



Universidade de  
Aveiro  
Ano 2011

Departamento de Química

**André Augusto Matos  
Saraiva**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DESINFECTANTES  
NA INDÚSTRIA AGRO – ALIMENTAR**



Universidade de  
Aveiro  
Ano 2011

Departamento de Química

**André Augusto Matos  
Saraiva**

## **AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DESINFECTANTES NA INDÚSTRIA AGRO – ALIMENTAR**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, co – orientação da Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia e Engenheiro Alcides Manuel Machado Gonçalves, responsável pela Área Profissional da Mistolin.

## **o júri**

Presidente

Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho  
Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo  
Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Sofia Duarte  
Investigadora de pós-doutoramento do CESAM da Universidade de Aveiro

Engenheiro Alcides Manuel Machado Gonçalves  
Gestor da Unidade de Negócio da Mistolin Profissional

## Palavras - chave

Mistolin, Desinfecção, Desinfectantes, Eficácia.

## Resumo

O presente trabalho, teve como principal objectivo avaliar a eficácia de diferentes desinfectantes na indústria Agro – Alimentar.

Para este efeito, testaram-se diferentes desinfectantes, produzidos pela Mistolin e por uma marca concorrente. Foram recolhidas amostras de superfícies, com ajuda de zaragatoas, em diferentes sectores da indústria Agro – Alimentar, sector das carnes, sector dos vinhos e sector dos lacticínios. Todas as amostras foram recolhidas em diferentes condições de higienização e posteriormente semeadas em meio PCA, para quantificação dos efectivos microbianos, sendo os resultados expressos em UFC por cm<sup>2</sup>. Ainda neste trabalho, foram efectuadas análises microbiológicas às águas utilizadas no processo de higienização, adicionando um redutor, tiosulfato de sódio, para inibir o efeito do cloro sobre os microrganismos presentes na água.

Analisou-se ainda a presença ou ausência de resíduo químico de desinfectante, com tiras indicadoras de pH e com um indicador para produtos alcalinos, a fenolftaleína.

Com a primeira formulação do desinfectante da Mistolin, a percentagem de eficácia varia entre 47 e 71%, enquanto no caso da concorrência varia entre 85 e 93%, para a mesa de vísceras vertical e horizontal, respectivamente. Após o desenvolvimento da nova formulação da Mistolin, as percentagens sofreram um aumento significativo, variando entre 94 e 95%.

No caso da queijaria, as percentagens variam entre 93-97% e no caso da concorrência variam entre 92-95%, para os diferentes pontos de recolha. Em todos os pontos da adega, a eficácia é ligeiramente superior no caso da Mistolin. As análises microbiológicas efectuadas nas amostras de água, apresentam valores de microrganismos abaixo do permitido por lei. Com as tiras de pH e com a fenolftaleína, foi possível verificar a ausência de qualquer resíduo químico da solução desinfectante.

No futuro, seria interessante desenvolver mais estudos, nomeadamente verificar a acção bactericida contra microrganismos específicos de cada sector.

**keywords**

Mistolin, Disinfection, Disinfectants, Efficacy.

**Abstract**

This project's main objective is to assess the efficiency of different disinfectants in the agro-food industry.

For this purpose, different disinfectants, produced by Mistolin and by a competing brand, were tested. Samples were collected, using swabs, from different agro-food industry surfaces in the meat, wine and dairy sectors. All samples were collected under different hygiene conditions and subsequently plated on PCA medium for microbial quantification; the results are expressed in CFU per cm<sup>2</sup>. This project also involved the microbiological analysis of the water used in the cleaning process, by using a reducing agent, sodium thiosulfate, with the aim of cut the chlorine's effect over the microorganisms in the water. An alkaline sensible chemical, phenolphthalein, and pH indicating strips were used to determine the presence or absence of any disinfectant's chemical residue.

With the Mistolin's disinfectant first formulation the efficiency varies between 47% and 71%, whereas the efficiency of the competing brand's product is ranged between 85% and 93% for the viscera vertical and horizontal table, respectively. However, after the development of a new Mistolin's disinfectant formulation the efficiency percentage was significantly increased, now being comprised between 94% and 95%. Regarding the dairy sector, Mistolin's efficiency is set from 93% to 97%, while the competing brand's product varies from 92% to 95%. About the wine sector, the Mistolin's efficiency is slightly higher in all the collecting locations. The microbiological analysis carried out in the water samples revealed microorganisms values bellow the ones set by law. The use of pH indicating strips and phenolphthalein allowed verifying the absence of any chemical residue from the disinfectant solution.

In future studies, it would be interesting to evaluate the bactericidal action against microorganisms specific to each sector.

## Índice

1. Introdução .....	11
1.1. A Indústria Agro – Alimentar .....	12
1.2.A Mistolin .....	12
1.3.Higienização na Indústria Alimentar .....	15
1.3.1.Considerações Prévias à Higienização .....	16
1.3.1.1.Tipos, Origem e Natureza Química da Sujidade .....	17
1.3.2.Métodos de Higienização .....	17
1.4.A Limpeza .....	18
1.4.1.Os Detergentes .....	19
1.4.1.1.Factores que afectam a actuação dos Detergentes .....	21
1.5.A Desinfecção .....	23
1.5.1.Os Desinfetantes .....	24
1.5.1.1.Factores que afectam a actuação dos desinfetantes .....	27
1.5.1.2.Mecanismos de Acção dos Desinfetantes .....	28
1.5.2.Problemas Inerentes ao Processo de Desinfecção .....	28
1.5.2.1.Formação de Biofilmes .....	28
1.5.2.2.Resistência a Desinfetantes .....	29
1.5.2.3.Taints / Off – flavours .....	31
1.5.3.A Desinfecção em Diferentes Sectores da Indústria Agro Alimentar .....	32
1.5.3.1. Sector das Carnes .....	32
1.5.3.2. Sector dos Lacticínios .....	34
1.5.3.3.Sector dos Vinhos .....	36
1.6.Microrganismos associados a contaminações ou deteriorações na Indústria Agro - Alimentar .....	38
1.7.O Papel da Higienização no Sistema HACCP .....	40
1.8.Monitorização das Actividades de Limpeza e Desinfecção .....	41
1.9.Normas e Legislação relativas a Higienização e Alimentos .....	44
2. Procedimento Experimental .....	47
2.1. Locais de Colheita .....	48
2.2. Plano de Amostragem .....	48
2.3. Colheita de Amostras de Superfícies .....	48
2.3.1. Colheita de Amostras no Sector das Carnes .....	49
2.3.2. Colheita de Amostras no Sector dos Lacticínios .....	49

2.3.3. Colheita de Amostras no Sector dos Vinhos .....	50
2.4. Análises Microbiológicas do Ambiente de Produção .....	50
2.5. Análises Microbiológicas das Amostras de Água .....	50
2.6. Determinação do Teor de Microrganismos Mesófilos Aeróbios .....	51
2.7. Análises Físico – Químicas dos Desinfetantes .....	51
3. Resultados .....	53
3.1. Teor de Microrganismos Mesófilos Aeróbios .....	54
3.2. Microrganismos presentes no Ambiente de Produção .....	57
3.3. Análises Microbiológicas das Amostras de Água .....	58
3.4. Análises Físico – Químicas dos Desinfetantes .....	58
4. Discussão dos Resultados .....	60
5. Formação Pessoal e Tarefas Desenvolvidas na Mistolin .....	63
6. Referências Bibliográficas .....	64
Anexos .....	67
Anexo I – Produtos da Área Profissional .....	68
Anexo II – Ficha Técnica do Produto Clorado da Mistolin .....	69
Anexo III – Ficha de Equipamento .....	71
Anexo IV – Ficha do Manual de Vinificação .....	73

### Índice de Figuras

Figura 1 - Representatividade da Diversey no Mundo.....	14
Figura 2 - Unidades de Negócio da Ecolab.....	14
Figura 3 – Mesa de Vísceras Horizontal - Matadouro.....	49
Figura 4 - Pontos de Colheita da Queijaria.....	49
Figura 5 - Pontos de colheita da adega.....	50

### Índice de Tabelas

Tabela 1 - Desinfetantes mais comuns usados na Indústria Alimentar.....	26
Tabela 2 - Principais mecanismos de acção de alguns desinfetantes.....	28
Tabela 3 - Valores das colheitas efectuadas no matadouro, comparando a formulação inicial do desinfetante da Mistolin com o desinfetante da marca concorrente.....	54
Tabela 4 - Valores das colheitas efectuadas no matadouro, comparando a nova formulação do desinfetante da Mistolin com o desinfetante da marca concorrente.....	54
Tabela 5 - Valores das colheitas efectuadas na queijaria.....	55
Tabela 6 - Valores das colheitas efectuadas na adega.....	56
Tabela 7 - Microrganismos presentes no ambiente de produção da queijaria.....	57
Tabela 8 - Microrganismos presentes no ambiente de produção do matadouro.....	57
Tabela 9 - Microrganismos presentes no ambiente de produção da adega.....	57
Tabela 10 - Teores de microrganismos totais presentes nas amostras de água.....	58
Tabela 11 - Testes realizados para detectar a presença de resíduos químicos.....	58
Tabela 12 - Testes complementares para detectar a presença de resíduos químicos /avaliar limite de detecção da fenolftaleína.....	59
Tabela 13 - Principais tipos de produtos comercializados pela Mistolin.....	68
Tabela 14 - Exemplo de cálculo das UFC cm <sup>-2</sup> .....	75

# **1. Introdução**

## 1.1. A Indústria Agro – Alimentar

A indústria Agro-Alimentar é um mercado “apetecível” devido ao elevado consumo em produtos de higienização, uma vez que são indústrias muito sensíveis no que se refere a contaminações. Este tipo de mercado está controlado por grandes empresas multinacionais, com produtos de excelente qualidade, boa assistência, mas preços elevados e tratamento distanciado. O facto de a concorrência fornecer este tipo de sector há mais de 20 anos, pode ser ou não vantajoso para, ou seja, as vantagens são a acomodação e desleixo do fornecedor, as desvantagens são a grande fidelização e segurança nos produtos que o cliente sente. Através da colmatação destas falhas a Mistolin procura ganhar o seu espaço (Simões, 2008).

## 1.2. A Mistolin

Sedeada na Zona Industrial de Vagos, a Mistolin – Produtos de Limpeza, Lda. é uma empresa nacional que se dedica à produção e comercialização de produtos de higiene. A operar no sector dos químicos desde 1992, apresenta uma vasta gama de produtos para as mais diversas gamas, entre elas, pavimentos, automóvel, construção, higiene pessoal, lavandaria, área alimentar, agro – alimentar e WC. A unidade de produção está localizada na Zona Industrial de Vagos, distrito de Aveiro, operando numa área de cerca de 13.800 m<sup>2</sup>, sendo 6.000 m<sup>2</sup> relativos à unidade fabril. Emprega neste momento cerca de 100 colaboradores (85 colaboradores na unidade fabril, 9 comerciais e 6 administrativos) ([www.mistolin.pt](http://www.mistolin.pt), consultado dia 16 de Abril de 2011).

Produz diariamente mais de 50 000 litros de produtos, dos quais, perto de 40% são relativos a produtos da área “Profissional”. Possui uma mini fábrica de embalagens com 4 máquinas de insuflação e 2 máquinas de PET (politereftalato de etileno, polímero termoplástico usado para fazer garrafas), onde são fabricadas cerca de 85% das embalagens utilizadas ([www.mistolin.pt](http://www.mistolin.pt), consultado dia 16 de Abril de 2011).

A empresa actua em três grandes áreas: “Doméstica”, “Profissional” e “Serviços”. Em 2004, surge a Mistolin Profissional com uma aposta clara no sector privado, público e comércio, com o objectivo de desenvolver produtos exclusivamente destinados a mercados “B2B” (“*Business to Business*”). A marca desta gama de produtos apresenta o mesmo nome que a empresa, com o intuito de oferecer aos clientes não só produtos de higiene, mas sim soluções integradas de higienização (Simões, 2008).

A gama “Profissional” apresenta uma elevada aplicabilidade nos mais diversos sectores, entre eles Sector Comércio e Serviços (com principal destaque para o Canal Horeca), Sector Privado (com grande volume de vendas para IPSS) e Sector Público (universidades, escolas, hospitais e clínicas) (Simões, 2008).

Inicialmente, o mercado alvo da Área Profissional da Mistolin era a restauração, hotelaria e lavandaria industrial, mas devido à saturação e às novas exigências do mercado, direcciona-se de momento para a indústria agro-alimentar (Simões, 2008).

A visão da Mistolin é “ser a melhor empresa em produtos e serviços de higiene e bem-estar do Mundo” e a sua missão é “ser uma empresa líder na constante adaptação às necessidades dos nossos clientes e consumidores. Para isso, contamos com uma equipa altamente motivada e inovadora com o objectivo de satisfazer as necessidades dos clientes” ([www.mistolin.pt](http://www.mistolin.pt), consultado dia 16 de Abril de 2011).

A concorrência mais próxima da Mistolin é formada pelas seguintes empresas: Ecolab, Diversey, Sutter, Hypred e Quimiserve (Simões, 2008). De seguida, são apresentadas algumas características destas mesmas empresas (neste trabalho apenas serão abordadas a empresa Ecolab e a empresa Diversey).

- **Diversey**

A JohnsonDiversey, S.A. é uma empresa multinacional especializada na área de higiene e limpeza profissional, com presença a nível mundial ([www.diversey.com](http://www.diversey.com), consultado a 15 de Maio de 2011).

Estão presentes em diversos sectores de actuação no mercado: Hotelaria, Restauração, Retalho, Instituições Públicas & Educação, Saúde, Empresas de limpeza e Indústrias Alimentares. Para estes sectores de actividade, oferecem soluções integradas que incluem produtos, utensílios, equipamentos de limpeza, acções de formação e serviços de consultoria desenhados para cada um dos sectores, adequando-se às necessidades das áreas de trabalho de cada um dos seus clientes ([www.diversey.com](http://www.diversey.com), consultado a 15 de Maio de 2011).

A figura 1 demonstra a representatividade da Diversey no Mundo, servindo actualmente 175 países e empregando cerca de 10500 funcionários.



Figura 1 - Representatividade da Diversey no Mundo

- Ecolab

A Ecolab é uma empresa com cerca de 1 milhão de clientes e uma facturação anual de mais de US\$ 5,5 bilhões. Fundada em 1923, com o nome original de Economics Laboratories, em St. Paul, Estados Unidos, conta actualmente com 54 fábricas e aproximadamente 26 mil funcionários, distribuídos por 170 países nos cinco continentes. A figura 2 engloba as principais unidades de negócio da Ecolab, para atender às necessidades dos seus clientes ([www.ecolab.com](http://www.ecolab.com), consultado dia 16 de Maio de 2011).

