal como a zaragatoa para a pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbios e coliformes.

**Tabela 4** – Descrição dos desinfetantes para mãos em estudo.

	<b>Desinfetante A</b>	<b>Desinfetante B</b>	<b>Desinfetante C</b>	<b>Desinfetante D</b>
<b>Descrição</b>	Gel alcoólico para a desinfeção das mãos	Gel com álcool para desinfeção das mãos por fricção	Gel hidroalcoólico antiséptico para a pele	Gel desinfetante das mãos
<b>Odor</b>	Ligeiramente perfumado	Alcoolizado	Alcoolizado	Perfumado
<b>Após aplicação</b>	Mãos secas	Mãos secas	Mãos gordurosas	Mãos secas ligeiramente perfumadas
<b>Testes Microbiológicos e Análise Sensorial</b>	Satisfatórios, redução em 100 % em relação à ação inicial antes da limpeza e desinfeção	Satisfatórios, redução em 100 % em relação à ação inicial antes da limpeza e desinfeção	Sem resultados, uma vez que as mãos ficam gordurosas após aplicação. Não adequado para a indústria alimentar.	Sem resultados, visto apresentar perfume e não ser adequado para a indústria alimentar.

### 3.5.2. Equipamentos e superfícies

Com o intuito de obter o objetivo inicialmente proposto, analisou-se diferentes detergentes desinfetantes para pesquisa de coliformes e contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, antes da higienização e após a mesma. Retirou-se peças de vários equipamentos de produção e mergulhou-se num tanque de lavagem com água e a solução em análise, segundo a diluição e o tempo de contacto indicados pelos fornecedores. Neste tipo de setor procurou-se formulações com pouca espuma, de forma a facilitar a remoção e evitar gastos excessivos com água. Para a lavagem, a solução pretendida é diluída e com recurso a escovas devidamente higienizadas, procede-se à lavagem. O método de recolha utilizado foi o mesmo, com recurso ao esfregaço, pela utilização de zaragatoas. A tabela 5 descreve a análise inicial realizada aos detergentes desinfetantes antes da avaliação microbiológica.

**Tabela 5** – Descrição dos detergentes desinfetantes para superfícies em estudo.

	<b>Detergente Industrial 1</b>	<b>Detergente Desinfetante Clorado 2</b>	<b>Detergente Desinfetante Clorado 3</b>	<b>Detergente Desinfetante Clorado 4</b>
<b>Descrição</b>	Detergente líquido concentrado Rico em tensoativos, com espuma abundante e persistente e bom poder desengordurante Muito bem tolerado pela pele	Detergente desinfetante clorado	Detergente e desinfetante clorado Elevado poder bactericida e fungicida Ótimo poder de limpeza e desengorduramento, mesmo a baixas concentrações	Desinfetante detergente alcalino clorado
<b>Componentes</b>	Hidróxido de sódio Ácido benzenosulfônico	Hipoclorito de sódio Hidróxido de sódio	Hipoclorito de sódio Hidróxido de sódio	Hipoclorito de sódio Hidróxido de potássio
<b>Condições de utilização</b>	Usar uma concentração de 0,5% a 1% de água tépida	Diluir 1 a 2% de produto por cada litro de água Atividade bacteriana: diluição de 1%, com 5 minutos de tempo de contacto Atividade fungicida: diluição de 1%, com 5 minutos de tempo de contacto	Diluição a uma concentração de 2 a 5 %. Após limpeza, enxaguar abundantemente com água fria. Tempo de tratamento de 10 a 30 minutos	Atividade bactericida: diluição de 2 % com tempo de contacto 5 minutos Atividade fungicida: 3 % com tempo de contacto 15 minutos Enxaguamento abundante com água no final

### 3.6. Análises microbiológicas

A metodologia utilizada para a pesquisa e contagem de microrganismos envolvidos na contaminação dos alimentos é a técnica de amostragem através de zaragatoa. O procedimento já anteriormente explicado, permite fazer uma análise direta através do crescimento de colónias viáveis no meio de cultura presente na placa de Petri através da inoculação, como demonstra a Figura 8 e pela deteção de coliformes totais através da utilização de outro meio seletivo, como apresentado na Figura 9. [41][42]

Numa primeira fase, os microrganismos presentes na zaragatoa são transferidos para a placa de Petri, que contém meio PCA, meio utilizado para a contagem total de mesófilos aeróbios. As placas são posteriormente incubadas durante 72 horas a  $30\pm 1^\circ\text{C}$ . Os resultados são considerados aceitáveis caso numa superfície de  $25\text{ cm}^2$ , o número de colónias for inferior a 10 UFC por  $\text{cm}^2$ .

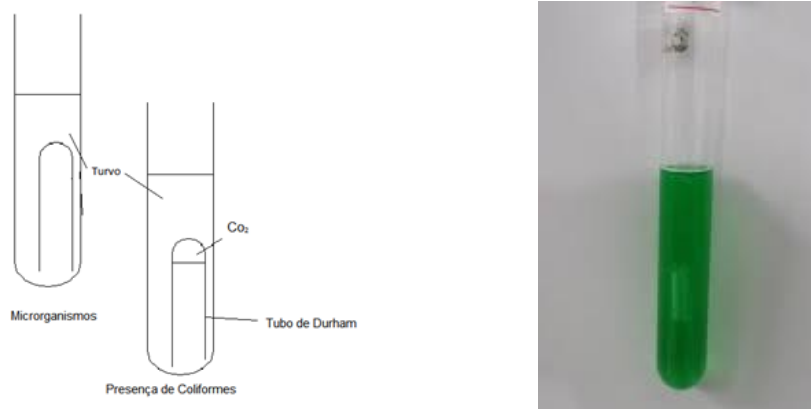
Para a pesquisa de coliformes totais, a zaragatoa que contém os microrganismos recolhidos para análise é colocada dentro de um tubo de ensaio, com um tubo de Durham e 9 mL de Caldo Verde Brilhante. Neste caso, ao contrário do procedimento anterior, não se obtém uma contagem em unidades formadoras de colónias, apenas é verificada a presença ou ausência destes microrganismos. No grupo dos coliformes, incluem bacilos aeróbios e anaeróbios facultativos, gram-negativas, inibindo as gram-positivas e as bactérias gram-negativas que não sejam coliformes. Os tubos de ensaio são incubados a  $30\pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas. [37]

Os resultados são positivos se se formar gás com uma altura de 1/10 do tamanho do tubo de Durham, como mostra a Figura 9.

Caso se verifique resultados positivos, o passo seguinte consiste na verificação da presença de coliformes fecais, em que nomeadamente é executado o procedimento de pesquisa de *E.coli*.