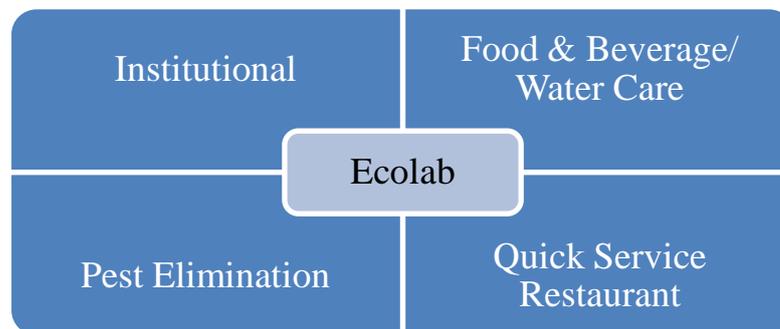


Figura 2 - Unidades de Negócio da Ecolab

**Institucional:** Produtos, programas e serviços de limpeza e desinfecção para restaurantes, hospitais, saúde, supermercados, lavandarias comerciais e institucionais, empresas de higiene, prédios de escritórios, clínicas, escolas, entre outros ([www.ecolab.com](http://www.ecolab.com), consultado dia 16 de Maio de 2011).

**Food & Beverage / Water Care Services:** Sistemas, produtos, equipamentos e serviços de limpeza geral e desinfecção para indústrias de alimentos e bebidas, farmacêuticas, cosméticas, indústrias de processamento de laticínios ([www.ecolab.com](http://www.ecolab.com), consultado dia 16 de Maio de 2011).

Pest Elimination: Programas e serviços com as tecnologias mais avançadas em Eliminação de pragas ([www.ecolab.com](http://www.ecolab.com), consultado dia 16 de Maio de 2011).

Quick Service Restaurant: Produtos e programas para limpeza e desinfecção de negócios de refeição rápida, lojas de conveniência, cafés e cinemas ([www.ecolab.com](http://www.ecolab.com), consultado dia 16 de Maio de 2011).

### **1.3. Higienização na Indústria Alimentar**

A palavra “higienização” deriva do grego *hygieiné* que significa “saúde”. Tem como missão promover através dos seus procedimentos, uma produção saudável de géneros alimentares, isto é, criar condições que garantam a segurança alimentar (Marriott, 2006). Na indústria alimentar, o processo de higienização consiste num conjunto de boas práticas, tornando possível a obtenção de boas condições higiénicas, no ambiente de processamento (Antunes, 2008).

A higienização deve remover os materiais indesejados (restos de alimentos, corpos estranhos, resíduos de produtos químicos e microrganismos) das superfícies, de tal forma que, mesmo que deixe alguns resíduos, não apresentem qualquer risco para a saúde dos consumidores, nem altere a qualidade dos alimentos (Antunes, 2008).

Aquando da produção de alimentos, pode ocorrer acumulação de materiais “alheios” à produção, tais como restos de alimentos, corpos estranhos, substâncias químicas do processo de limpeza e microrganismos, que podem colocar em risco todo o processo de produção (Marriott, 2006).

Estas situações podem resultar do processo de produção normal, como é o caso da adesão de restos de alimentos às superfícies de trabalho, ou de anomalias no processo, como por exemplo, anomalias resultantes de contaminações por uma deficiente manutenção dos equipamentos ou de contaminação ambiental. Estes materiais indesejáveis, designam-se por “resíduos” ou “sujidade” (Antunes, 2008). Dos materiais indesejáveis anteriormente referidos, devemos dar especial atenção à eliminação e controlo dos microrganismos, sobretudo dos microrganismos causadores de doenças (patogénicos) e dos que causam deterioração do produto (Marriott, 2006).

A higienização deverá, assim, assegurar a eliminação das sujidades visíveis e não visíveis e a destruição de microrganismos patogénicos e de deterioração até níveis que não coloquem em causa a saúde dos consumidores e a qualidade do produto

(Wirtanen, 2003). A higienização é um conceito que comporta dois procedimentos mais particulares, a limpeza e a desinfecção.

A limpeza tem por objectivo remover a sujidade de superfícies das instalações e utensílios, recorrendo a meios físicos, químicos e/ou mecânicos. Tem de se ter em atenção o facto de manter a integridade das superfícies de trabalho e não podem restar quaisquer químicos, que devem ser removidos pela água de enxaguamento / lavagem (Kessler, 1981; Wirtanen, 2003).

A desinfecção consiste na destruição ou redução de microrganismos, nomeadamente os patogénicos (apesar de não destruir esporos bacterianos), reduzindo-os para níveis aceitáveis para determinado propósito, normalmente para um nível que não coloque em causa a saúde dos consumidores, nem a qualidade dos produtos (Wirtanen, 2003). Há, no entanto, autores que consideram que a redução microbiana obtida, pelo processo de desinfecção, é momentânea em virtude de ser incompleta (Navarre, 1997).

Uma higienização correctamente efectuada deve conduzir à eliminação, tanto quanto possível, dos microrganismos presentes tanto nas superfícies como na atmosfera dos locais de trabalho e dos equipamentos (Wirtanen, 2003).

O cumprimento da legislação europeia, a manutenção da qualidade, a melhoria da imagem do produtor, bem como a tentativa de corresponder às expectativas dos diferentes sectores de mercado, são as principais razões que levam os responsáveis das unidades alimentares a implementar os planos de higienização (Gracey, 1999).

### **1.3.1. Considerações Prévias à Higienização**

Para se conseguir uma higienização eficaz é indispensável proceder a um pré – enxaguamento. Os equipamentos ou superfícies devem ser pré – enxaguados com água fria a baixa pressão, de forma a remover resíduos que se encontrem pouco agarrados à superfície. Este passo serve para remover pequenas partículas e prepara as superfícies para a aplicação do detergente, humedecendo-as. No caso de a sujidade ser composta por gorduras, poder-se-á utilizar água quente, no entanto, a temperatura desta não deve ser demasiado elevada para evitar uma eventual coagulação de proteínas, caso estas se encontrem presentes nas superfícies (Antunes, 2008).

### 1.3.1.1. Tipos, Origem e Natureza Química da Sujidade

A sujidade é geralmente constituída por aglomerados de partículas diferentes, tanto do ponto de vista da sua origem, tamanho ou da natureza química (Baptista, 2003).

No que diz respeito à origem, esta é normalmente dividida em origem animal, vegetal e mineral. Dentro da origem animal incluem-se sujidades como gorduras e sebos, frequentemente encontradas em unidades industriais que operam com matérias – primas de origem animal, mais concretamente o sector de transformação de produtos cárneos (matadouros, indústria de carnes, etc.). Nas sujidades de origem vegetal destacam-se as gorduras vegetais e os óleos, tanto em indústrias onde se produzem estes produtos como em indústrias que incorporam este tipo de gorduras como matéria – prima, exemplo das indústrias de conservas de peixe. Por último, nas sujidades de origem mineral destacam-se os óxidos e os depósitos minerais, que se podem formar em determinadas situações, nomeadamente induzidas pelo calor. Esta tipa de sujidade é muito frequente nas indústrias de lacticínios (Baptista, 2003).

Quanto à natureza e composição química, a sujidade divide-se normalmente em três grupos: orgânica, inorgânica e mista. A sujidade orgânica é composta por gorduras, óleos, proteínas, entre outros. A sujidade inorgânica é constituída por substâncias minerais, como carbonatos e óxidos. Em algumas situações a sujidade tem matéria orgânica e inorgânica, dizendo-se nesse caso, mista. Deste modo, torna-se de extrema importância conhecer as características da sujidade, de forma a escolher o produto indicado para a sua remoção (Manual de Higienização na Indústria Alimentar, 2003; Baptista, 2003).

### 1.3.2. Métodos de Higienização

Na selecção do método de higienização, a eficácia, o custo e o aconselhamento por parte de profissionais do sector, são factores de extrema importância. De seguida, desenvolvem-se alguns dos métodos mais comuns, tais como: aplicação manual, imersão, espuma, alta pressão e CIP (*Cleaning in Place*) (Manual de Higienização na Indústria Alimentar, 2003).

Na aplicação manual, o mais usual passa pela utilização conjunta de equipamentos (ex: escovas, raspadores, pistolas de água, mecanismos abrasivos), com

água e detergente. Este processo apresenta as desvantagens de ser pouco sofisticado e requerer muita mão-de-obra (Antunes, 2008).

O processo de imersão é utilizado para a lavagem de pequenas peças de equipamentos desmontáveis. Pode realizar-se com ou sem agitação, recorrendo geralmente ao uso de água quente e/ou detergente, a temperaturas mais elevadas (Baptista, 2003).

Os equipamentos que trabalham com alta pressão de água podem ser fixos ou portáteis, dependendo do volume e do tipo de instalação de cada sector. Normalmente, os equipamentos portáteis são mais pequenos e contêm um compartimento onde ocorre a mistura dos produtos, debitando posteriormente a solução a 40 – 75 litros por minuto. No caso das unidades fixas, ocorre igualmente a mistura dos produtos com a água, mas a solução é bombeada entre 300 e 475 litros por minuto (Antunes, 2008).

A aplicação de espuma consiste em pulverizar a espuma sobre as superfícies dos equipamentos. Este método é muito aceite na indústria agro – alimentar, porque para além de permitir poupar na mão-de-obra, apresenta vantagens muito interessantes, tais como, maior tempo de contacto com a sujidade, possibilidade de visualização das zonas já tratadas e o acesso a zonas difíceis de alcançar (Baptista, 2003).

Os sistemas CIP (“*Cleaning in Place*”) são indicados para efectuar a higienização em circuitos fechados, nomeadamente canalizações, tubagens e linhas de enchimento. Nestes sistemas, ocorre uma circulação, distribuição e aspersão de produtos de higienização e água sobre as superfícies a higienizar, com ajuda de uma bomba que permite “puxar” os produtos para o interior dos sistemas. A circulação do caudal deve ser efectuada em sentido inverso ao normalmente utilizado, de modo a arrastar a sujidade em zonas de difícil acesso, ou seja, os espaços mortos. Este método apresenta a desvantagem de apresentar um custo de instalação muito elevado (Costa, 1994; Marriott, 2006).

## **1.4. A Limpeza**

A operação de limpeza implica o humedecimento da superfície e a penetração dos agentes de limpeza no equipamento/ superfície e na própria sujidade. A reacção dos agentes activos das soluções com os constituintes da sujidade é que vai facilitar a eliminação das sujidades e evitar que estas se voltem a depositar noutros pontos no decurso da limpeza. Este passo é o mais importante para eliminar resíduos de alimentos das superfícies. Esta operação permite também eliminar parte dos microrganismos que

eventualmente estejam presentes, em particular aqueles que se encontram não directamente sobre a superfície mas sobre os resíduos de alimentos (Baptista, 2003; Antunes, 2008).

O processo de limpeza, consiste essencialmente na eliminação de restos de alimentos e outras partículas. Este processo pode ser efectuado através da acção física (ex: varrer, escovar), química (detergentes) ou mecânica (ex: bombas de água de alta pressão) sobre uma dada superfície. Na indústria alimentar, a maior parte dos procedimentos passa pela acção conjunta de detergentes, com ajuda de acção física ou mecânica (Antunes, 2008).

A limpeza é normalmente efectuada com água e detergente, podendo em certos casos, ser feita com a ajuda de abrasivos físicos. Para a remoção das proteínas e das gorduras, é necessário que ocorra uma reacção de saponificação, uma vez que o sabão é facilmente solubilizado pela água ou uma emulsificação (solubilização da gordura por meio da mudança de polaridade). Estas reacções só se verificam quando se utilizam detergentes alcalinos, de preferência muito fortes. No que diz respeito a resíduos minerais, a remoção é facilitada pela utilização de agentes sequestrantes e detergentes ácidos (Baptista, 2003; Showell, 2006).

### **1.4.1. Os Detergentes**

O termo detergente aplica-se a materiais e/ou produtos que consigam promover a remoção de um material de uma dada superfície, ex: sujidade de um tecido, comida de um prato, etc., e por outro lado ser capaz de dispersar e estabilizar a sujidade numa matriz, ex: deixar em suspensão gotículas de óleo numa fase móvel como a água) (Manual de Higiene na Indústria alimentar – 2003; Showell, 2006).

Os detergentes modificam a capacidade de penetração e remoção de sujidade pela água, através da emulsificação de gorduras, degradação de proteínas e da dissolução de sais minerais, impedindo assim que a sujidade se volte novamente a depositar. No entanto, a capacidade de um detergente para executar qualquer uma destas funções depende de diversos factores, entre os quais a sua formulação, as condições de utilização, o tipo de superfície a ser tratado e o tipo de substância a remover/dispersar ((Marriott, 1997; Showell, 2006).

Sendo desenvolvidos com base numa formulação complexa, os detergentes, são compostos por diferentes ingredientes, com funções específicas no processo de limpeza.

Estes podem ser divididos em cinco grandes grupos: surfactantes, agentes dispersantes, agentes quelantes, sistemas de branqueamento e aditivos (Smulders, 2002).

Os surfactantes são agentes activos de superfície, solúveis em água, compostos por uma porção hidrofóbica (normalmente uma cadeia longa N – alquilada) ligada a uma cadeia hidrofílica ou a grupos funcionais que aumentam a solubilidade. Estes agentes modificam a interface entre duas ou mais fases, a fim de promover a dispersão de uma fase para outra. Na formulação de produtos de limpeza, por exemplo, os surfactantes servem para ajudar a molhar as superfícies (capacidade de molhagem) e reduzir a tensão superficial entre a sujidade e a água, de tal forma que a sujidade seja removida da superfície e se mantenha dispersa na fase aquosa. A capacidade que os surfactantes apresentam para se concentrar nas interfaces deriva do seu carácter anfifílico, que consiste na combinação de propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas dentro da mesma molécula. As moléculas do surfactante reduzem a adesão da gordura à superfície quando as suas extremidades hidrofóbicas se colam às partículas de gordura (Smulders, 2002; Showell, 2006).

A estrutura do resíduo hidrofóbico também tem efeito significativo nas propriedades do surfactante. Deste modo, surfactantes que tenham poucas ramificações nos seus grupos alquilo, geralmente exercem melhor acção de limpeza, mas, no entanto, apresentam fraca capacidade de molhagem. Pelo contrário, surfactantes com muitas ramificações são bons agentes molhantes, mas têm uma capacidade de detergência insatisfatória (Smulders, 2002).

Um surfactante pode ser classificado como aniónico, não iónico, catiónico ou anfotérico, dependendo da carga que fica presente na cadeia lateral da molécula, após a sua dissociação em solução aquosa (Showell, 2006).

Em geral, tanto a adsorção como a capacidade de detergência aumentam com o aumento do comprimento da cadeia de hidrocarbonetos. Todas as mudanças referidas anteriormente, relativas a adsorção, molhagem e capacidade de detergência, resultam normalmente de variações no grau de ramificação das cadeias (Smulders, 2002).