**Figura 8** – Procedimento de inoculação da amostra através de zaragatoas em placas de Petri com solução de agar. [41][43]



**Figura 9** – Detecção da presença de coliformes totais em caldo verde brilhante, através da turvação e da formação de gás nos tubos de Durham. [42]

### 3.7. Tratamento dos dados estatísticos

Os resultados obtidos para mãos e superfícies nos diferentes parâmetros – antes e após limpeza e desinfecção - foram tratados estatisticamente através do recurso ao programa Microsoft Office Excel, pela aplicação do teste paramétrico *t-student* assumindo variâncias iguais. Em todos os testes realizados assumiu-se um nível de significância de 5 % de rejeição da hipótese nula.

## 4. Resultados e Discussão

- **Análise microbiológica às mãos dos colaboradores**

Para a análise comparativa dos resultados obtidos, apenas dois dos quatro desinfetantes rececionados foram avaliados microbiologicamente, sendo esses valores apresentados e analisados de seguida. O facto de apresentarem aromas após utilização, foram fatores de exclusão como descrito na tabela 4.

Como referido no procedimento experimental, esta análise avaliou a eficácia de dois desinfetantes em três momentos. Para melhor perceção e discriminação dos resultados, esta análise dividiu-se em duas etapas, a eficácia da limpeza, com um detergente já utilizado pela empresa e a importância da aplicação do desinfetante após lavagem para verificação e análise do melhor para posterior seleção. Neste estudo, contou-se com a participação de 20 colaboradores de diferentes setores.

- **Eficácia da Limpeza**

Através dos resultados obtidos verificou-se que os valores em termos de contagem de microrganismos aeróbios, antes da limpeza, variavam entre 1,15 e 2,4  $\log$  UFC/cm<sup>2</sup> e após a mesma observou-se uma redução para valores entre os 0 e 1,48  $\log$  UFC/cm<sup>2</sup>. Esta variação pode dever-se à lavagem não tão bem realizada por alguns colaboradores, ou pelo toque após lavagem em superfícies, rosto ou roupa. Com o intuito de confirmar que estas reduções são significativas e o detergente utilizado é verdadeiramente eficaz, analisou-se os resultados através da análise estatística. Assumiu-se que a hipótese nula é a igualdade entre antes e depois da limpeza e a hipótese 1 a diminuição ou aumento da contagem bacteriana.

Inicialmente verificou-se se os dados obtidos seguiam distribuição normal, recorrendo ao valor de *p-value* (*p*) que representa o erro que tinha de cometer para verificar que existem diferenças entre as amostras. Assumiu-se assim um erro de 5 %, ou seja, existe a probabilidade de rejeitar a igualdade entre as duas ações se *p* for inferior a 0,05. Uma vez que o número de dados é inferior a 50, o teste utilizado foi de Shapiro-Wilk.

Como o valor obtido de *p-value* (*p*) foi de 0,94, ou seja, superior a 0,05, pode-se afirmar que os dados seguem distribuição normal. Numa fase seguinte recorreu-se a um teste

paramétrico *t-student* para amostras emparelhadas, pois pretendemos fazer a análise à mesma pessoa em duas ocasiões. Os dados encontram-se descritos na tabela 6.

**Tabela 6** – Teste T para a média do número de colónias em duas amostras emparelhadas antes e após lavagem das mãos.

Ação realizada	Média (n=20)	$p(T \leq t)$ uni-caudal	Stat t	t crítico uni-caudal
Antes da Limpeza	1,85	0,01	3,15	2,01
Após a Limpeza	0,69			

O valor obtido pelos dados estatísticos para *p-value* foi de 0,01, isto é, como este resultado é inferior a 0,05, podemos afirmar que existem diferenças significativas nos valores de contaminação microbiana antes e após o procedimento de limpeza.

Outro método possível de utilizar e se obter as mesmas conclusões é pelo valor estatístico do teste t (*stat t*) e o valor crítico que delimita a zona de aceitação da zona de rejeição (*t-crítico*). Como o *stat t* é superior ao *t crítico*, uma vez que o valor delimitante do gráfico é 2,01, pode-se afirmar mais uma vez que a lavagem das mãos é essencial para a diminuição da carga microbiana.

#### ○ Eficácia da desinfeção

Após verificada a importância da limpeza das mãos na indústria alimentar para a redução microbiana, o passo seguinte consistiu em analisar se a utilização de um desinfetante após lavagem é essencial para a eliminação completa de microrganismos. Para tal, recorreu-se aos mesmos testes de análises estatísticos, *t-student* para amostras emparelhadas. Os valores obtidos inicialmente, antes de desinfetar, variavam entre os 0 e 1,48 log UFC/cm<sup>2</sup> e após a utilização dos desinfetantes as placas não apresentaram qualquer unidade formadora de colónias. Através da observação destes valores é possível constatar que a carga microbiana é totalmente reduzida apenas após desinfeção, no entanto, pretendeu-se verificar se estatisticamente existem diferenças entre estas duas ações e se é realmente importante a aplicação deste passo na empresa.

Pela observação dos resultados estatísticos obtidos (Tabela 7), verificou-se que tal como após a limpeza, o valor de *p* obtido era inferior a 0,05, ou seja, podemos assumir que existem

diferenças significativas para se afirmar que a desinfecção após a limpeza das mãos é essencial para a garantia da eliminação total da carga microbiana e segurança do produto que irá ser manipulado posteriormente.

**Tabela 7** – Teste T para a média do número de colónias em duas amostras emparelhadas antes e após a desinfecção.

<b>Ação realizada</b>	<b>Média (n=20)</b>	<b><math>p(T \leq t)</math> uni-caudal</b>	<b>Stat t</b>	<b>t crítico uni-caudal</b>
<b>Após Limpeza</b>	0,69	0,01	3,28	2,02
<b>Após Desinfecção</b>	0			

Como esta análise foi referente à desinfecção no geral, e não de nenhum desinfetante em específico, analisou-se de seguida a eficácia que cada um, de forma a determinar o melhor e pelo qual a empresa deveria optar.

#### ○ **Comparação entre os 2 desinfetantes**

Após se verificar a importância da desinfecção, foi necessário proceder-se à escolha do desinfetante mais adequado à indústria, como tal, o primeiro critério deveu-se à eficácia da eliminação microbiana, em que ambos foram 100 % eficientes. Após esta análise confirmou-se através de análise estatística se realmente eles são iguais ou diferentes em termos de eficácia. Neste caso, o teste utilizado foi o teste *t-student* para amostras independentes com variâncias iguais. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 8.

**Tabela 8** – Teste T para o número de colónias em duas amostras independentes com variâncias iguais.

<b>Ação realizada</b>	<b>Média (n=20)</b>	<b><math>p(T \leq t)</math> uni-caudal</b>	<b>Stat t</b>	<b>t crítico uni-caudal</b>
<b>Desinfetante A</b>	0,28	0,41	- 0,27	2,92
<b>Desinfetante B</b>	0,41			

Como o valor de  $p$  é superior a 0,05, concluímos que não existem diferenças significativas se optarmos pela utilização do desinfetante A ou B.