Os surfactantes, diminuem a adesão da sujidade à superfície. Este efeito é conseguido diminuindo o ângulo de contacto, da sujidade na superfície. Se o ângulo for menor que 90°, o surfactante remove a sujidade por destacamento. Se o ângulo for superior a 90°, a sujidade é removida por emulsificação ou solubilização (Showell, 2006).

Para a remoção da sujidade, os surfactantes devem ser adsorvidos na interface sólido – líquido ou líquido – líquido da sujidade. Esta característica é conseguida pelos surfactantes não iónicos (cujas extremidades têm carga eléctrica nula). No entanto estes surfactantes não demonstram grande eficácia a nível da interface líquido – ar, uma vez que não apresentam capacidade para formar espuma. Para este efeito, são adicionados ao detergente, os surfactantes iónicos que facilitam a formação de espuma (Smulders, 2002; Showell, 2006).

O controlo dos iões metálicos é uma necessidade comum em muitas formulações de detergentes. Este facto é extremamente importante, pois, no caso de processos de limpeza, na presença de iões cálcio na água, pode ocorrer precipitação dos tensoactivos aniónicos, reduzindo desta forma a concentração disponível para uma limpeza eficaz (Smulders, 2002).

Os agentes quelantes, são por isso adicionados à formulação, para promover a remoção de iões de cálcio e magnésio, a partir de soluções aquosas, permitindo manter estes iões em solução e evitando assim possíveis precipitações (Smulders, 2002).

Os agentes de branqueamento são componentes comuns da lavandaria, máquinas de lavar loiça e formulação de detergentes para limpeza de superfícies duras, actuando através de um ataque oxidativo, com a função de destruir os grupos cromóforos, responsáveis pela formação da cor nas superfícies (Smulders, 2002).

Para que um detergente actue de forma eficaz, isto é, seja capaz de remover os resíduos que se encontram agarrados às superfícies, deve apresentar algumas propriedades importantes, tais como:

- poder dissolvente no caso de resíduos minerais
- capacidade saponificante e emulsificante sobre resíduos de gorduras
- capacidade sequestrante ou quelante, principalmente em relação aos minerais responsáveis pela dureza da água
- bom poder de molhagem, graças à acção dos surfactantes

#### **1.4.1.1. Factores que afectam a actuação dos Detergentes**

Os principais factores que condicionam a acção dos detergentes, são:

- concentração, a concentração específica corresponde à máxima eficácia da acção química;

- tempo de actuação, depende do tipo e quantidade de sujidade, embora deva ser suficiente para que o produto seja eficaz;
- temperatura, importante pois acelera as reacções químicas;
- acção mecânica requerida, retira sujidades das superfícies e dispersa-as na solução de limpeza.

Estes quatro factores estão interligados, sendo que uma alteração num deles, implica a alteração dos outros, de modo a que se mantenha uma boa eficácia de limpeza (Antunes, 2008).

No que diz respeito ao detergente apropriado a utilizar, a escolha depende do tipo e quantidade de sujidade a remover, assim como das suas características de solubilidade. Normalmente, sujidades inorgânicas, são removidas mais facilmente com detergentes ácidos, enquanto as sujidades orgânicas removem-se mais facilmente com detergentes alcalinos (Holah, 2000; Antunes, 2008).

Não menos importante que todos os aspectos referidos anteriormente, a água utilizada para a dissolução dos produtos de limpeza, é igualmente um factor determinante na actuação dos detergentes, devendo obedecer a diferentes critérios, tais como, ser própria para consumo, transparente e livre de microrganismos. Na generalidade das situações, os produtos de limpeza são fornecidos ao cliente na forma de uma solução concentrada, havendo a necessidade de se proceder à diluição da solução, para utilização nas indústrias agro – alimentares. Na maioria dos casos, a água representa entre 90 a 95% da composição do produto e a presença de determinados iões, nomeadamente cálcio e magnésio podem interferir na eficácia da higienização. Estas espécies químicas podem reagir com as espécies activas dos produtos de higiene, ligando-se normalmente através de reacções de complexação, reduzindo desta forma a concentração dos agentes activos disponíveis para atacar a sujidade (Baptista, 2003).

Águas que apresentem uma concentração elevada de iões cálcio (acima de 150 mg/L em  $\text{CaCO}_3$ ), são consideradas muito duras e requerem a adição de agentes sequestrantes ou quelantes na formulação do detergente, para evitar a formação de depósitos minerais sobre as superfícies. Se a água tiver uma dureza excessiva, pode contribuir ainda para a formação de incrustações nas superfícies dos equipamentos, pelo que normalmente se aconselham águas brandas para a limpeza química (Marriott, 1997; Holah, 2000; Marriott, 2006).

O tipo de equipamento e a superfície sobre os quais a sujidade se pode depositar ou aderir, são igualmente factores preponderantes no processo de limpeza. A superfície a amostrar pode ser áspera ou lisa, plana ou com curvas e cantos, contínua ou com fendas, e acessível ou de difícil acesso. Todo o tipo de superfície, mesmo as mais lisas (ex: inox) apresentam rugosidade, embora em dimensões muito pequenas. A dimensão de muitos microrganismos é inferior a 2  $\mu\text{m}$ , o que faz com que mesmo nas superfícies mais lisas e de menor rugosidade, se possam fixar microrganismos. As condições para a fixação de microrganismos aumentam com o aumento da rugosidade das superfícies. Desta forma, uma superfície de contacto com alimentos deve obedecer a diferentes critérios, tais como, ser atóxica, não absorvente, não porosa e não corrosiva (Marriott, 1997; Orth, 1998; Wirtanen, 2003; Antunes, 2008).

As entidades reguladoras das indústrias alimentares defendem que as superfícies devem ser de aço inoxidável, que embora sendo superfícies que resistem à corrosão, podem não estar isentas de problemas. Nas superfícies de aço inoxidável é frequente a formação de uma película protectora de óxido de cromo. Esta película depois de destruída, forma-se novamente com o simples contacto com o ar. A utilização de agentes abrasivos para evitar a formação destas películas faz com que a superfície fique mais danificada, levando ao aparecimento da corrosão, dificultando assim as etapas da higienização (Costa, 1994; Antunes, 2008).

Além de todos os factores acima mencionados, um detergente deve ser o menos corrosivo possível, deve ser estável e acima de tudo, deve ser amigo do ambiente, pelo que a selecção final de um detergente depende da consideração de todos os factores acima referidos e deve apoiar-se nas recomendações do fornecedor (Costa, 1994).

## **1.5. A Desinfecção**

A seguir à limpeza, a desinfecção é usada para reduzir o número de microrganismos viáveis até níveis seguros para o consumidor, por inibição ou destruição, e para prevenir o crescimento microbiano durante o período de produção. Este processo pode ser alcançado mediante a aplicação de agentes ou processos (químicos ou físicos) a uma superfície previamente limpa. A desinfecção é especialmente requerida em superfícies húmidas, as quais oferecem condições favoráveis ao crescimento de microrganismos (Baptista, 2003; Wirtanen, 2003; Marriott, 2006).

Existem diferentes tipos de desinfecção, sendo os mais comuns, a desinfecção por calor, desinfecção por radiação e a desinfecção química. A desinfecção por calor, é um método não corrosivo, e capaz de destruir todo o tipo de microrganismos, no entanto, apresenta como limitação o facto de não poder ser usada para desinfetar superfícies sensíveis ao calor. Este tipo de desinfecção só é eficaz se a temperatura atingir toda a superfície a desinfetar e durante o tempo necessário para a destruição dos microrganismos (Wirtanen, 2003; Marriott, 2006).

No caso da desinfecção por radiação, é frequentemente utilizada para grandes superfícies, nomeadamente hospitais e laboratórios e não tanto na indústria alimentar. A pouca utilização na indústria alimentar, deve-se ao facto dos restos de alimentos e outros tipos de sujidades absorverem a radiação, exercendo assim um efeito protector sobre os microrganismos, sendo este um aspecto negativo da sua utilização (Pearson, 1995; Marriott, 2006).

Na indústria alimentar e agro – alimentar, o método mais usado para a desinfecção é baseado na utilização de produtos químicos. Este tipo de desinfecção é o que vai ser mais abordado neste trabalho (Manual de Higienização na Indústria Alimentar, 2003).

### **1.5.1. Os Desinfectantes**

Existem vários tipos de desinfectantes consoante o tipo de microrganismos que eliminam, tais como fungicidas (eliminam bolores) e bactericidas (eliminam bactérias). Em termos de forma de apresentação, podem ser líquidos (ex: álcoois), sólidos (em pó para diluição em água, ex: pastilhas de cloro) ou gasosos (ex: gás de cloro).

Apesar da grande diversidade de desinfectantes que podem ser utilizados na indústria agro – alimentar, os mais comuns são o cloro, o ácido peracético, o peróxido de hidrogénio, o iodo e os compostos de amónio quaternário (Orth, 1998; McDonnell, 1999; Langsrud, 2003; Wirtanen, 2003; Marriott, 2006).

O cloro e os compostos clorados são bons anti-bacterianos e não deixam sabores nos produtos, desde que sejam usados nas concentrações adequadas e as superfícies sejam enxaguadas correctamente. São muito utilizados por serem muito baratos, o que a nível industrial e económico é mais rentável. Apesar das vantagens referidas anteriormente, os compostos clorados são por vezes ineficientes na presença de alguns produtos orgânicos, e podem provocar a formação de substâncias cancerígenas. Quando

se utilizam estes desinfetantes numa concentração superior ao indicado para o efeito, podem ser corrosivos em alguns tipos de superfícies, nomeadamente as que têm alumínio na sua constituição. Dentro dos compostos de cloro, são muito utilizados os hipocloritos, em particular o hipoclorito de cálcio e o hipoclorito de sódio. (Orth, 1998; McDonnell, 1999).

Os compostos de iodo ou iodóforos podem exercer acção conjunta com agentes de limpeza ácidos. Estes compostos baseados no iodo, requerem pouco tempo de contacto com as superfícies, para que façam efeito e apresentam um largo espectro de acção, nomeadamente em relação às bactérias. Apesar do largo espectro de acção, basta a presença de resíduos alimentares ou outro tipo de sujidades, nas superfícies, para que estes compostos sejam inactivados. Quando o iodo se mantém activo, surge com uma cor amarela, sendo que a perda desta cor é indicadora da inactividade do composto. (Orth, 1998; Manual de Higienização na Indústria Alimentar, 2003; Wirtanen, 2003).

Os compostos de amónio quaternário, contrariamente aos compostos referidos anteriormente, os compostos de amónio quaternário têm uma actividade corrosiva baixa e não são tóxicos, no entanto, tendem a permanecer nas superfícies, pelo que é importante enxaguar com água limpa depois de desinfetar. Quando comparados com o cloro, apresentam menor actividade contra bactérias Gram negativas (Manual de Higienização na Indústria Alimentar, 2003).

O peróxido de hidrogénio é considerado “amigo do ambiente” uma vez que a sua decomposição origina produtos inócuos, tais como, água e oxigénio. Apesar desta solução ser geralmente estável, normalmente adicionam-se estabilizadores para evitar a decomposição. Apresenta boa eficácia contra vírus, bactérias, leveduras e esporos bacterianos. (McDonnell, 2001).

Por fim, o ácido peracético, quando comparado com o peróxido de hidrogénio, tem uma acção mais potente com concentrações mais baixas de utilização (< 0.3%). Os produtos resultantes da sua decomposição são seguros, o ácido acético e o oxigénio, apresentando ainda a vantagem de não atacado por peroxidases, ao contrário do que se verifica com o peróxido, continuando activo mesmo na presença de matéria orgânica. (Schroder, 1984; McDonnell, 2001).

Na tabela 1, estão descritas as aplicações e limitações de desinfetantes existentes no mercado, usados na indústria agro – alimentar.

Tabela 1 - Desinfetantes mais comuns usados na Indústria Alimentar

<b>Tipo de Desinfetante</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Álcoois</b>	Eficaz contra células vegetativas; não tóxico; volátil; hidrossolúvel	Ineficaz contra esporos; microbiostático
<b>Ácido Peracético</b>	Espectro abrangente; elimina esporos; degrada biofilmes; não tóxico	Corrosivo e instável
<b>Peróxido de Hidrogénio</b>	Decompõe-se em água e oxigénio; fácil de usar e enfraquece os biofilmes	São necessárias concentrações elevadas; corrosivo
<b>Cloro</b>	Eficaz em baixas concentrações; espectro abrangente; barato; facilita a remoção dos microrganismos das superfícies	Produção de subprodutos; descoloração; desenvolvimento de resistência; gás explosivo; resíduos
<b>Hipoclorito</b>	Barato; fácil de usar; espectro microbiano abrangente; fácil de usar; facilita o desprendimento dos microrganismos das superfícies	Instável; tóxico; corrosivo; descoloração; rápido crescimento microbiano depois da sua utilização
<b>Quaternários de Amónio</b>	Eficaz; não tóxico; inodoro; não corrosivo; previne crescimento dos microrganismos	Inactivado por pH baixo e na presença de iões $Ca^{2+}$ e $Mg^{2+}$ ; pouco eficaz contra bactérias Gram -
<b>Iodóforos</b>	Não corrosivos; não irritantes; espectro abrangente	Caros; formam compostos roxos quando contactam com o amido
<b>Ozono</b>	Efeito semelhante ao do cloro; sem resíduos; decompõe biofilmes	Corrosivo; facilmente inactivado; reage com matéria orgânica
<b>Glutaraldeído</b>	Barato; fácil de usar; eficaz a baixas concentrações	Fraca degradação de biofilmes; forma ácido fórmico

<sup>a</sup>Adaptado de Wirtanen, 2003; <sup>b</sup>Adaptado de Russell, 1998

### **1.5.1.1. Factores que afectam a actuação dos desinfectantes**

A escolha do desinfectante depende de vários factores, principalmente da flora microbiana existente, sendo, por isso, necessário, que cada sector alimentar, conheça com pormenor a flora típica associada aos seus produtos, de modo que a desinfecção possa ser o mais eficaz possível (Forsythe, 2002).

O tempo de contacto é específico para cada desinfectante, sendo que quanto maior for o nível de contaminação, maior terá de ser o tempo de contacto para que o desinfectante produza o efeito desejado (Wirtanen, 2003).

No que diz respeito à temperatura, de um modo geral, os desinfectantes actuam preferencialmente a temperaturas superiores à temperatura ambiente, embora o aumento da temperatura possa ser limitado pela volatilidade dos produtos (Forsythe, 2002; Wirtanen, 2003).

Em relação à concentração do produto, quanto maior esta for, menor o tempo de contacto necessário para se ter boa eficácia (Manual de Higienização na Indústria Alimentar, 2003).