Confirmado através da análise estatística a opção de escolher um ou outro desinfetante, em termos de redução de carga microbiana, é muito semelhante, a escolha passou por outros

critérios, tal como inicialmente foi feito para a escolha de apenas dois desinfetantes para análise microbiológica. Como referido na tabela 4 (análise dos desinfetantes), o desinfetante A (ficha técnica Anexo I) apresenta um odor perfumado, mesmo que este desapareça após aplicação, como tal nesta indústria não é aconselhado. Sendo assim, uma vez que ambos apresentam eficácia na eliminação total dos microrganismos e a empresa tinha que optar apenas por um desinfetante, esta condicionante do odor perfumado foi um fator de exclusão, optando-se assim pelo desinfetante B (ficha técnica Anexo II), uma vez que apenas apresenta um odor a álcool, que não permanece nas mãos após utilização.

- **Coliformes**

Para além da contagem microbiológica, neste estudo, procurou-se detetar a presença ou ausência de coliformes totais nas mãos. Nesta fase, como o procedimento não é por placas como já referido, os critérios para confirmar a presença ou ausência de coliformes é através de uma bolha de ar de 1/10 do tamanho do tubo de Durham. Caso se verifiquem resultados positivos na pesquisa de coliformes totais, é efetuada uma pesquisa de coliformes fecais e *E.coli*.

Após as análises realizadas e observados os resultados, verificou-se que apenas com a lavagem das mãos é possível remover os coliformes presentes das mãos, no entanto, a carga microbiana reduz, mas não na sua totalidade. Sendo este um bom indicador de limpeza, o auxílio do desinfetante, é crucial uma vez que elimina todos os microrganismos, garantindo maior confiança na obtenção de um produto final seguro.

- **Análise microbiológica a equipamento e superfícies**

Garantir a limpeza das mãos dos colaboradores é tão importante como verificar que os equipamentos e superfícies de trabalho estão bem higienizados, para tal procedeu-se a uma pesquisa e avaliação do mercado nacional para seleccionar o ideal para as condições de trabalho da empresa.

Selecionou-se três detergentes desinfetantes clorados de marcas diferentes, ao qual se entrou em contacto com os respetivos fornecedores para obter fichas técnicas, fichas de segurança e amostras para serem testadas em contexto real. A empresa já utilizava um detergente industrial, não ligado especificamente à indústria alimentar, no entanto, apresenta uma vantagem em relação aos outros pois é bem tolerado pela pele, sendo também testado.

- **Detergente Industrial 1**

Como se tratava de um detergente utilizado pela empresa, foi testado inicialmente para avaliar se a sua utilização tem sido efetuada de forma correta para a obtenção dos melhores resultados. Para tal, após análise da ficha técnica (Anexo III) verificou-se que a dosagem mínima recomendada é de 0,5 % e a máxima de 1%, procedendo-se assim aos testes de avaliação de eficácia, da menor para a maior dosagem. Neste caso como o tempo de contacto não vem discriminado na ficha técnica, o tempo que a empresa estabeleceu inicialmente foi de 10 minutos, com a possibilidade de se alterar consoante os resultados microbiológicos obtidos.

Comparando os resultados obtidos, inicialmente para uma concentração de 0,5 % com um tempo de contacto de 10 minutos, a contaminação microbiológica variou entre 2,60 e 0,98 UCF/cm<sup>2</sup> e após a limpeza com este detergente variou entre 0,30 e 0 UFC/cm<sup>2</sup>. Para o mesmo tempo de contacto e uma dosagem de 1 % os valores iniciais de contagem de UFC/cm<sup>2</sup> foram de 2,02 e 0,69 e após a limpeza entre 0 e 0,08, respetivamente.

Analisando estes resultados, numa primeira observação verificou-se que ambas as concentrações do Detergente Industrial eram eficientes ao ponto de reduzir a carga microbiana em termos percentuais acima dos 92 % e 98 % para a dosagem de 0,5 % e 1 % respetivamente. Como na indústria alimentar o objetivo é a redução total dos microrganismos,

a empresa optou pela aplicação e realização de mais testes para 1 %, verificando-se bons resultados e a possível continuidade deste detergente na empresa.

#### ○ **Detergente Desinfetante Clorado 2**

Após pesquisa e seleção, e uma vez que a empresa pretendia utilizar um detergente com capacidades desinfetantes, selecionou-se três e avaliou-se os seus poderes bactericidas e fungicidas.

Como referido na ficha técnica (Anexo IV) e na tabela 5, o detergente desinfetante clorado é ideal para a indústria alimentar e para processos de limpeza e desinfeção. Procedeu-se à diluição de 1 %, com 5 minutos de tempo de contacto com o material e os resultados obtidos foram bastante favoráveis. Inicialmente a contaminação microbiológica variava entre 1,60 e 0,70 UFC/cm<sup>2</sup> e após a aplicação da limpeza e desinfeção estavam compreendidos entre 0,30 e 0 UFC/cm<sup>2</sup>. Tal como no primeiro detergente, estes resultados são satisfatórios e apresentam uma taxa de redução da carga microbiana na ordem dos 98 %.

#### ○ **Detergente Desinfetante Clorado 3 e 4**

O detergente desinfetante clorado 3 foi testado apenas para uma percentagem de 2 % de diluição, uma vez, que segundo a sua ficha técnica (Anexo V) a mesma pode ser utilizada entre os 2 % e os 5 %, dependendo da sujidade a eliminar. Os resultados obtidos não foram favoráveis obtendo-se uma redução da carga microbiana de 67 %. Não foram realizadas análises para diluições superiores, uma vez que ia exigir da empresa uma maior despesa em termos de solução, por despender de uma maior dosagem. Em termos de custos, estes iam ser mais avultados, uma vez que foi analisado o custo por litro que cada um iria ter, representando este o mais caro dos 4 detergentes em estudo.

Após exclusão do terceiro detergente, analisou-se um último, apesar de ter um fator de diluição de 2 %, o tempo de contacto era inferior e ligeiramente mais barato (Anexo VI). Contudo, os resultados obtidos foram mais favoráveis que o anterior, mas não o suficiente para serem realizados mais testes microbiológicos, pois a redução foi de 79 %.

Após observação e conclusão dos resultados obtidos, a empresa optou por não incluir estes dois detergentes desinfetantes clorados no estudo, uma vez que os resultados por eles apresentados não satisfaziam a política de limpeza e segurança da empresa. Como supracitado acima, o poder de limpeza e desinfecção é o fator mais importante e estes não reuniram as características necessárias para serem aplicados. Além dos resultados microbiológicos, a concentração necessária, o tempo de contacto e o preço eram dos quatro os mais elevados, logo iriam representar um gasto maior.