A desinfecção só pode ser efectuada correctamente após uma limpeza prévia, porque se houver restos de alimentos, estes exercem efeito protector sobre os microrganismos, limitando deste modo a eficácia do desinfectante (Forsythe, 2002).

O nível de contaminação existente, torna-se de uma importância extrema, pois os microrganismos morrem de forma logarítmica, ou seja, se 90 % dos microrganismos de uma dada superfície morrem em 10 minutos, 90 % dos restantes demoram igualmente 10 minutos a morrer e assim sucessivamente. Neste caso, ao fim de 20 minutos teríamos presentes apenas 1% dos microrganismos originais, o que comprova que quanto maior a contaminação, mais tempo será preciso para que a desinfecção seja realmente eficaz. Os microrganismos podem apresentar maior ou menor resistência aos desinfectantes, sendo os microrganismos patogénicos bastante sensíveis à acção do calor, de desinfectantes e das variações de pH do meio. Por outro lado, os microrganismos termoresistentes são difíceis de destruir pelo calor pois resistem a temperaturas de 80-90°C (Pearson, 1995; Gracey, 1999; Forsythe, 2002; Wirtanen, 2003; Manual de Higienização na Indústria Alimentar, 2003).

### 1.5.1.2. Mecanismos de Acção dos Desinfectantes

Os desinfectantes utilizados na indústria agro - alimentar, exercem a sua acção de diferentes formas, sendo as mais comuns, a disrupção das membranas celulares, a dissolução de lípidos, desnaturação de proteínas ou actuando como agentes oxidantes. Na tabela 2, são descritos os principais mecanismos de acção de alguns desinfectantes referidos anteriormente (McDonnell, 2001).

Tabela 2 - Principais mecanismos de acção de alguns desinfectantes

<b>Alvo</b>	<b>Desinfectante</b>	<b>Mecanismo de Acção</b>
Membrana Externa	<b>Glutaraldeído</b>	Promove o Cross – Linking das proteínas
Membrana Celular	<b>Álcool</b>	Rápida desnaturação das proteínas e lise celular
Membrana citoplasmática (interna)	<b>Quaternários de Amónio</b>	Provoca danos na membrana revestida por fosfolípidos
Efeitos no DNA	<b>Peróxido de Hidrogénio</b>	Inibição da Síntese de DNA
Agentes de oxidação	<b>Cloro</b> <b>Ácido Peracético</b>	Desnaturação de proteínas e outros componentes da membrana celular

## 1.5.2. Problemas Inerentes ao Processo de Desinfecção

### 1.5.2.1. Formação de Biofilmes

A formação dos biofilmes inicia-se com a aderência de um número limitado de células a uma superfície, produzindo polissacarídeos que reforçam a sua aderência à superfície (Costerton, 1999). Superfícies que permaneçam húmidas durante muito tempo, conferem condições ideais para o desenvolvimento dos microrganismos e, consequentemente a formação de biofilmes (Shi, 2009).

Na indústria alimentar, para que a remoção do biofilme seja eficaz, deve efectuar-se a limpeza logo no final do processamento. Normalmente, a formação de biofilmes verifica-se em locais onde a higienização não é eficiente ou em locais de difícil acesso (Marriott, 2006). A remoção dos biofilmes pode ser conseguida recorrendo ao uso de soluções alcalino – cloradas (Jefferson, 2004). Os biofilmes

actuam como “protectores” dos microrganismos, uma vez que os microrganismos que se encontram nos biofilmes são até mil vezes mais resistentes aos processos de higienização, do que aquelas que se encontram num estado livre, sendo mesmo capazes de sobreviver em condições adversas, tais como a ausência de nutrientes e as variações de pH (Baptista, 2003; Wirtanen, 2003; Marriott, 2006).

Sob o ponto de vista económico e industrial, a formação destas estruturas é indesejável uma vez que conduz quase sempre à deterioração dos alimentos, que são sujeitos a um grande desenvolvimento de microrganismos, nomeadamente os patogénicos (Forsythe, 2002).

A desinfecção, é, portanto, estritamente necessária para remover microrganismos que se encontram sob a forma de biofilmes, processo este que deve ser mencionado na elaboração do sistema HACCP e, mais especificamente, no plano de higienização delineado (Forsythe, 2002; Shi, 2009).

### **1.5.2.2. Resistência a Desinfetantes**

O foco sobre a higiene na indústria de alimentos resultou num aumento de desinfecções químicas e tem sido descrito que este tipo de desinfecção irá contribuir para uma pressão selectiva e um posterior aparecimento de microrganismos resistentes a desinfetantes (McDonnell, 2003; Langsrud, 2003; Shi, 2009).

Na etapa de enxaguamento, a concentração dos resíduos remanescentes não é suficiente para destruir os microrganismos, levando a um aumento da pressão selectiva, que por sua vez conduz ao aumento da retenção e à aquisição de genes entre os microrganismos, ou à adaptação de bactérias que assim adquirem resistência ao desinfetante (Langsrud, 2003).

Se um microrganismo ou espécie consegue sobreviver ou crescer a altas concentrações de desinfetante, mais que outro microrganismo, diz-se que o microrganismo apresenta elevada resistência. Dentro da mesma espécie, as estirpes que sobrevivem (ou não são inibidas) a concentrações de desinfetante que matam (ou inibem) a maioria das estirpes dessa espécie, são chamados de estirpes resistentes (Russell, 1998; Langsrud, 2003). De microrganismo para microrganismo, a resistência a desinfetantes é variável, por exemplo, as bactérias Gram + apresentam menos

resistência que as Gram – (Jefferson, 2004). Segundo Russell, no que diz respeito à resistência a desinfetantes, os priões são os mais resistentes, enquanto os vírus revestidos por lípidos são os mais susceptíveis de serem eliminados (Russell, 1998).

Em geral, as bactérias isoladas após a desinfecção são mais resistentes e representam um potencial problema de segurança alimentar ou de deterioração dos alimentos (Russell, 1998; Langsrud, 2003; Shi, 2009). Existem diversas formas de contrariar a resistência, tais como, otimizar os processos de higienização, temperatura do processo, secagem das superfícies após a desinfecção, entre outras medidas (Russell, 1998; Langsrud, 2003).

Segundo McDonnell e Russell existem dois tipos de resistência: intrínseca ou adquirida. A resistência adquirida, resulta de mutações ou da aquisição de plasmídeos ou transposões (Russell, 1998).

A resistência intrínseca resulta de propriedades naturais dos microrganismos ou da sua forma de crescimento. Para que um desinfetante atinja o seu objectivo, é necessário que o mesmo seja capaz de passar as estruturas externas das células. A natureza e a composição dessas camadas dependem do tipo de organismo e pode actuar como uma barreira de permeabilidade, limitando assim a passagem do agente activo para o interior da célula, resultando numa captação reduzida, para que se obtenha o objectivo desejado (Russell, 1998). A resistência intrínseca (inata) é uma propriedade natural, onde se verifica um controlo cromossómico da célula bacteriana que lhe permite contrariar a acção de um desinfetante ou de um antiséptico (Russell, 1998).

Microrganismos como os esporos bacterianos, as bactérias Gram – e as micobactérias, têm sido relacionados com mecanismos de resistência intrínseca, ao passo que a resistência adquirida normalmente é associada a compostos de mercúrio ou outros sais metálicos (Russell, 1998; Langsrud, 2003).

De todos os organismos que apresentam resistência intrínseca, os esporos bacterianos são os mais resistentes de todos, seguidos pelas micobactérias e pelas bactérias Gram negativas (Russell, 1998).

Os esporos bacterianos apresentam uma estrutura complexa. O protoplasto e a parede celular germinativa estão revestidos pelo córtex, externamente a estes existe ainda o revestimento interno e externo do esporo. O revestimento interno dos esporos consiste principalmente em proteínas, com uma fracção solúvel em compostos alcalinos, formada por polipéptidos acídicos, e outra fracção resistente a alcalinos,

associada à presença de pontes fortes dissulfito, no revestimento externo (Russell, 1998; McDonnell, 1999).

As micobactérias apresentam menor sensibilidade aos desinfetantes do que as bactérias não formadoras de esporos. A explicação mais provável para este facto, deve-se à impermeabilidade conferida pela parede celular micobacteriana, que limita a entrada do biocida para o interior das células. Alguns autores defendem que o alto nível de resistência das micobactérias está relacionado com a presença de ácidos micólicos e arabinogalactanas na parede celular micobacteriana (Russell, 1998).

No caso das bactérias Gram negativas, a sua membrana externa rica em lipopolissacarídeos (LPS) actua como uma barreira que limita a entrada dos agentes biocidas, para o interior da célula (Russell, 1998).

### 1.5.2.3. Taints / Off – flavours

Um *taint*, designa-se como sendo um sabor ou odor anormal provocado por contaminações químicas externas ao alimento, enquanto um *off – flavour* é um sabor ou odor anormal num alimento derivado da sua deterioração (Baigrie, 2003).

Como o principal objectivo dos processos de limpeza é garantir as condições ideais para o processamento de alimentos, sem contaminações. Quando acidentalmente os resíduos de desinfetantes ou detergentes passam para as superfícies que contactam directamente com os alimentos, pode ocorrer a formação de *taints* (Baigrie, 2003).

Um dos problemas inerentes à utilização de alguns desinfetantes à base de cloro, iodo ou oxigénio, prende-se com o facto de estes ao reagirem com compostos existentes nos alimentos, poderem originar compostos que eventualmente são susceptíveis de causar *off – flavours*, como por exemplo, os iodofenóis e os clorofenóis (Baigrie, 2003).

### **1.5.3. A Desinfecção em Diferentes Sectores da Indústria Agro Alimentar**

#### **1.5.3.1. Sector das Carnes**

Os microrganismos presentes nos animais podem causar efeitos indesejáveis, tanto na carne (deterioração e descoloração da carne) como no consumidor, podendo provocar doenças de origem alimentar (Marriott, 2006). Quando se dá a morte do animal, os microrganismos que em vida não se manifestam, devido ao sistema imunitário do animal, começam a desenvolver-se. Isto ocorre porque o *stress* pode provocar alterações na microflora intestinal do animal, diminuindo deste modo a resposta imunitária, aumentando a possibilidade de ocorrerem contaminações por microrganismos patogénicos (Marriott, 2006; Norrung, 2008).

Antes do abate do animal, as entidades competentes devem efectuar a inspecção *ante mortem*, de modo que se evite o abate de animais doentes ou inadequadamente limpos. No entanto, na inspecção *ante – mortem* não se consegue impedir o abate de animais em que a pele / pêlo e intestino contêm inúmeros microrganismos patogénicos, tais como *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Pearson, 1995; ICMSF, 1998; Marriott, 2006; Norrung, 2008).

No momento em que se dá a sangria, é fundamental que os equipamentos de corte e utensílios tenham sido esterilizados correctamente. Caso tal não se verifique, começa de imediato a contaminação da carcaça, uma vez que o coração do animal ainda bate entre 2 a 9 minutos depois da sangria, fazendo com que todos os microrganismos passíveis de causar contaminação atinjam toda a carcaça do animal (Norrung, 2008).

Numa área onde ocorra abate de animais, não se pode considerar apenas o momento da sangria como passível de causar contaminações nas carcaças, visto que outras situações podem provocar igualmente efeitos indesejáveis, tais como: o momento da insensibilização quando os animais contactam com o chão permitindo uma contaminação do seu pelo, o momento da esfolagem por facas não esterilizadas ou pelo contacto com as mãos e vestuário dos manipuladores (Varnan, 1995; Gracey, 1999; Norrung, 2008).

Um dos pontos críticos onde a contaminação pode ser significativa é a mesa de inspecção de vísceras, no momento da evisceração. O contacto da carne com o conteúdo

do estômago e intestino, permite a contaminação da mesma já que, por exemplo, o líquido do rúmen contém cerca de 1.3 biliões de microrganismos por mililitro (Gracey, 1999). Na etapa da refrigeração, nem todos os microrganismos conseguem resistir a temperaturas baixas, contudo, podem resistir a estas temperaturas *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Aeromonas*, *Yersinia*, *Lactobacillus*, *Moraxella* e *Pseudomonas* (Pearson, 1995; ICMSF, 1998).

Torna-se pois difícil efectuar eficazmente a higienização neste sector. O tipo de sujidade resultante do processamento, bem como os equipamentos que são utilizados, não permitem de todo, uma correcta higienização, pelo que normalmente se adopta um procedimento padrão, a aplicação de espuma (Gracey, 1999). Este procedimento permite higienizar locais de difícil acesso, pela facilidade de aplicação e alcance, e ainda, por permitir a visualização dos locais já tratados, onde a espuma actua como veículo do princípio activo do desinfectante, aumentando o tempo de contacto com a superfície a tratar (Heinz, 1991; Norrung, 2008).

Como a sujidade existente neste sector é muito diversificada, englobando sujidade orgânica e inorgânica, como por exemplo, gorduras, proteínas, amidos e incrustações minerais, a higienização poderá dar-se em duas fases distintas (Gracey, 1999; Marriott, 2006). Na primeira fase, com recurso a um detergente, toda a sujidade maior é removida, e numa segunda fase, com recurso a um desinfectante, normalmente à base de cloro, devido à facilidade de obtenção e ao facto de apresentar um espectro largo. No entanto, nem sempre é necessário efectuar a higienização em duas fases; no caso de haver pouca sujidade, recorre-se ao uso de um produto que comporte em simultâneo, o papel de desengordurante e desinfectante, o que a nível económico e industrial é mais rentável, pois permite poupar energia, água, tempo e mão-de-obra (Gracey, 1999).

A problemática do uso de produtos clorados neste sector é também conhecida, pois estes ao reagirem com a matéria orgânica, produzem quase sempre clorofenóis que transmitem sabor a desinfectante. Existe ainda outro tipo de *taint*, um sabor bolorento, associado ao uso de produtos clorados, criado aquando da produção de cloroanísóis por microrganismos, a partir dos clorofenóis resultantes da reacção dos produtos clorados com a matéria orgânica presente (Varnan, 1995; Baigrie, 2003; Marriott, 2006).

### 1.5.3.2. Sector dos Lacticínios

Neste sector, a maior preocupação é sem dúvida a matéria – prima, ou seja, o leite (Marriott, 2006). Existem vários factores que influenciam a microflora existente no leite, como, as más práticas de higiene, doenças e outras situações anormais verificadas no manuseamento dos animais (ICMSF, 1998; West, 2008).

As populações microbianas associadas a leites crus dependem das práticas higiénicas desenvolvidas aquando da ordenha e todo o equipamento e utensílios utilizados nesta (Verdier – Metz, 2009).

Por ser uma grande fonte nutricional, o leite é um excelente substrato para os microrganismos se desenvolverem, sendo notório desse modo que será estritamente necessário aplicar medidas rígidas no controlo da higiene nas indústrias de lacticínios (Marriott, 2006).