- **Coliformes**

Tal como para as mãos, a amostra é recolhida tanto para a contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios (em UFC/cm<sup>2</sup>) como para a pesquisa de coliformes presentes nas superfícies e utensílios de trabalho.

Verificou-se que a higienização com qualquer um dos detergentes, se for bem realizada, remove com facilidade estes microrganismos. Resultados positivos podem resultar da má higienização do equipamento, utilização de utensílios mal higienizados ou pelo contacto do produto com superfícies também elas mal lavadas. As mãos dos colaboradores também são um meio de transporte de contaminação.

Portanto, existem cuidados a ter antes e após a lavagem, de modo a assegurar que durante o processo não ocorram contaminações e que consigamos garantir a melhor limpeza possível no final.

### ○ Comparação Detergente Industrial 1 e Detergente Desinfetante Clorado 2

Após exclusão do detergente desinfetante clorado 3 e 4, por melhores resultados do Detergente Industrial 1 e do Detergente Desinfetante Clorado 2, pretendeu-se comparar os dois últimos através de uma análise estatística utilizando um teste *t-student* para amostras independentes de forma a verificar se existem diferenças significativas na aplicação de um ou de outro detergente.

Inicialmente, como já descrito para a higienização das mãos, verificou-se se os dados seguiam distribuição normal, pelo teste de Shapiro-Wilk. Como o valor de *p* é superior a 0,05 procedeu-se à análise utilizando um teste paramétrico *t-student*. Na tabela seguinte encontram-se descritos os resultados obtidos.

**Tabela 9** – Teste T para o número de colónias de duas amostras independentes com variâncias iguais.

Ação realizada	Média (n=20)	$p(T \leq t)$ uni-caudal	Stat t	t crítico uni-caudal
Detergente 1	0,56	0,46	- 0,12	2,92
Detergente 2	0,65			

Através dos resultados obtidos estatisticamente, concluiu-se que não existem diferenças significativas entre os dois detergentes na ação de limpeza e/ou desinfecção. A aplicação de um ou de outro, assegura a eficácia e a eliminação dos microrganismos presentes.

Após realização das análises microbiológicas, comparação destes mesmos resultados e verificação da sua eficácia, outro ponto importante e tido em conta no momento da decisão final passou pela avaliação do preço em relação ao custo/eficácia.

o **Comparação custo / eficácia**

Inicialmente realizou-se um estudo para aferir a eficácia em termos de carga microbiana dos detergentes, o passo seguinte teve o mesmo objetivo, mas para comparar o custo com a eficácia destes mesmos. Para além de uma empresa querer garantir a segurança alimentar de um produto e de toda a cadeia alimentar associada, o custo que irão ter é muito importante, para tal, pretendeu-se verificar qual dos dois detergentes escolhidos tinha um custo por litro mais barato.

Nesta análise, foi tido em conta a concentração necessária de detergente para este ser eficaz, observando os estudos anteriores tanto num como noutra a diluição necessária a utilizar era de 1 % por litro de água. Através da concentração e do custo associado a cada detergente, analisou-se o custo por litro, como demonstrado na tabela 10.

**Tabela 10** – Comparação do custo por litro na utilização de diferentes detergentes.

<b>Detergente</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Concentração a utilizar</b>	1 %/L	1 %/L
<b>Custo / L</b>	1,68 €	0,79 €

Após comparação de preços, verificou-se que o detergente 1, já utilizado pela empresa, apresentava um custo bastante superior e ao detergente desinfetante 2.

Para além dos custos, o facto do detergente desinfetante clorado 2 ser ideal para a indústria alimentar e apresentar poder de desinfeção, torna-se relevante à sua utilização, uma vez que o detergente industrial 1 menciona apenas que pode ser utilizado nesta mesma indústria, não referindo qualquer poder desinfetante na sua composição. Apesar de os resultados de eficácia microbiológica serem idênticos, os tempos de atuação foram diferentes, representando outro ponto positivo para o Detergente Desinfetante Clorado 2.

Com todas as análises e comparações realizadas, a escolha da empresa para o detergente que irão utilizar em todas as unidades fabris e elaborar um novo plano de higienização associado, foi o Detergente Desinfetante Clorado 2.

- **Avaliação dos resultados**

Após a realização das diversas análises a mãos e superfícies, e perante os resultados obtidos é possível observar se os processos implementados devem ser aprovados ou rejeitados, de acordo com os critérios seguintes: <sup>[15]</sup>

- **Aprovação**

Considera-se bem-sucedidos os processos de limpeza e desinfeção em que o nível de contaminação é inferior aos níveis estipulados pelos modelos pré-definidos, como por exemplo, uma superfície com um número igual ou inferior a 1 colónia é considerada excelente, e bom se for até 10 em contagem total, acima deste valor é preocupante. Neste caso a superfície deve ser limpa de imediato e repetir o procedimento, podendo este sofrer alterações caso os resultados se mantenham.

- **Rejeição**

A contagem é realizada por placa, tendo esta aproximadamente 25 cm<sup>2</sup>, para a contagem total de microrganismos, o método de higienização implementado é rejeitado se as contaminações das amostras analisadas forem superiores a 10 colónias por cm<sup>2</sup>, uma vez que segundo o protocolo estipulado pela empresa é necessário proceder-se de imediato à limpeza e verificação das causas, aplicando medidas corretivas.

Após nova lavagem e desinfeção das superfícies ou equipamentos, deve-se recolher novamente amostras antes de voltar a arrancar a produção, de forma a garantir a segurança do produto e dos consumidores, de forma a evitar-se gastos desnecessários. As medidas implementadas podem ser as seguintes:

- Parar de imediato a produção, limpar e procurar as causas;
- Recolher amostras dos lotes em que existe suspeitas de contaminação e proceder à análise microbiológica;
- Em caso de se confirmar a contaminação dos lotes, destruir, garantindo que não saiu nenhum desse produto para o mercado.

Neste processo de otimização do processo de higienização foi implementado um estudo de doseamento automático do detergente desinfetante escolhido.

## 5. Conclusões Gerais e Trabalho Futuro

É fundamental controlar a eficácia das operações de limpeza e desinfecção, procedendo à avaliação microbiológica das mesmas bem como de uma inspeção visual após higienização. Os manipuladores devem ter especial cuidado com a sua higiene pessoal uma vez que são potenciais veículos de contaminação, a sua formação assume um papel importante para que estas práticas e comportamentos forneça motivação e sensibilização para a garantia da segurança alimentar.

Através do presente estudo foi possível concluir que, se a lavagem e desinfecção das mãos e das superfícies de contacto for executada de uma forma apropriada, reduz o risco de contaminação bacteriana, ou seja, a correta utilização de sabonetes, desinfetantes e um adequado método de secagem é suficiente para garantir a segurança do produto aquando do contacto com o manipulador ou superfície.