Neste tipo de sector, a preocupação com a higienização surge com as superfícies que entram em contacto com o leite. Se estas não forem adequadamente limpas não só podem contaminar os alimentos, como criam também condições óptimas de crescimento aos microrganismos, levando-os não só a uma multiplicação mas também à sua permanência no equipamento, o que por sua vez aumenta os riscos de contaminação (Little, 2008).

Dada a impossibilidade de tratar termicamente o leite, pelo método da pasteurização, nos momentos após a ordenha, este, deve ser refrigerado. No entanto, na etapa da refrigeração pode dar-se o desenvolvimento de certos microrganismos capazes de sobreviver a temperaturas baixas, os chamados psicotróficos, como é o caso dos *Micrococcus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (ICMSF, 1998; Marriott, 2006).

De um modo geral, durante o processamento do queijo, as causas de contaminação mais frequentes que aparecem na literatura, são atribuídas à presença de *Listeria monocytogenes* (Marriott, 2006). No entanto, West (2008) defende a ideia de que para os queijos que provêm de leites crus, os problemas são normalmente associados a microrganismos como a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Brucella melitensis* e *Staphylococcus aureus*. Little (2008) referiu que o queijo também pode sofrer contaminação por microrganismos existentes no ambiente da zona de produção.

Os queijos produzidos a partir de leites cru normalmente, tendem a apresentar uma qualidade insatisfatória, quando não sujeitos a um período de cura, ou quando este demora mais tempo que o definido pelos produtores (Little, 2008).

Neste sector, a limpeza passa pela remoção de depósitos de proteínas precipitadas, “pedra do leite” e produtos de decomposição do leite. Os resíduos mais

característicos do leite, englobam a lactose, gorduras, proteínas e sais minerais (Costa, 1994; Manual de Higiene na Agro Alimentar, 2003).

A lactose é facilmente solúvel em água, o que facilita a sua remoção, verificando-se o contrário quando este dissacarídeo carameliza, o que dificulta a sua remoção nas superfícies e nos equipamentos (Baptista, 2003).

No caso dos resíduos de gordura, a remoção é efectuada com recurso a soluções alcalinas, com temperaturas pouco elevadas, de forma a evitar a polimerização das gorduras, processo que dificulta a remoção deste tipo de sujidade (Baptista, 2003).

As proteínas, tal como as gorduras, são mais sensíveis na presença de soluções alcalinas. Também neste tipo de sujidade, a temperatura desempenha um papel importante, devendo ser criteriosamente controlada, de modo a evitar a desnaturação das proteínas, comprometendo assim a sua eliminação das superfícies (Manual de Higienização na Industria Alimentar).

Os sais minerais e a chamada “pedra do leite”, resultante da dureza da água e dos minerais presentes na solução, quando presentes nas superfícies de contacto com o leite, são geralmente removidos com recurso a soluções ácidas, de preferência, com a ajuda de agentes sequestrantes, que ajudam a manter os iões cálcio e magnésio em solução, facilitando o processo de higienização (Costa, 1994).

Para melhorar a eficácia dos procedimentos de limpeza e desinfecção, neste sector, geralmente recorre-se aos sistemas CIP (“*Cleaning in Place*”) (Velloso, 2002). Como referido anteriormente, o sistema CIP é um processo de limpeza e desinfecção de equipamentos, em circuito fechado e automático, sem que seja necessário remover ou desmontar os equipamentos, com um mínimo envolvimento dos operadores (Costa, 1994; Little, 2008). Este processo permite um controlo eficiente do fluxo, concentração, temperatura e tempo de contacto das soluções circuladas, tornando o processo mais económico, já que diminui o tempo gasto e a quantidade de água utilizada, o que a nível económico se torna mais rentável para as empresas que operam neste sector (Little, 2008). A limitação deste procedimento é a acumulação de microrganismos na superfície de contacto do equipamento, resultando na formação dos indesejáveis biofilmes, o que pode contribuir para a perecibilidade do produto (Costa, 1994).

### 1.5.3.3. Sector dos Vinhos

O vinho é afectado por uma grande variedade de microrganismos, entre os quais, as leveduras, bolores e bactérias. Há, no entanto, autores que defendem a ideia de que devido ao teor alcoólico, baixo pH e à presença de dióxido de enxofre, o vinho se encontra de alguma forma protegido contra problemas que advêm directamente da falta de higiene (Marriott, 2006).

A limpeza e desinfecção são, no entanto, fundamentais ao longo de todo o processo produtivo, uma vez que conseguem atenuar a proliferação de microrganismos responsáveis pela perda de características organolépticas no vinho, uma vez que este produto é muito susceptível a *off flavours* provenientes directamente da má higienização (Chatonnet, 1992;Marriott, 2006).

As características organolépticas do vinho podem ser afectadas por diferentes factores, ao longo de todo o processo, desde a vinha, a vindima, o engarrafamento e todos os equipamentos que possam entrar em contacto com o vinho, alterando a sua qualidade (Marriott, 2006).

No momento da vindima, as infecções mais comuns podem ocorrer devido à actividade de fungos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium*, enquanto mais tarde, no armazenamento do mosto pode dar-se a proliferação de leveduras dos géneros *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Torulopsis* e *Zygosaccharomyces* (Christaki, 2002).

As leveduras que participam no processo de fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Pichia*, *Hansenula* e *Brettanomyces*), além dos efeitos benéficos, podem constituir um risco de deterioração em termos organolépticos, mais concretamente ao nível dos *off – flavours* fenólicos (Baigrie, 2003).

A *Brettanomyces/ Dekkera spp.* é um microrganismo de deterioração potente no vinho, sendo que estas leveduras produzem altas concentrações de ácidos voláteis e compostos fenólicos. A partir do momento em que esta levedura prolifera nas adegas, torna-se muito difícil a sua eliminação. As leveduras do género *Dekkera / Brettanomyces* são conhecidas por estarem envolvidas na produção de fenóis voláteis (4-etilfenol e 4-ethylguaiacol) em vinhos, responsáveis pela transmissão de aromas indesejados, como “suor de cavalo” e “couro”. Esta transformação dos ácidos hidroxicinâmicos, ácidos p-cumárico e ferúlico, em fenóis volatéis, é associada à actividade das leveduras do género *Brettanomyces* e da sua forma sexual (ascósporos), classificada dentro das *Dekkera* (Christaki, 2002).

Um passo que não se pode ignorar, no que diz respeito a microrganismos, é o passo da maturação, no qual o vinho pode ser afectado por leveduras de géneros *Candida*, *Pichia*, *Brettanomyces*, *Dekkera* e bactérias do género *Acetobacter*, devido ao mau acondicionamento dos barris e às quantidades de oxigénio existentes dentro dos mesmos (Christaki, 2002).

Devido a todos os aspectos mencionados anteriormente, torna-se de uma importância extrema que o plano de higienização e respectiva desinfeção dos diversos equipamentos/instalações, que possam colocar em risco a qualidade do vinho, bem como a higiene pessoal dos colaboradores intervenientes no processo de produção, seja o mais adequado possível (McDonnell, 1999).

Nesta área, os desinfectantes mais usados têm ácido peracético como princípio activo. Este facto deve-se ao largo espectro de acção, facilidade de utilização e de enxaguamento, boa actividade fungicida e bactericida mesmo em concentrações baixas, pois a sua decomposição origina ácido acético e oxigénio (Schroder, 1984).

Os compostos halogenados são utilizados há mais tempo, por terem um largo espectro de acção, apresentando como desvantagem o facto de serem corrosivos em meio ácido e inactivados pelas proteínas (Navarre, 1997). Um dos problemas que surge em consequência do uso de produtos clorados, neste sector, prende-se com o facto de estes poderem contaminar as rolhas (Pereira, 2004).

As rolhas de cortiça, vedantes das garrafas de vinho, como se tratam de um produto natural, podem sofrer contaminações (Teixeira, 2005). A sua produção, principalmente a desinfeção e o branqueamento, recorre ao uso de produtos clorados, podendo originar compostos clorofenólicos através de reacções com uma fonte do fenol que provém da cortiça (Pereira, 2004).

Posteriormente, os compostos clorofenólicos, por acção de fungos, podem ser transformados em cloroanisóis, por exemplo o 2,4,6 tricloroanisol, que exerce um efeito nefasto sobre as características organolépticas do vinho, sendo associado ao “gosto a rolha” de alguns vinhos (Chatonnet, 1992; Teixeira, 2005).

## **1.6. Microrganismos associados a contaminações ou deteriorações na Indústria Agro - Alimentar**

Os alimentos são excelentes substratos para o crescimento de microrganismos, sendo os hidratos de carbono, os principais factores de proliferação de microrganismos.

Esta proliferação pode ocorrer mesmo quando os alimentos são mantidos a uma temperatura de 7 - 8°C (Velloso, 2002).

### ❖ **Microrganismos de Deterioração**

Durante a colheita, o processamento e a manipulação dos alimentos, podem ocorrer contaminações por acção dos microrganismos. Consequentemente, durante a distribuição e o armazenamento, as condições tornam-se propícias ao desenvolvimento de microrganismos específicos, responsáveis pela deterioração dos alimentos. Os microrganismos que se desenvolvem podem variar de alimento para alimento dependendo das características intrínsecas e extrínsecas de cada alimento (Forsythe, 2002).

- *Pseudomonas spp.*

São os psicotróficos mais importantes associados à deterioração, conseguindo proliferar rapidamente a temperaturas de refrigeração, dominando com muita frequência a flora microbiana. Estes microrganismos são comuns no ambiente, particularmente água, e proliferam em superfícies inadequadamente limpas (Forsythe, 2002).

- Bactérias ácido - lácticas

Os microrganismos produtores de ácido láctico, mais precisamente os *Streptococcus spp*, *Lactobacillus spp*, *Lactococcus spp* e *Leuconostoc spp*, produzem ácido, através da fermentação da lactose, que leva a alterações significativas na qualidade do leite (Costa, 1994). No entanto, se as temperaturas e condições de refrigeração forem respeitadas, consegue-se evitar o crescimento destas bactérias pelo menos durante 72 horas (Germano, 2001).

### ▼ **Microrganismos Patogénicos**

Os microrganismos patogénicos são todos aqueles que têm grande potencial para causar doenças (Forsythe, 2002). As bactérias patogénicas podem causar doenças por infecção do organismo e por intoxicação (produção de toxinas). No primeiro caso é necessário ingerir microrganismos viáveis. Na intoxicação não é necessária a presença

de células viáveis, apenas da toxina produzida por estas (Germano, 2001; Forsythe, 2002). Os patogénicos mais importantes na indústria alimentar, são:

- *Salmonella*

As ocorrências de *Salmonella* têm sido atribuídas ao consumo de leite cru, leite pasteurizado, queijos, leite em pó reconstituído e ovos. Se for detectada no ambiente de produção, em quantidades significativas é estritamente necessário proceder a uma operação de limpeza e melhoria no controlo, bastando para isso usar temperaturas de 60°C, durante 15 - 20 minutos, pois como não formam esporos, são menos resistentes ao aumento da temperatura (Forsythe, 2002; Velloso, 2002). Temperaturas inferiores a 5°C evitam o crescimento deste microrganismo nos alimentos (Forsythe, 2002).

- *Listeria monocytogenes*

Este microrganismo pode ser encontrado em diversos ambientes onde se processam alimentos, tendo já sido isolada de pavimentos, bancadas e ambientes refrigerados. As superfícies húmidas dos equipamentos podem “proteger” o microrganismo, facto que aliado à capacidade de multiplicação a baixas temperaturas, possibilita a sua ocorrência em refrigeradores e câmaras frias (Germano, 2001; Forsythe, 2002; Antunes, 2008; Lourenço, 2009).

- *Escherichia coli*

Existem duas classes deste microrganismo: as enteropatogénicas e as enterotoxigénicas. Em termos microbiológicos, as análises relativas à presença ou ausência de *E. coli*, são efectuadas para se ter uma ideia de contaminação fecal recente e/ou práticas de higiene ineficientes. A sua presença está sempre associada a contaminação fecal (Germano, 2001; Forsythe, 2002).

- *Bacillus cereus*

É uma bactéria formadora de esporos, que pode ser encontrada em alimentos não pasteurizados. O esporo resiste à pasteurização, conduzindo por vezes à deterioração dos produtos lácteos (Germano, 2001).

- *Clostridium perfringens*

A *C. perfringens* é uma bactéria formadora de esporos, que consegue igualmente resistir à pasteurização. Estes microrganismos surgem com mais facilidade em alimentos com um teor elevado de humidade e com altas percentagens proteicas (Germano, 2001; Forsythe, 2002).

- *Clostridium botulinum*

As células vegetativas da *C. botulinum* são rapidamente destruídas pela temperatura de pasteurização. As toxinas produzidas por estes microrganismos são termolábeis e, portanto, facilmente inactivadas pelo tratamento térmico. A contaminação dos alimentos por este microrganismo surge na literatura relacionada com a água usada no processo de higienização e nas conservas (Velloso, 2002).

## **1.7. O Papel da Higienização no Sistema HACCP**

Um programa de higienização criteriosamente elaborado, juntamente com o cumprimento de Boas Práticas de Produção e Fabrico têm uma contribuição fundamental para a segurança alimentar dos géneros alimentares produzidos (Baptista, 2003).

As Boas Práticas de Produção e Fabrico constituem um pré – requisito, entre outros, para a implementação de sistemas de autocontrolo como o sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*). O sistema HACCP é uma ferramenta da gestão da segurança alimentar que se caracteriza pela prevenção dos perigos no decorrer do processamento de alimentos e não pelo controlo do produto final (Antunes, 2008).

A higienização torna-se portanto necessária ao sistema HACCP, pois incorpora o seu intuito correctivo e preventivo, de forma a evitar contaminações, entre, e nos diversos produtos alimentares. Para tal, recorre-se normalmente ao plano de higienização, plano este que define não só os procedimentos a efectuar, mas também a sua periodicidade, áreas de aplicação, produtos e respectivos parâmetros de utilização (tempo, concentração, material de limpeza, etc), sendo este da responsabilidade dos colaboradores encarregues da higienização (Baptista, 2003; Antunes, 2008).

A colocação em prática do plano de higiene, ajuda a diminuir a incidência e os danos provocados por perigos físicos, químicos e biológicos tendo em conta que equipamentos/utensílios, instalações e os colaboradores, constituem fontes de contaminação (Antunes, 2008).

## **1.8. Monitorização das Actividades de Limpeza e Desinfecção**

Para que se consiga efectuar um programa de higienização com sucesso, é de extrema importância compreender a natureza da sujidade que vai ser removida, saber escolher o método mais adequado para a remoção, assim como o método mais indicado para avaliar a eficácia do processo (Manual de Higienização na Indústria Alimentar, 2003).