O conhecimento das propriedades químicas, características e utilização dos produtos de higienização, bem como a aplicação do procedimento adequado, constitui uma mais-valia para as empresas do setor alimentar pois permite maximizar as ações de higiene. Estas atitudes acarretam custos, tal como tempo para estudar os procedimentos e avaliar a eficácia, no entanto, os benefícios para a produção, a garantia da segurança dos produtos e para a própria empresa, supera as dificuldades iniciais.

A compreensão de toda a equipa de produção é crucial para o sucesso da implementação do código de boas práticas no momento da manipulação dos alimentos. Garantir que estes profissionais tenham a devida formação e acompanhamento é fundamental, para que demonstrem uma atitude consciente, cooperante e acima de tudo profissional.

Portanto, é essencial que as empresas tenham o cuidado de escolher e avaliar os produtos de higienização que utilizam, uma vez que é possível com este trabalho verificar a sua importância na redução da carga microbiana como uma garantia da segurança alimentar do produto.

Neste estudo apenas se considerou a análise e pesquisa de microrganismos mesófilos aeróbios e de coliformes (fecais ou não fecais). No entanto, num trabalho futuro deveria optar-se pela utilização de meios de cultura mais específicos para determinados microrganismos, uma vez que estes apresentam um grupo amplo e diversificado. Para as

mãos, seria interessante a utilização do meio MSA, uma vez que permite determinar a presença de *Staphilococcus aureus*.

A utilização de placas de contacto em substituição das zaragoas (método de contagem em placa) torna-se uma melhor hipótese uma vez que, a sua aplicação permite absorver uma maior quantidade de microrganismos numa área superficial, pelo contacto direto com o objeto em estudo. No entanto, o recurso a técnicas mais modernas e sofisticadas tais como a ATP bioluminescência, ao contrário dos outros métodos, permite a obtenção dos resultados quase no momento, contudo é uma técnica dispendiosa para as empresas.

## 6. Referências Bibliográficas

- [1] Monteiro, A. S. 2016. Avaliação da qualidade microbiológica de saladas prontas para consumo comercializadas na região de Lisboa [Dissertação para obtenção do grau de mestre]. Universidade Nova de Lisboa. 74 pp.
- [2] Esteves P., et al. INATEL. Manual de Higiene e Segurança Alimentar.
- [3] Regulamento (CE) nº852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 relativo à Higiene dos Géneros Alimentícios.
- [4] Joaquim Dias, Diretor de Qualidade, Grupo GCT. A Higienização na indústria alimentar <http://www.hipersuper.pt/2008/05/30/a-higienizacao-na-industria-alimentar/>. [Data da consulta: 14/05/2018].
- [5] Faria M. 2010. Avaliação dos conceitos e procedimentos de limpeza e desinfeção em estabelecimentos alimentares. [Dissertação para a obtenção do grau de mestre]. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. 111 pp.
- [6] Anónimo. Manual da Higienização na Indústria Alimentar. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/icta/instituto/gerencia-administrativa1/limpeza/manual-de-higienizacao>. [Data da consulta: 30/04/2018].
- [7] Silva G, Dutra S. P. e Cadima I. 2010. Higiene na Indústria de Alimentos. Escola Técnica Aberta do Brasil. 132 pp.
- [8] Saraiva M. A. 2011. Avaliação da eficácia de desinfetantes na indústria agro-alimentar. [Dissertação para a obtenção do grau de mestre]. Universidade de Aveiro. 72 pp.
- [9] Gomes O. T. e Bueno M. S. Higienização de tubulações e equipamentos de uma linha para envase de água mineral e bebidas carbonatadas.
- [10] Baptista P. 2003. Higienização de equipamentos e instalações na indústria agro-alimentar. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, Lda. 68 pp.
- [11] Silva C. A. 2013. Avaliação de linha de produção de refrigerantes em garrafas retornáveis com a substituição parcial de conservantes. [Dissertação para a obtenção do grau de mestre]. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. 94 pp.

- [12] Fidélis M. 2017. “Sistema CIP e COP na Indústria de Alimentos”. Disponível: <https://pt.linkedin.com/pulse/sistema-cip-e-cop-na-ind%C3%BAstria-de-alimentos-marcos-fid%C3%A9lis> [Data da consulta: 05/06/2018].
- [13] Anónimo. “Detergente”. Disponível: <https://educalingo.com/pt/dic-pt/detergente>. [Data da consulta: 08/06/2018].
- [14] Castro S. S. 2008. “Boas Práticas de Higiene: Um Pilar para a produção de alimentos seguros” [Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária]. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. 106pp.
- [15] Seabra C. 2016. “Validação e Otimização do Sistema Automático de Limpeza de Equipamentos” [Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Tecnologias de Produção e Transformação Agro-Industrial]. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. 123 pp.
- [16] Costa C. 2014. “Optimização do processo de produção numa indústria de detergentes”. [Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química]. Instituto Superior Técnico de Lisboa. 96 pp.
- [17] Pereira V. 2011. “Avaliação da Eficiência da Higienização das Mãos em Manipuladores de Alimentos”. [Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana]. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve. 78pp.
- [18] Baigrie B. 2003. Taints and off-flavours in food. Woodhead Publishing Limited. 216 pp. Disponível em: [https://books.google.pt/books?id=bhGkAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books?id=bhGkAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false). [Data da consulta: 15/06/2018].
- [19] Ferreira H. 2012. “Utilização do Método ATP Bioluminescência na Avaliação da Eficácia da Limpeza e Desinfecção de Superfícies em Cuidados de Saúde Primários”. [Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Infecção em Cuidados de Saúde]. Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa. 107 pp.
- [20] BasePoint Consulting Services. “O que é um produto biocida?”. Disponível em: <https://bpcs.pt/faq-itens/o-que-e-um-produto-biocida/>. [Data da consulta: 15/06/2018].

[21] European Chemicals Agency. “Regulamento relativo aos produtos biocidas”. Disponível em: <https://echa.europa.eu/pt/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>. [Data da consulta: 15/06/2018].

[22] Portaria nº 17980, de 30 de setembro de 1960, relativo a normas que devem obedecer a importação, fabrico e comércio dos pesticidas e produtos correlativos.

[23] Diretiva nº98/8/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de fevereiro de 1998, relativa à colocação de produtos biocidas no mercado.

[24] Regulamento (EU) nº528/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de maio de 2012 relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas.

[25] Direção Geral da Saúde. “Biocidas – Disponibilização e utilização de produtos biocidas no mercado nacional”. Disponível em: <https://www.dgs.pt/paginas-de-sistema/saude-de-a-a-z/biocidas.aspx>. [Data da consulta: 15/06/2018].

[26] Portaria nº149/88, de 9 de março de 1988, fixa as regras de asseio e higiene a observar na manipulação de alimentos.