Um plano de higienização depois de implementado e executado necessita de validação, sendo necessário monitorizá-lo de forma a garantir a sua eficácia e a inexistência de resíduos (físicos ou bacteriológicos) nos locais tratados depois da higienização (Marriott, 2006; Antunes, 2008).

A monitorização ou vigilância das operações de limpeza e desinfecção consiste na comprovação de que tais operações foram realizadas correctamente e de que as instalações foram deixadas suficientemente limpas (física e bacteriologicamente), de modo a prevenir possíveis contaminações cruzadas. A monitorização permitirá a detecção de más práticas na realização destas operações, assim como possíveis focos de contaminação microbiológica (Baptista, 2003).

Desta forma, um programa de monitorização deve supervisionar periodicamente o programa de higienização, de forma a verificar a sua eficácia. Para tal é conveniente que o programa de monitorização inclua:

- 1) Inspeção e/ou análise visual, antes do início do arranque dos processos. Embora não sendo um método completamente fiável, pode possibilitar a detecção de falhas ao nível da higienização, que potencialmente podem comprometer a segurança alimentar. A identificação de uma superfície suja aponta de imediato uma falha que pode ser corrigida e a realização deste passo de forma sistemática permitirá às empresas identificar os equipamentos e áreas relativamente às quais o plano de higiene apresenta pontos fracos, facilitando deste modo o desencadear de acções correctivas. A verificação da fiabilidade desta metodologia deve ser realizada através de análises microbiológicas, onde a fiabilidade dos resultados obtidos tem um nível superior (Baptista, 2003).
- 2) Análises microbiológicas de superfícies em contacto com os alimentos - existem várias técnicas de análises microbiológicas, que permitem avaliar os níveis de contaminação microbiológica em superfícies, bem como a eficiência da

higienização. Entre elas, destacam – se a inoculação por contacto, a utilização de zaragatoas e a bioluminescência (Kessler, 1981; Baptista, 2003; Antunes, 2008).

A inoculação por contacto, utilizando placas de contacto do tipo RODAC (Replicate Organism Direct Agar Contact) é considerada uma técnica económica, rápida e eficaz para a monitorização das operações de limpeza e desinfecção. Nesta técnica, realiza-se uma impressão directa do meio de cultura com a superfície a analisar, com o qual se recolhe uma parte dos microrganismos presentes na superfície. Em função do tipo de microrganismos, os meios de cultura utilizados devem ser diferentes (Baptista, 2003).

A utilização de zaragatoas é a técnica mais usada. Consiste em mergulhar a extremidade da zaragatoa, num tubo com água ou com uma solução de diluição estéril, retira-se e esfrega-se na superfície que se pretende analisar. A zaragatoa é colocada novamente no tubo e agita-se, de forma que os microrganismos passem para o líquido. Posteriormente, procede-se à sementeira dos microrganismos, em meios de cultura selectivos ou diferenciais, para investigar quais os tipos de microrganismos presentes nas superfícies (Kessler, 1981; Klingeren, 1998).

Apesar da elevada fiabilidade das análises microbiológicas, estes métodos são mais lentos e não permitem identificar os problemas a tempo de corrigi-los, de forma a evitar contaminações resultantes de deficiente higienização. Para contornar este facto, é usada a bioluminescência. A bioluminescência tem sido a técnica com mais aceitação por parte dos clientes, apesar de ser uma técnica mais dispendiosa. Este método baseia-se na detecção da presença de ATP (adenosina trifosfato) na superfície a testar. O ATP existe em todas as células, vivas ou mortas, pelo que o brilho da luz é proporcional à quantidade de matéria orgânica e de bactérias presentes na superfície a testar. Deste modo, é possível obter uma indicação do nível de sujidade orgânica presente, pelo que este método constitui uma ferramenta muito útil para verificar os níveis de higiene e a eficácia das actividades de higienização (Baptista, 2003; Antunes, 2008).

As análises microbiológicas de superfícies devem ser efectuadas no final da desinfecção, para detectar a possível presença de microrganismos totais (Antunes, 2008).

- 3) Análises microbiológicas do ambiente de produção - permitem avaliar o grau de contaminação do ar ambiente dentro de uma instalação. Este tipo de análises é particularmente útil para avaliar a adequabilidade e a eficácia dos programas de

higienização na componente relacionada com as instalações. Para este tipo de análise, existem algumas técnicas, tais como a filtração do ar e de sedimentação (Holah 1998; Holah, 2000; Baptista, 2003).

- 4) Análises físico – químicas das soluções: a maior parte dos produtos de limpeza e desinfecção tem carácter ácido ou alcalino, pelo que a medição do pH é o método mais expedito para avaliar a existência de alguma alteração nas características destes. Apresenta a limitação de ser pouco preciso, não avaliar individualmente a concentração de cada um dos agentes activos presentes no desinfectante (Baptista, 2003).

- **Testes para Avaliar a Eficácia de Desinfectantes**

A avaliação da eficácia de desinfectantes, é um tema que vem sendo estudado há largos anos. Nesse sentido, os testes mais padronizados e predominantes, são os chamados testes de suspensão que permitem avaliar de forma quantitativa a actividade microbida dos desinfectantes em organismos teste. No entanto, os resultados dos testes de suspensão podem ser um mau indicador para a eficácia de um desinfectante, sob circunstâncias práticas, especialmente em relação a bactérias com grande adesão a superfícies (Klingeren, 1998).

Tal como foi referido por Reybrouck, um desinfectante deve ser testado em várias etapas. Esta ideia também é defendida pelo Comité Europeu de Normalização (CEN / TC 216). Este comité, distingue, respectivamente os chamados testes de fase 1, ou seja, testes de suspensão preliminares para verificar se um produto merece ser qualificado ou não como desinfectante, testes de fase 2 relativos a uma suspensão sob uma variedade de condições de teste (passo 1) e testes em superfícies que simulam condições práticas (passo 2) e, finalmente, os testes de fase 3, que medem o desempenho de um produto, em condições reais de utilização (Klingeren, 1998).

O principal objectivo dos testes de superfície é obter informação quantitativa da eficácia (potencial para inibir/matar) dos desinfectantes sobre os microrganismos associados a superfícies duras, tendo em conta que a informação sobre a morte dos microrganismos obtida nos testes de suspensão, geralmente realizados antes dos testes de superfície (Klingeren, 1998).

Na maioria dos métodos, o desinfectante é espalhado sobre as superfícies inoculadas e secas utilizando uma pipeta. Depois da actuação do desinfectante, faz-se

uma colheita de uma amostra da superfície, com uma zaragatoa, para quantificação dos efectivos microbianos (Klingeren, 1998).

Neste trabalho, pretende-se avaliar a eficácia de um desinfectante produzido pela empresa Mistolin, para uso na indústria Agro – Alimentar.

## **1.9. Normas e Legislação relativas a Higienização e Alimentos**

Os produtos destinados à higienização da indústria alimentar, não estão abrangidos por nenhum regulamento específico nem por nenhuma aprovação especial, tendo de obedecer unicamente às normas gerais para os detergentes e biocidas. É, contudo obrigatório registar os produtos químicos na Direcção Geral de Saúde (DGS), caso tenham na sua composição biocidas. Os produtos biocidas são substâncias activas e preparações que contenham uma ou mais substâncias activas, apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador, que se destinam por mecanismos químicos ou biológicos, a destruir, travar o crescimento, tornar inofensivo, evitar ou controlar de qualquer outra forma a acção de um organismo prejudicial, e que se incluam num dos 23 tipos de produtos que constam da lista exaustiva do Anexo V.

A directiva nº 98 / 8 / CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Fevereiro de 1998, relativa à colocação no mercado de produtos biocidas, foi transposta para a legislação portuguesa pelo Decreto – Lei nº 112 /2010, de 10 de Outubro de 2010, que regula os pesticidas de uso no homem, animais, uso industrial, preservadores da madeira e outros biocidas (Codinfor, 2008). Os requisitos gerais e específicos aplicáveis às instalações do sector alimentar e aos locais em que os géneros alimentícios são preparados, tratados ou transformados, respectivamente, estão dispostos nos capítulos I e II do Anexo II do Regulamento (CE) nº 852 / 2004 de 29 de Abril.

“De acordo com as boas práticas de higiene, as instalações, utensílios, aparelhos e equipamentos devem ser sujeitos a operações de lavagem e, se necessário, de desinfecção de forma a garantir a segurança dos alimentos (Nota informativa no site da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica – ASAE ([www.asae.pt](http://www.asae.pt), consultado dia 14 de Outubro).

A portaria nº 149/88, de 9 de Março:

- Fixa as regras de asseio e higiene a observar na manipulação de alimentos e determina a abolição do boletim de sanidade.
- Aplica-se a todos aqueles que, pela sua actividade profissional, entram em contacto com os alimentos, isto é, ao pessoal empregado na preparação e embalagem de produtos alimentares, na distribuição e estabelecimentos onde se confeccionem e servem refeições ao público em geral ou a colectividades, bem como aos responsáveis pelos referidos estabelecimentos (Antunes, 2008).

## **2. Procedimento Experimental**

## **2.1. Locais de Colheita**

Neste estudo, foram usadas amostras de superfícies de três empresas classificadas em diferentes sectores da Indústria Agro – Alimentar, Sector dos Vinhos (Adega), Sector dos Lacticínios (Queijaria) e Sector das Carnes (Matadouro).

Antes das colheitas, foi efectuado um levantamento prévio dos pontos críticos nas três empresas, bem como das instalações e quantidades de produto necessário para efectuar o teste.

## **2.2. Plano de Amostragem**

Neste trabalho, as recolhas foram efectuadas em conformidade com os testes de fase 3, em que o desempenho do produto é avaliado em condições reais de utilização. As colheitas das amostras das superfícies nas três empresas, decorreram no final da produção, em três condições diferentes de higienização, ou seja, sem desinfecção, desinfecção efectuada com desinfectante da Mistolin e desinfecção com um desinfectante de uma marca concorrente.

## **2.3. Colheita de Amostras de Superfícies**

As amostras foram retiradas de superfícies em aço inoxidável, numa área previamente definida (aproximadamente 5 cm<sup>2</sup>), com recurso a uma zaragatoa de algodão esterilizada (REF: Zaragatoa estéril e tubo com água peptonada e neutralizante). Depois de efectuada a recolha, a zaragatoa foi mergulhada no líquido de transporte (3 mL de água peptonada com 10% de uma solução neutralizante, para garantir a preservação dos microrganismos) e transportada para o laboratório, em mala térmica a 4°C. Em cada data de colheita foram colhidas três amostras para cada condição (sem desinfecção, desinfectante Mistolin e desinfectante concorrência) em cada uma das empresas. Foram realizadas cinco colheitas em datas diferentes em cada empresa.

### **2.3.1. Colheita de Amostras no Sector das Carnes**

Na figura 3, está representada uma mesa de vísceras horizontal. No Matadouro, o desinfetante foi aplicado com recurso a um equipamento de projecção de espuma e o princípio activo do desinfetante utilizado foi o cloro. O desinfetante foi aplicado com uma diluição de 3% em água, com um tempo de actuação de 15 minutos.

NOTA: especificamente neste sector, foram comparadas duas formulações diferentes da Mistolin (a fórmula existente antes do inicio do estágio e a fórmula desenvolvida durante o estágio), face ao desinfetante fabricado pela concorrência.

A fórmula inicial apresenta uma espuma pouco compacta e o produto não apresenta a estabilidade desejada. De todas as formas, este produto será igualmente testado para avaliar o seu desempenho a nível microbiológico.



Figura 3 – Mesa de Vísceras Horizontal - Matadouro

### 2.3.2. Colheita de Amostras no Sector dos Lacticínios

Na queijaria, os pontos de colheita foram o tanque do leite, os cinchos e as francelas (Figura 4). O desinfetante foi aplicado com recurso a um equipamento de projecção de espuma. O princípio activo do desinfetante utilizado foi o cloro. O desinfetante foi aplicado com uma diluição de 3%\* em água, com um tempo de actuação de 15 minutos.



Ilustração 4 - Pontos de Colheita da Queijaria

### 2.3.3. Colheita de Amostras no Sector dos Vinhos

Na adega, as colheitas foram efectuadas nos depósitos do vinho tinto, depósitos do vinho branco e na linha de enchimento (Figura 5). Neste caso, o desinfectante foi aplicado através do Sistema CIP (“*Cleaning in Place*”). O princípio activo do desinfectante utilizado foi o ácido peracético. O desinfectante foi aplicado com uma diluição de 0,5%\* em água, com um tempo de actuação de 15 minutos.



Figura 5 - Pontos de colheita da adega

## 2.4. Análises Microbiológicas do Ambiente de Produção

Para quantificar o número de microrganismos presentes no ambiente de produção, utilizou-se o método de Sedimentação. De acordo com este método, em cada local de colheita foram expostas caixas de petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) ao ar, durante uma hora, para se proceder ao controlo da qualidade microbiológica do ar, com base na contagem dos microrganismos acumulados na superfície do meio de cultura. Estas placas foram igualmente transportadas para o laboratório em condições de refrigeração.

## 2.5. Análises Microbiológicas das Amostras de Água

Para a colheita de amostras de água, utilizou-se um frasco esterilizado. A amostra foi transportada para o laboratório numa mala térmica. As amostras foram semeadas por incorporação em meio PCA. Foi semeada a amostra inicial e a amostra diluída 10 vezes. Para cada diluição foram semeadas 2 réplicas. As placas de petri foram incubadas a 30°C, durante 72 horas. Foi determinado o número de colónias nas placas

correspondentes à diluição que apresentava entre 30 e 300 colónias por placa e os resultados foram expressos em UFC mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colónias mL<sup>-1</sup>).

No caso das águas tratadas com cloro, foram adicionados cristais de tiosulfato de sódio, com uma concentração de 2%, com o objectivo de neutralizar vestígios residuais de cloro, o qual poderia causar a morte das bactérias que eventualmente possam estar presentes na água.

## **2.6. Determinação do Teor de Microrganismos Mesófilos Aeróbios**

As amostras foram semeadas por incorporação em meio PCA. Foi semeada a amostra inicial e a amostra diluída 10 vezes. Para cada diluição foram semeadas 2 réplicas. As placas de petri foram incubadas a 30°C, durante 72 horas. Foi determinado o número de colónias nas placas correspondentes à diluição que apresentava entre 30 e 300 colónias por placa e os resultados foram expressos em UFC cm<sup>-2</sup> (unidades formadoras de colónias cm<sup>-2</sup>).

## **2.7. Análises Físico – Químicas dos Desinfectantes**

Para o consumidor não importa apenas o facto de o desinfectante ser eficaz ou não. É igualmente importante garantir que o produto não deixa resíduos químicos nas superfícies. Os resíduos químicos resultam principalmente de um enxaguamento incorrecto, o que poderá conduzir a contaminações em posteriores processamentos de alimentos ou levar os microrganismos remanescentes a tornar-se tolerantes ao agente desinfectante em questão.