[27] “A história do chocolate Imperial”. Disponível em: [http://www.imperial.pt/#/a\\_nossa\\_historia](http://www.imperial.pt/#/a_nossa_historia). [Data da consulta: 18/06/2018].

[28] “A Empresa”. Disponível em: <http://www.imperial.pt/#/empresa>. [Data da consulta: 18/06/2018].

[29] “As nossas marcas - Jubileu”. Disponível em: <http://www.imperial.pt/#/jubileu>. [Data da consulta: 18/06/2018].

[30] “As nossas marcas - Regina”. Disponível em: <http://www.imperial.pt/#/regina>. [Data da consulta: 18/06/2018].

[31] “As nossas marcas - Pintarolas”. Disponível em: <http://www.imperial.pt/#/pintarolas>. [Data da consulta: 18/06/2018].

[32] “As nossas marcas - Pantagruel”. Disponível em: <http://www.imperial.pt/#/pantagruel>. [Data da consulta: 18/06/2018].

[33] “As nossas marcas - Allegro”. Disponível em: <https://www.imperial.pt/#/allegro>. [Data da consulta: 18/06/2018].

- [34] “Qualidade, Investigação e Desenvolvimento”. Disponível em: [http://www.imperial.pt/#/qualidade\\_e\\_investigacao](http://www.imperial.pt/#/qualidade_e_investigacao). [Data da consulta: 18/06/2018].
- [35] Infaimon. 2017. “Departamento de qualidade”. Disponível em: <https://blog.infaimon.com/pt/departamento-de-qualidade/>. [Data da consulta: 18/06/2018].
- [36] HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. 2018. Technical Data. “Plate Count Agar (Standard Methods Agar)”. Disponível em: <http://himedialabs.com/TD/M091.pdf>. [Data da consulta: 19/06/2018].
- [37] Acumedia. 2010. “Caldo Verde Bile Brilhante 2 %”. Disponível em: [https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia\\_pi/7119\\_pt\\_pi.pdf](https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7119_pt_pi.pdf). [Data da consulta: 19/06/2018].
- [38] BD BBL CultureSwab. 2017. “Meio líquido de Stuart, meio líquido de Amies, meio de gel de agar de Cary-Blair”. Disponível em: <http://legacy.bd.com/resource.aspx?IDX=35680>. [Data da consulta: 19/06/2018].
- [39] Copan. “Swab Amies Agar Gel” Disponível em: <https://studylibpt.com/doc/914093/amies-agar-gel>. [Data da consulta: 19/06/2018].
- [40] ABDI, ABIHPEC, SEBRAE. 2015. “Guia de Microbiologia” 1º Edição. Programa de Desenvolvimento Setorial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética. 109 pp.
- [41] Anónimo. 2011. “O estudo de bactérias, fungos, vírus e parasitas.”. Disponível em: <https://www.quiminet.com/articulos/el-estudio-de-bacterias-hongos-virus-y-parasitos-2578648.htm>. [Data da consulta: 24/06/2018].
- [42] Darif A. *et al.* 2012. Universidade do Estado de Santa Catarina. “Contagem de coliformes totais e coliformes fecais”. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfPX8AG/coliformes>. [Data da consulta: 24/06/2018].
- [43] Copan. 2016. FecalSwab. “Package insert and How to use guide”. Disponível em: [https://www.copanusa.com/wp-content/uploads/2019/07/FecalSwab-Package-Insert\\_HPC021B\\_Fecalswab\\_\\_Rev.02\\_Date\\_2016.11\\_Package\\_Insert.pdf](https://www.copanusa.com/wp-content/uploads/2019/07/FecalSwab-Package-Insert_HPC021B_Fecalswab__Rev.02_Date_2016.11_Package_Insert.pdf). [Data da consulta: 19/06/2018].

[44] Guerra A. 2016. “Métodos de contagem microbiana”. Valença. 1ª Edição. 28p. Disponível em: [www.microbiologia-de-alimentos.com](http://www.microbiologia-de-alimentos.com). [Data da consulta: 30/06/2018].

[45] Nicolau P. 2014. “Métodos em microbiologia ambiental”. Universidade Aberta. 37 pp.

[46] Malheiro P. “Métodos para quantificar o crescimento microbiano”. Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Disponível em: <https://dokumen.tips/documents/metodos-de-quantificacao-de-microrganismos-1.html>. [Data da consulta: 30/06/2018].

[47] Brito I., Alho L. e Sinogas C. 2002/2003. “Microbiologia. Microbiologia geral. Princípios de Microbiologia”. Universidade de Évora. 73pp.

[48] Pais C., *et al.* “Unidade I – Métodos convencionais de microbiologia”. Universidade do Minho.

## **7. Anexos**

**Anexo I** – Ficha técnica Desinfectante A

**Anexo II** – Ficha técnica Desinfectante B

**Anexo III** – Ficha técnica Detergente Industrial 1

**Anexo IV** – Ficha técnica Detergente Desinfectante Clorado 2

**Anexo V** – Ficha técnica Detergente Desinfectante Clorado 3

**Anexo VI** – Ficha técnica Detergente Desinfectante Clorado 4

# Anexo I

## DESINFETANTE A

### Propriedades do produto

A desinfecção eficaz das mãos é uma das medidas preventivas mais importantes para quebrar a cadeia da infecção.

Utilizado como desinfetante higiênico das mãos em diferentes áreas médicas ou na indústria, este produto assegura uma redução fiável e rápida contagem de bactérias, eliminando os microrganismos de forma segura.

apresenta muitas vantagens para uma desinfecção fiável e suave das mãos:

- espectro de actividade abrangente: bactericida (incluindo MRSA), fungicida, tuberculicida, virucida contra vírus encapsulados
- eficaz de acordo com as normas EN 1040, EN 1275, EN 13727, EN 1500 e EN 12791
- excelente dermatotolerância ao produto, mesmo com uma utilização a longo prazo
- excelentes propriedades dermoprotectoras e de cuidado da pele
- cuida da pele através de um sistema único de agentes hidratantes

### Composição

Álcool desnaturado, água, ciclometicone, glicerina, tetra-hidroxipropil etilenodiamina, isohexadecano, acrilatos/polímero cruzado de alquil acrilato C 10-30, fragrância, PVP, álcool miristílico, bisabolol, salicilato de benzilo, hexilcinamaldeído, 2-(4-tert-butilbenzil) propionaldeído, hidroximetilpentilciclohexeno carboxaldeído.

### Actividade microbiológica

Bactericida, fungicida, tuberculicida, virucida contra vírus encapsulados (incluindo VHB, VIH, VHC), SARS, eficaz contra adenovírus, poliovírus and rotavírus.

### Áreas de aplicação

A Desinfecção das mãos à base de álcool, que pode ser realizada em qualquer local, independentemente da existência de um lavatório e de água.