Para avaliar a presença de resíduos químicos nas superfícies, utilizaram-se as tiras indicadoras de pH. No caso dos desinfectantes alcalinos, adicionaram-se algumas gotas de fenolftaleína. Este indicador na presença de ácidos fica incolor, ao passo que na presença de bases, apresenta uma tonalidade rosa. Deste modo, conseguimos concluir se o produto foi removido na totalidade e se o enxaguamento foi correctamente efectuado, não deixando resíduos nas superfícies.

NOTA: foram feitos alguns ensaios com concentrações de produto superiores à aconselhada pelo fabricante. Este tipo de ensaio ajuda a perceber até que valor a fenolftaleína apresenta sensibilidade de detecção.



## **3. Resultados**

### **3.1. Teor de Microrganismos Mesófilos Aeróbios**

Nas primeiras recolhas efectuadas no Matadouro (tabela 3), em relação aos controlos, o número de UFC obtido varia entre 226-273 e 203-249, para a mesa de vísceras horizontal e vertical, respectivamente. Na mesa de vísceras horizontal, após a

desinfecção com o produto da Mistolin, o número de UFC obtido varia entre 65 e 86 UFC, enquanto no caso da concorrência varia entre 16 e 18. Na mesa vertical, os valores são ligeiramente superiores, variando no caso da Mistolin entre 107-114 e no caso da marca concorrente entre 27 e 29 UFC cm<sup>-2</sup>.

**Tabela 3 - Valores das colheitas efectuadas no matadouro, comparando a formulação inicial do desinfectante da Mistolin com o desinfectante da marca concorrente.**

Recolha	Ponto de Recolha	Controlos	UFC/cm <sup>2</sup>	
		Sem Desinfecção	Desinfectante Mistolin	Desinfectante Concorrência
09.12.2010	MV Horizontal	273 ± 3	86 ± 2	18 ± 1
	MV Vertical	249 ± 2	114 ± 3	27 ± 2
13.01.2011	MV Horizontal	226 ± 2	65 ± 1	16 ± 2
	MV Vertical	203 ± 2	107 ± 3	29 ± 2

MV Horizontal – Mesa de Vísceras Horizontal, MV Vertical – Mesa de Vísceras Vertical

Na tabela 4 estão descritos todos os valores relativos às colheitas efectuadas no matadouro, comparando a nova formulação do desinfectante da Mistolin e o produto da marca concorrente.

Nos cinco controlos efectuados na mesa de vísceras horizontal, o número de UFC cm<sup>-2</sup> varia entre 196 e 227. Em relação aos controlos realizados na mesa vertical, os valores variam entre as 174 e as 215 UFC. Os valores mínimos para os controlos foram obtidos na segunda recolha enquanto os valores máximos foram obtidos na quinta recolha, isto para ambos os pontos de recolha.

No caso da mesa de vísceras horizontal, o número de UFC resultante da desinfecção com o produto da Mistolin varia entre 6 e 11, enquanto para a concorrência varia entre 8 e 16. Na mesa de vísceras vertical, o número de UFC varia entre 8-14 e 10-21.1, após aplicação do desinfectante da Mistolin e da concorrência, respectivamente.

**Tabela 4 - Valores das colheitas efectuadas no matadouro, comparando a nova formulação do desinfectante da Mistolin com o desinfectante da marca concorrente.**

Data da Recolha	Ponto de Recolha	Controlos	UFC/cm <sup>2</sup>	
		Sem Desinfecção	Desinfectante 2 Mistolin	Desinfectante Concorrência
24.02.2011	MV Horizontal	203 ± 3	6 ± 2	8 ± 1
	MV Vertical	183 ± 2	8 ± 1	12 ± 1
16.03.2011	MV Horizontal	196 ± 2	6 ± 1	8 ± 1
	MV Vertical	174 ± 2	6,9 ± 0,2	13 ± 2
12.05.2011	MV Horizontal	217 ± 3	7 ± 0,2	10 ± 2
	MV Vertical	206 ± 2	10 ± 1	14,7 ± 0,3
20.07.2011	MV Horizontal	200 ± 2	6 ± 0,3	11 ± 1

	MV Vertical	190 ± 2	8,3 ± 0,2	13,2 ± 1
22.09.2011	MV Horizontal	227 ± 3	11 ± 1	16 ± 0,3
	MV Vertical	215 ± 4	14 ± 1	21,1 ± 1

Analisando todos os valores obtidos na Queijaria (tabela 5), verifica-se que de recolha para recolha, tanto nos controlos como depois da desinfecção, os pontos de recolha onde a carga microbiana é superior são os cinchos, seguidos do tanque do leite, e por fim, as francelas. Neste aspecto, os controlos apresentam uma variação entre 168 e 201 UFC nos cinchos, 156 e 184 UFC no tanque do leite e 143 – 178 UFC nas francelas. A recolha que apresenta valores mais baixos em todos os pontos de colheita é a 2ª recolha (02.12.2010), ao contrário da 4ª recolha, onde foram obtidos os valores mais elevados de UFC. Após a desinfecção com o produto da Mistolin, os valores de UFC variam entre 6-10 para o tanque de leite, 12-16 para os cinchos e 4-8 para as francelas. No caso da marca concorrente, o número de UFC obtido varia entre 9 – 12,4, 13,5 – 18 e 6,2 – 11, para o tanque do leite, cinchos e francelas, respectivamente.

Tabela 5 - Valores das colheitas efectuadas na queijaria

Data da Recolha	Ponto de Recolha	Controlos	UFC cm <sup>2</sup>	
		Sem Desinfecção	Desinfetante Mistolin	Desinfetante Concorrência
25.11.2010	Tanque do Leite	176 ± 6	7 ± 0,5	10,7 ± 0,2
	Cinchos	190 ± 2	12,8 ± 0,5	14,5 ± 0,5
	Francelas	165 ± 3	5,5 ± 0,3	7,5 ± 0,3
02.12.2010	Tanque do Leite	156 ± 3	10 ± 0,5	12 ± 0,3
	Cinchos	168 ± 3	16 ± 0,5	18 ± 0,5
	Francelas	143 ± 4	5 ± 1	8 ± 1
17.02.2011	Tanque do Leite	172 ± 2	9 ± 1	12,4 ± 1
	Cinchos	174,4 ± 0,7	13,4 ± 0,2	15,6 ± 0,2
	Francelas	154,6 ± 0,5	7,3 ± 0,3	9 ± 1
14.07.2011	Tanque do Leite	184 ± 3	8,5 ± 0,3	10,5 ± 0,2
	Cinchos	201 ± 2	15 ± 0,5	17,3 ± 0,5
	Francelas	178 ± 4	8 ± 1	11 ± 1
06.10.2011	Tanque do Leite	167 ± 2	6 ± 0,2	9 ± 1
	Cinchos	187 ± 1	12 ± 1	13,5 ± 0,3
	Francelas	158 ± 2	4 ± 0,2	6,2 ± 0,3

Os controlos das colheitas efectuadas na Adega indicam que o ponto com maior carga microbiana é a linha de enchimento, seguido do depósito de vinho tinto e por último, o depósito do vinho branco. Nas cinco recolhas efectuadas em datas diferentes,

os valores das UFC cm<sup>-2</sup> obtidas variam entre 210-242, 191-234 e 178-211, na linha de enchimento, depósito do vinho tinto e depósito do vinho branco, respectivamente.

Depois da desinfecção com o produto da Mistolin, os valores obtidos para os depósitos variam entre 3-11 e 1-6 UFC cm<sup>-2</sup>, para o vinho tinto e branco, respectivamente, enquanto no caso da linha de enchimento variam entre 18 e 23 UFC cm<sup>-2</sup>. No caso da concorrência, os valores obtidos após a aplicação do desinfectante foram superiores aos obtidos pela Mistolin. Nestas condições, o número de UFC cm<sup>-2</sup> varia entre 7-16, 3-8 e 19-29, para o depósito do tinto, depósito do branco e linha de enchimento, respectivamente. A tabela 6 é referente a todos os valores das recolhas realizadas na Adega.

Tabela 6 - Valores das colheitas efectuadas na adega

Data da Recolha	Ponto de Colheita	UFC cm <sup>-2</sup>		
		Sem Higiene	Mistolin	Concorrência
24.08.2011	Depósito Tinto	191 ± 3	3 ± 0,3	7 ± 0,5
	Depósito Branco	178 ± 2	1 ± 0,2	3 ± 0,3
	Linha de Enchimento	225 ± 6	18 ± 1	21 ± 2
26.08.2011	Depósito Tinto	226 ± 2	7,4 ± 0,3	13 ± 0,5
	Depósito Branco	190 ± 1	2 ± 0,3	6 ± 0,3
	Linha de Enchimento	210 ± 2	16 ± 1	19 ± 1
07.09.2011	Depósito Tinto	210 ± 3	5,6 ± 1,2	9,7 ± 0,5
	Depósito Branco	206 ± 6	3,5 ± 0,8	5,6 ± 1
	Linha de Enchimento	228 ± 7	21 ± 0,3	25,5 ± 0,2
15.09.2011	Depósito Tinto	234 ± 4	11 ± 1	16 ± 2
	Depósito Branco	211 ± 4	6 ± 0,3	8 ± 2
	Linha de Enchimento	242 ± 5	23 ± 1	29 ± 0,3
20.10.2011	Depósito Tinto	218 ± 3	8 ± 0,3	14 ± 1
	Depósito Branco	189 ± 3	1,5 ± 0,2	4 ± 0,3
	Linha de Enchimento	233 ± 2	19 ± 2	24 ± 1

### 3.2. Microrganismos presentes no Ambiente de Produção

Os microrganismos presentes no ambiente de produção da queijaria estão descritos na tabela 7. No dia 06.10.2011., foram registados os maiores valores de microrganismos, tendo sido obtido o mesmo número de bactérias e bolores, ou seja, cinco. Pelo contrário, no dia 17.02.2011, foram obtidos 2 bolores e uma bactéria.

Tabela 7 - Microrganismos presentes no ambiente de produção da queijaria

Data da Recolha	Microrganismos		
	Bolores	Bactérias	Leveduras

02.12.2010	4,0 ± 1	4,0 ± 1	0
17.02.2011	2,0 ± 1	1,0 ± 2	0
06.10.2011	5,0 ± 1	5,0 ± 1	0

Os microrganismos presentes no ambiente de produção do Matadouro estão descritos na tabela 8. No dia 20.10.2011., foram registados os maiores valores de microrganismos, mais concretamente 6 bactérias e 3 bolores. Pelo contrário, no dia 07.09.2011, apenas foram obtidas 2 bactérias e um bolor.

**Tabela 8 - Microrganismos presentes no ambiente de produção do matadouro**

Data da Recolha	Microrganismos		
	Bolores	Bactérias	Leveduras
24.02.2011	2,0 ± 0,6	4 ± 1,2	0
12.05.2011	1,0 ± 1	2,0 ± 0	0
22.09.2011	3,0 ± 1	6,0 ± 2	0

Os microrganismos presentes no ambiente de produção da Adega estão descritos na tabela 9. Os valores obtidos foram semelhantes em todas as datas de colheita, sendo as leveduras o microrganismos predominante.

**Tabela 9 - Microrganismos presentes no ambiente de produção da adega**

Data da Recolha	Microrganismos		
	Bolores	Bactérias	Leveduras
24.08.2011	0	0	3,0 ± 1,0
07.09.2011	0	2,0 ± 1,0	4,0 ± 1,0
20.10.2011	0	0	3,0 ± 1,0

### 3.3. Análises Microbiológicas das Amostras de Água

A tabela 10 é referente aos teores de microrganismos presentes nas amostras de água. Apenas nas águas tratadas com cristais de tiosulfato de sódio se consegue efectuar a contagem do número de colónias. No matadouro o número de UFC/ mL de água foi 8, enquanto na queijaria, o valor obtido foi 15. Em relação à adega, os valores obtidos foram 12 e 9 UFC/mL.

**Tabela 10 - Teores de microrganismos totais presentes nas amostras de água**

Local	Data da Recolha	Tiosulfato de Sódio	UFC / mL
-------	-----------------	---------------------	----------

Matadouro	24.02.2011	Não	0
	12.05.2011	Não	0
	22.09.2011	Sim	8 ± 1
Queijaria	02.12.2010	Não	0
	14.07.2011	Não	0
	06.10.2011	Sim	15 ± 1
Adega	24.08.2011	Não	0
	07.09.2011	Sim	12 ± 2
	20.10.2011	Sim	9 ± 1

### 3.4. Análises Físico – Químicas dos Desinfetantes

Na tabela 12, encontram-se dados relativos aos testes efectuados para avaliar a presença de resíduos químicos. No matadouro e na queijaria, o desinfetante clorado foi testado com uma diluição de 3% em água, enquanto no caso da adega, o desinfetante baseado em ácido peracético foi testado com uma diluição de 0,5% em água. A tabela mostra ainda os valores de pH da água de enxaguamento, no final da desinfeção, bem como os resultados obtidos depois do teste da fenolftaleína (em termos de cor).

Tabela 11 - Testes realizados para detectar a presença de resíduos químicos

Local	Data da Recolha	Concentração de Produto (%)	Valor de pH	Teste da Fenolftaleína
Matadouro	24.02.2011	3	7	Incolor
	12.05.2011	3	7	Incolor
	22.09.2011	3	6	Incolor
Queijaria	02.12.2010	3	7	Incolor
	14.07.2011	3	7	Incolor
	06.10.2011	3	7	Incolor
Adega	24.08.2011	0,5	7	Não aplicável
	07.09.2011	0,5	7	
	20.10.2011	0,5	7	

Na tabela 13, encontram-se dados relativos aos testes complementares efectuados para avaliar a presença de resíduos químicos, em condições de utilização diferentes das aplicadas nos sectores anteriormente referidos. Neste caso testaram-se diferentes concentrações do desinfetante alcalino, nomeadamente 10, 12 e 15%, em água.

Tabela 12 - Testes complementares para detectar a presença de resíduos químicos /avaliar limite de detecção da fenolftaleína

Concentração de Produto (%)	Valor de pH	Teste da Fenolftaleína
10	7	Incolor
12	9	Ligeiramente Rosa
15	13	Rosa

## 4. Discussão dos Resultados

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

O desinfetante da Mistolin foi mais eficaz na desinfeção de todos os tipos de superfícies, principalmente nas verticais, onde se requer a utilização de um produto com formação de uma espuma compacta para garantir mais tempo de contacto.

Os resultados obtidos inicialmente com o desinfetante produzido pela Mistolin, quando comparados com a marca concorrente, apresentam valores pouco satisfatórios em termos de eficácia e mais grave ainda, alguns dos valores obtidos pelo desinfetante da Mistolin encontram-se acima do valor permitido por lei, ou seja, 100 UFC por  $\text{cm}^2$ . Numa primeira formulação, o desinfetante da Mistolin apresentava uma espuma pouco

estável e muito líquida, não estando em contacto o tempo necessário para obter uma redução de microrganismos, até níveis seguros para o consumidor.