é adequado para a desinfecção higiénica e cirúrgica das mãos. O produto pode ser utilizado em todas as áreas em que a higiene seja importante, por exemplo:

- em enfermarias (incluindo instalações sanitárias)
- em áreas funcionais (blocos operatórios, unidades de cuidados intensivos, unidades de doenças infecciosas)
- em salas de tratamento e serviços ambulatoriais
- em ambulâncias
- em laboratórios,
- serviços Hoteleiros
- em consultórios médicos de todas as especialidades
- em lares
- nos cuidados domiciliários de doentes, idosos e bebés
- em clínicas de diálise

- na indústria (indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar)

### Instruções para a utilização e dosagem

fricciona-se sem diluir nas mãos secas; assegure-se que o produto cobre totalmente as mãos durante o tempo de aplicação. Dê especial atenção às pontas dos dedos e aos polegares.

O produto deve ser aplicado com o dispensador fácil de utilizar, que deve ser accionado de preferência com o cotovelo. Para este tipo de dispensador, dispõe de recipientes de utilização única para assegurar condições de higiene máximas.

#### Norma EN

##### EN 13727

Efeito bactericida  
no teste de suspensão quantitativo  
- Eficácia na fase 2 / etapa 1 ..... 30 s

##### EN 1500

Teste efectuado sob condições práticas simuladas  
de desinfecção higiénica das mãos  
- Fase 2 / etapa 2 ..... 30 s  
Desinfecção higiénica das mãos .....

##### EN 12791

Teste efectuado sob condições práticas simuladas  
de desinfecção cirúrgica das mãos  
- Fase 2 / etapa 2 ..... 1,5 min  
Desinfecção cirúrgica das mãos .....

Desinfecção higiénica das mãos:  
Friccionar aprox. 3 ml nas mãos secas e mantenha as mãos humedecidas com o produto durante, pelo menos, 30 segundos.

##### Desinfecção cirúrgica das mãos

Mantenha as mãos e antebraços humedecidos com o produto durante 1,5 min.

##### Bactérias

MRSA ..... 15 s  
Tb..... 15 s

##### Vírus

Virucida contra vírus encapsulados (incluindo VHB, VIH e VHC) ..... 30 s  
Vírus Herpes simplex ..... 15 s  
Vírus da gripe A ..... 15 s  
SARS (coronavírus associado ao SARS) ..... 30 s  
Adenovírus ..... 2 min  
Poliovírus ..... 3 min  
Rotavírus ..... 30 s

### Dados físico-químicos

Aspecto ..... incolor  
Densidade (20 °C) ..... aprox. 0,82 g/cm<sup>3</sup>  
Ponto de inflamação ..... 17,1 °C (EN ISO 3679)

## Anexo II

# DESINFETANTE B

## Gel com álcool para desinfeção das mãos por fricção

### Aplicações:

- Setor médico
- Setor agroalimentar
- Outros setores
- Escritórios

### Características:

- Fórmula hipoalergénica
- Enriquecido com glicerina
- Não contém corantes nem perfume
- Não necessita enxaguar



### Composição

Etanol CAS n° 64-17-5 (600.00 g/kg), propano-2-ol CAS n° 67-63-0 (150.00 g/kg), glicerina.

### Características

- Aspeto: líquido límpido
- Cor: incolor
- Odor: alcooolizado
- Viscosidade: 1 500 – 3 000 mPa.s
- pH:



pH (puro): 6,0 – 7,0

### Conservação

- Prazo de validade: 3 anos.
- Conservar na embalagem de origem bem fechada à temperatura ambiente. Evitar as temperaturas superiores a 40°C.
- Proteger do gelo.

### Legislação

- Produto biocidaTP1 conforme o regulamento europeu Biocida N 528/2012.
- Utilização reservada a profissionais.

### Propriedades

- + 42% de hidratação.
- Boa tolerância da pele, testada em voluntários sob controlo médico.

## MODO DE UTILIZAÇÃO

### ▪ Tratamento higiénico:



Em mãos limpas e secas, aplicar uma dose do produto 3 mL.

Esfregar as mãos, punhos, espaços interdigitais e contorno das unhas, durante 30 segundos.

### ▪ Desinfeção cirúrgica em dois tempos:

Em mãos limpas e secas, aplicar 2 x 4,5 mL do produto.

Esfregar as mãos, punhos, antebraços, cotovelos, espaços interdigitais e contorno das unhas durante 2 x 45 segundos.

Rev.: 0 / 08.11.16

# Detergente Industrial 1

## APLICAÇÃO

Detergente líquido concentrado de utilização industrial

## PROPRIEDADES

É um produto viscoso incolor e completamente solúvel em água. É rico em tensoactivos, praticamente neutro, produz espuma abundante e persistente, conferindo-lhe um bom poder desengordurante. Por não existir qualquer incompatibilidade, pode ser utilizado na indústria alimentar. Devido às suas características físico-químicas, é muito bem tolerado pela pele.

## CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Usar uma concentração de 5 a 10 g/L de água tépida. Mergulhar os utensílios e lavar com um pano, escova ou esfregão. Enxaguar abundantemente e deixar secar ao ar.

## CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS

Aspecto: Líquido viscoso

Cor: ambar

pH 7

Biodegradável, conforme regulamento (CE) N° 648/2004 Anexo II e III

***Para esclarecimento de qualquer dúvida consulte os nossos serviços técnicos.***

As recomendações indicadas são extraídas da experiência industrial. Mesmo assim, aconselhamos a adaptação prévia das condições de utilização, para obtenção dos resultados desejados. De outra forma não teremos controlo directo dos n.º serviços técnicos. Limitamos os dados de utilização ao pessoal técnico da A2BRIOS, ou terceiros abrangidos pelos nossos contratos de colaboração.

## PRECAUÇÕES

Respeitar as informações constantes na ficha técnica e na ficha de dados de segurança.


## APRESENTAÇÃO

Embalagens de 5, 10, 25 e 30 Kg.

EMISSÃO: 02-09-2011

VERSÃO: 1

Ficha Técnica

	<p><b>DETERGENTE DESINFETANTE CLORADO 2</b></p>
<p><b>DESCRIÇÃO</b></p>	<p>Detergente desinfetante de utilização geral na limpeza e desinfecção de solos e paredes. Ideal na higienização de instalações na indústria alimentar e restauração, aliando num só processo, a limpeza e desinfecção segundo os critérios do HACCP.</p>
<p><b>PROPRIEDADES</b></p>	<p>Eficaz na eliminação de sujidades produzidas por gorduras animais e vegetais, sangue e proteínas. Previne a formação de películas proteicas ao facilitar a desnaturalização das proteínas. Recomenda-se para a limpeza de pavimentos, paredes, tábuas de corte, etc., com equipamentos de projeção de espuma, permitindo um maior tempo de contacto para a eliminação dos microrganismos. Presença de sequestrantes na sua composição que mantêm na fase de enxaguamento a sujidade e os resíduos de calcário em suspensão, evitando a sua reposição.</p> <p>passou a NORMA EN1276 (atividade bactericida), à diluição de 1%, em condições de sujidade com 5 minutos de tempo de contacto.</p> <p>passou a NORMA EN1275 (atividade fungicida), à diluição de 1%, em condições de sujidade com 5 minutos de tempo de contacto.</p>
<p><b>MODO DE EMPREGO</b></p>	<p>Diluir 1 a 2% de produto por cada litro de água.</p> <p><u>Limpeza em geral:</u> Aplicar a solução preparada com um pano ou esponja nas superfícies a limpar. Na limpeza de pavimentos usar uma esfregona ou mopa.</p> <p><b>ATENÇÃO:</b> Não utilizar juntamente com outros produtos, pois podem libertar-se gases perigosos (cloro).</p>
<p><b>HIGIENE E SEGURANÇA</b></p>	<p>Ver Ficha Dados Segurança do Produto.</p> <p>Armazenar na embalagem de origem fechada. Evitar temperaturas extremas.</p> <p>Segundo as recomendações de utilização pode ser usado em todos os materiais normalmente encontrados numa cozinha exceto alumínio e metal galvanizado.</p> <p>Em caso de acidente, consultar o <b>Centro de Informação Antivenenos (CIAV) através do telefone +351 808 250 143.</b></p>
<p><b>CARACTERÍSTICAS</b></p>	<p>Estado físico a 20°C: Líquido</p> <p>Aspeto: Transparente</p> <p>Cor: Amarelado</p> <p>Odor: A Cloro</p> <p>pH: [12,5 - 13,5]</p> <p>Densidade relativa a 20°C: 1,06</p> <p>Propriedade de solubilidade: Solúvel em água</p> <p><u>Substância ativa de acordo com anexo V do DL nº 121/2002, "Tipo de Produtos Biocidas", pertencentes ao: Grupo 1 – Desinfetantes e produtos biocidas gerais: Tipo de produto 4: "Desinfetantes das superfícies em contacto com os géneros alimentícios e alimentos para animais".</u></p> <p><b>PRODUTO BIODEGRADÁVEL</b></p>
<p><b>EMBALAGEM</b></p>	<p>3x5L; 20L</p>

**USO PROFISSIONAL**

A informação deste folheto é segundo o nosso critério correto. No caso de não serem respeitadas as corretas condições de utilização dos produtos, não nos responsabilizamos pelas consequências da sua utilização.

## DETERGENTE DESINFETANTE CLORADO 3

### APLICAÇÃO

Detergente e desinfetante clorado para a indústria alimentar

### PROPRIEDADES

É um produto líquido completamente solúvel em água indicado para a indústria alimentar. Possui um elevado poder bactericida e fungicida.

Tem um ótimo poder de limpeza e desengorduramento, mesmo a baixas concentrações, tornando-se um produto bastante económico.

Faz uma boa complexação de sais minerais, contidos na água.

Quimicamente é um produto de base de hipoclorito de sódio.

### CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Devido à sua elevada concentração em cloro recomendamos que o produto seja diluído a uma concentração de 2 a 5%.

Após a limpeza, enxaguar profundamente com água fria. O tempo de tratamento pode, conforme as exigências ir de 10 a 30 minutos.

### CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS

Aspecto: Produto Líquido

Cor: levemente amarelado

pH 14±1.0

Biodegradável, conforme regulamento (CE) N° 648/2004 Anexo II e III

***Para esclarecimento de qualquer dúvida consulte os nossos serviços técnicos.***

As recomendações indicadas são extraídas da experiência industrial. Mesmo assim, aconselhamos a adaptação prévia das condições de utilização, para obtenção dos resultados desejados. De outra forma não teremos controlo directo dos n.º serviços técnicos.

Limitamos os dados de utilização ao pessoal técnico de [ ] ou terceiros abrangidos pelos nossos contratos de colaboração.

### PRECAUÇÕES

Respeitar as informações constantes na ficha técnica e na ficha de dados de segurança.

### APRESENTAÇÃO

Embalagens de 5, 10, 25 e 30 Kg.

EMISSÃO: 19-10-2011

VERSÃO: 0

## DETERGENTE DESINFETANTE CLORADO 4

### DESCRIÇÃO:

Solução concentrada com acção bactericida e fungicida para aplicação em equipamentos das indústrias agro-alimentares. Formulado em base de hidróxido de potássio, sequestrantes, desincrustantes e desengordurantes.

Cumprido com as seguintes normas:

- Norma UNE-EN 1276: Antisépticos e desinfetantes químicos: Ensaio quantitativo para a avaliação da actividade bactericida dos antisépticos e desinfetantes químicos utilizados em produtos alimentícios, na indústria, no lar e nas colectividades.
- Norma UNE-EN 13697: Ensaio quantitativo em superfície não porosa para a avaliação da actividade bactericida e/ou fungicida dos desinfetantes químicos utilizados em produtos alimentícios, na indústria, no lar e nas colectividades.

### COMPOSIÇÃO:

Hipoclorito sódico (4,5%)  
Excipientes q.b.p 100%

### DADOS TECNICOS:

Estado físico: Líquido  
Cor: Amarelado  
Odor: A cloro  
pH: 13,5 ± 0,5 a 100%  
Densidade: 1,11 ± 0,05 g/cc

### APLICAÇÕES / MODO DE EMPREGO:

Sistema de recirculação em salas de ordenha, na indústria alimentar, etc.

Aplicação após diluição:

- Actividade bactericida: 2% com tempo de contacto 5 minutos.
- Actividade fungicida: 3% com tempo de contacto 15 minutos.
- Enxaguamento final com água potável. Não misturar com ácidos.

### PRECAUÇÕES:

Skin Corr. 1A: H314 - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves

Aquatic Acute 1: H400 - Muito tóxico para os organismos aquáticos

P102 Manter fora do alcance das crianças.

P260 Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P264 Lavar-se minuciosamente após manuseamento.

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

P363 Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar. P391 Recolher o produto derramado.

P405 Armazenar em local fechado à chave.

P501 Eliminar o conteúdo/o recipiente de acordo com a legislação em vigor quanto a tratamento de resíduos (Decreto-Lei, Número: 73/2011, Portaria nº 209/2004 de 3 de Março).

EUH401 Para evitar riscos para a saúde humana e para o ambiente, respeitar as instruções de utilização.

### VIDA ÚTIL E ARMAZENAMENTO:

Na embalagem de origem. Manter a embalagem fechada. Guardar em lugar fresco. Afastar de produtos sensíveis aos alcalinos clorados

### ACREDITAÇÕES:

- Biocida de uso veterinário (PT4). ACM nº 098/00/12NBVPT