Com a nova formulação desenvolvida pela Mistolin, os resultados foram mais satisfatórios. Nos controlos realizados no matadouro, a mesa de vísceras horizontal apresenta maior carga microbiana que a mesa de vísceras vertical, no entanto, após a aplicação dos desinfectantes, verifica-se o contrário. Este facto é devido ao método de higienização utilizado, ou seja, aplicação do produto na forma de espuma. O produto da Mistolin forma uma espuma compacta (em flocos) e com uma estabilidade superior, o que se torna de extrema importância pois possibilita maior tempo de contacto entre os microrganismos e as superfícies, aumentando assim a eficácia da desinfecção. Em relação a este ponto de recolha, a eficácia do produto da Mistolin é superior quando comparado com o da marca concorrente, uma vez que o produto da marca concorrente não apresenta uma espuma compacta, deslizando mais facilmente e minimizando o tempo de contacto necessário para manter uma boa eficácia. Na mesa de vísceras horizontal, a diferença entre os dois desinfectantes não é tão notória como na mesa vertical, porque independentemente da qualidade da espuma das duas marcas, o produto está sempre em contacto com os microrganismos, daí as reduções obtidas serem muito parecidas.

Na Queijaria, o ponto de mais difícil higienização foi o cincho. O cincho apresenta algumas ranhuras, que são propícias para a acumulação de sujidade, daí a dificuldade na higienização, o que pode tornar este equipamento um local propício para o crescimento de microrganismos. Para os cinchos, a aplicação do produto na forma de espuma, poderá não ter sido a mais indicada, devido às ranhuras que este equipamento apresenta, o que limita bastante o tempo de contacto entre os microrganismos e o desinfectante, reduzindo deste modo a eficácia de higienização. Em relação ao tanque do leite e às francelas, visto apresentarem uma estrutura lisa e em aço inoxidável, a aplicação do desinfectante na forma de espuma foi eficaz na remoção / inactivação dos microrganismos presentes nestes equipamentos, até níveis seguros, ou seja, abaixo de  $100 \text{ UFC cm}^{-2}$ .

Na Adega, todos os valores obtidos após a desinfecção, estão dentro do limite permitido, ou seja,  $150 \text{ UFC cm}^{-2}$ . Não existe, no entanto, uma explicação muito váida para o facto dos depósitos do vinho tinto apresentarem maior carga microbiana que os depósitos do vinho branco, contudo o tempo que o vinho permaneceu no interior dos depósitos pode ter influência nos resultados. Sendo o vinho uma bebida que pigmenta as

superfícies com que contacta e normalmente apresenta alguns resíduos, entre eles, os tartaratos, a presença destes compostos pode diminuir a eficácia da higienização. Desta forma, apesar de não se ter conhecimento do tempo que o vinho esteve em maturação, não é de todo errado colocar a hipótese destes compostos contribuírem para as diferenças obtidas nos dois depósitos. O teor de açúcares no vinho também poderá desempenhar um factor crucial, pois altos teores de açúcares propiciam condições ideais ao crescimento de microrganismos. Apesar do pH do vinho não ter sido medido, o pH é um factor que inibe o crescimento de alguns microrganismos, e se, o vinho tinto e o vinho branco apresentarem diferentes valores de pH, pode haver maior crescimento de microrganismos num dos depósitos.

Nas análises microbiológicas às águas tratadas com tiosulfato de sódio, os valores das UFC por mL são superiores, pois o cloro inibe o crescimento dos microrganismos e não permitia que se efectuasse a quantificação dos mesmos. Todos os valores obtidos nas amostras de água apresentam uma concentração de microrganismos abaixo do limite definido por lei ( 20 UFC mL<sup>-1</sup>).

Analisando os valores obtidos nos diferentes ambientes de produção, não é de estranhar o facto de a adega apresentar mais leveduras que os diferentes sectores. As leveduras fazem parte do processo de fermentação dos vinhos, e este facto poderá contribuir para o seu aparecimento, no ambiente de produção.

Com o teste da fenolftaleína, verifica-se o aparecimento de uma solução incolor, indicadora da ausência de produtos alcalinos, o que garante que o enxaguamento foi correctamente efectuado. Este facto, foi confirmado pelo valor de pH obtido (7), uma vez que o pH original do produto é 13-14.

## **5. Formação Pessoal e Tarefas Desenvolvidas na Mistolin**

Foram várias as tarefas por mim desenvolvidas, no âmbito deste estágio curricular. O principal objectivo passou inicialmente por conhecer a empresa, perceber o modo de funcionamento interno, a visão, missão e tentar definir uma função adequada às minhas competências e áreas de conhecimento.

Principais tarefas desenvolvidas:

- Participação na elaboração da Newsletter online (edição bimensal).
- Acompanhamento a clientes
- Elaboração de fichas técnicas e rótulos de produtos para o mercado nacional e internacional
- Participação nas reuniões sobre o registo de produtos Biocidas em território espanhol
- Parte integrante no desenvolvimento de planos de higiene dinâmicos e planos de higiene em 3D
- Assistente de Marketing – tratamento de informação relativa a campanhas, catálogos, apresentações em Powerpoint, etc.

Em suma, todas as tarefas desenvolvidas ao longo deste estágio curricular acabaram por se revelar de uma importância extrema para a minha formação pessoal e profissional. Esta experiência foi muito enriquecedora, pois aliando o desafio das actividades novas e o compromisso com a empresa, permitiu-me ganhar mais responsabilidade e competências.

## 6. Referências Bibliográficas

- Antunes, C. A. (2008) HACCP – Qualidade Alimentar e Implementação. Codinfor – Consultoria e Formação. Covilhã
- Baptista, P. (2003). Higienização de Equipamentos e Instalações na Indústria Agro – Alimentar. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, 1-68.
- Chatonnet, P.; Duboudieu, D., & Boidron, J.N.. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal Scientific Food Agriculture*. 60, 165-178.
- Christaki, T., & Tzia, C. (2002). Quality and safety assurance in winemaking. *Food Control*, 13, 503-517.
- Costa, C. R. (1994). Importância do Controlo Microbiológico por Agentes Químicos de Cantinas Industriais. Curitiba.
- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents* 11, 217-221.
- Forsythe, S.J.(2002). *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre. Artmed.
- Germano, P. M. L. (2001). *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 1ª edição. São Paulo: Varela.
- Gracey, J.; Collins, D.S.; Huey,R. (1999). *Meat Hygiene*. W.B. Saunders Company Ltd. London.
- Holah, J.T.; Lavaud, A.; Peters, W. (1998). Future Techniques for disinfectant efficacy testing. *International Biodegradation and Biodeterioration*.
- Holah, J. (2000). *Food Processing Equipment Design and Cleanability*. Retuer, Flair Flow Europe, Teagasc.
- ICMSF (1998). *Microorganisms in Foods 6: Microbial ecology of food commodities*. Blackie Academic & Professional. Chapman and Hall.
- Jefferson, K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, Volume 236, Issue 2, Pages 163 – 173.
- Kessler,H.G. (1981). *Food Engineering and Dairy Technology*. London.
- Langsrud, S., Sidhu, M. S., Heir, E., & Holck, A.L. (2003). Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 283-290.
- Little, C.L., Rhoades, J.R., Sagoo, S.K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., & McLauchlin, J. (2008) Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, 304 – 312.

- Lourenço, A., Neves, E., & Brito, L. (2009). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese – dairies to in-use sanitizers. *Food Control*, 20, 585-589.
- MARRIOTT, N.G. (1997) *Essentials of Food Sanitation*. Chapman and Hall. Reino Unido.
- Marriott, N.G., & Gravani, R. B. (2006). *Principles of Food Sanitation*. Fifth Edition Springer.
- McDonnell, G., & Russell, A.D. (2001). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 147-179.
- Navarre, C. (1997) *Enologia – Técnicas de Produção do Vinho*. Coleção EUROAGRO. Publicações Europa – América.
- Norrung, B., & Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science* 78, 14-24.
- Orth, R. (1998) The importance of disinfection for the hygiene in the dairy and beverage production. *Journal of Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 201-208.
- Pearson, A.M., & Dutson, T. 1995. *HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing*. Advances in meat researches series, 10. Blackie Academic & Professional. Chapman and Hall.
- Pereira, C., Danesh, P., Marques, J.J., & Romão, M.V. (2004). O gosto a rolha em vinhos – estado actual dos conhecimentos. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 79 – 99.
- Russell, A. D. (1998). Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*, 43, 57 – 68.
- Schroder, W. (1984). Peracetic acid – disinfectant for the foodstuffs industry. *Brauwelt Internation*.
- Smulders, E. (2002). *Laundry Detergents*. WILEY – VCH.Weinheim.
- Shi, X., & Zhua, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*.
- Showell, M.S. (2006). *Handbook of Detergents. Part D: Formulation*. Surfactant Science Series. Volume 128. Suite.
- Teixeira, I.V. (2005). O “gosto a rolha” nos vinhos: Comparação de Métodos de preparação e análise de amostras. Universidade de Lisboa.
- Varnan, A.H., & Sutherland, J.P. (1995) *Meat and meat products: Technology, chemistry and microbiology*. Food Products Series, 3, 98-120. Chapman and Hall.
- Velloso, C.R.V. (2002) *Elementos de Inspeção Sanitária e Tecnológica de Leite e Produtos Lácteos*. Ministério da Agricultura.

Verdier – Metz, I., Michel, V., Delbés, C., & Montel, M.C. (2009) Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology* 26, 305-310.

West, H. G. (2008). Food Fears and Raw-milk cheese. *Appetite*, 25-29.

Wirtanen, G., & Salo, S. (2003). Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Environmental Science and Biotechnology* 2, 2293-2306.

Yucel, N. & Ulusoy, H. (2006). A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. *Food Control* 17, 383-388.

Decreto-lei nº 112/2010 de 10 de Outubro de 2010: relativo à colocação no mercado dos produtos biocidas, que estabeleceu as normas e os procedimentos necessários para a colocação no mercado daquele tipo de produtos e para aprovação das substâncias que neles podem ser utilizadas.

Regulamento nº 648/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março de 2004: relativo aos detergentes e que estabelece regras para assegurar a livre circulação dos detergentes e tensoactivos no mercado interno.

NP EN ISO 22000: 2008 – Sistema de gestão da segurança que define os requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar.

Taints and off – flavours in food. Edited by Brian Baigrie.

[http:// www.mistolin.pt](http://www.mistolin.pt) (Consultado a 16 de Abril de 2011)

Simões, P.(2008). *Manual de apresentação da Mistolin*.

[http:// www.ecolab.com](http://www.ecolab.com) (Consultado a 15 de Maio de 2011)

[http:// www.diversey.com](http://www.diversey.com) (Consultado a 15 de Maio de 2011)

## **Anexos**

## Anexo I – Produtos da Área Profissional

Tabela 1 - Principais tipos de produtos comercializados pela Mistolin

<u>Área Alimentar</u>	<u>Agro - Alimentar</u>	<u>Construção</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavagem Automática de Louça</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidrofugantes</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lavagem Manual de Louça</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcalinos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Telhados</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Superfícies e Equipamentos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produtos para CIP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descofrantes</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcalino – Clorados com e sem Espuma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido Muriático</li> <li>• Tijoleiras</li> </ul>
<u>Lavanderia</u>	<u>Pavimentos</u>	<u>Auto</u>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detergentes em Pó</li> <li>• Detergentes Líquidos</li> <li>• Amaciadores</li> <li>• Aditivos</li> <li>• Branqueadores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auto – Lavadoras</li> <li>• Bioálcool</li> <li>• Desinfetantes</li> <li>• Multiusos</li> <li>• Manutenção</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Champô</li> <li>• Tabliers</li> <li>• Carroçarias</li> <li>• Motores</li> <li>• Pneus</li> </ul>
<u>WC</u>	<u>Higiene Pessoal</u>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cremes de Limpeza</li> <li>• Desinfetantes</li> <li>• Ambientadores</li> <li>• Pastilhas para Urinóis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Champô</li> <li>• Gel de Banho</li> <li>• Sabonetes Líquidos</li> <li>• Pastas Mecânicas</li> </ul>	

## Anexo II – Ficha Técnica do Produto Clorado da Mistolin

### DETERGENTE ALCALINO – CLORADO ESPUMANTE

---

#### APLICAÇÕES:

- Detergente alcalino clorado com acção espumante, desenvolvido como poderoso desengordurante e desinfectante.
- Deve ser aplicado com recurso a uma máquina de projecção de espuma.
- Adequado para higienização genérica de superfícies e equipamentos na Indústria Alimentar (Bebidas, Lacticínios, Matadouros, etc.).
- Pode ser aplicado para a limpeza de pavimentos, paredes, tábuas de corte, embaladoras, linhas de enchimento e outros equipamentos de processamento de alimentos.
- Este produto é apropriado para uso na Área Alimentar.

#### MODO DE UTILIZAÇÃO:

**Antes de aplicar o produto:** fazer um pré – enxaguamento das superfícies, de modo a remover os resíduos maiores.

- Aplicar o produto numa diluição de 1 a 3% e deixar actuar durante 5 minutos.
- Enxaguar abundantemente de forma a garantir que não ficam resíduos de produto nas superfícies de contacto com alimentos.

#### VANTAGENS DO PRODUTO:

- Excelente capacidade para eliminar gorduras.
- A presença de cloro permite a remoção de manchas, ajudando a prevenir a formação de incrustações e exercendo acção branqueadora.
- Altamente eficaz contra inúmeros tipos de microrganismos.

#### CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS:

<ul style="list-style-type: none"><li>• Líquido Esverdeado Ligeiramente Viscoso</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Matéria Activa Total: 50%</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Densidade: 1.15 ± 0.01</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Biodegradabilidade:&gt; 90%</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• pH: 12.5. – 13.5</li></ul>	

## **COMPOSIÇÃO:**

(Reg. 648/2004)

• Agentes de branqueamento à base de cloro: <5%
• Tensioactivos Não Iónicos: <5%
• Tensioactivos Aniónicos: <5%
• Hidróxido de Sódio: 5-15%
• Fosfonatos: <5%

## **OBSERVAÇÕES:**

De acordo com EN 1276: 2009, o produto quando diluído a 3% (v/v) em água dura estéril, apresenta actividade bactericida, em 15 minutos a 20°C em condições sujas (3g / 100 mL de albumina bovina) para as estirpes *E. coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 e *Enterococcus hirae* ATCC 10541.

## **ARMAZENAGEM:**

Produto estável em condições normais.

Manter na embalagem de origem fechada e ao abrigo de temperaturas extremas.

A Ficha de Segurança do produto contém informação completa sobre manuseamento e classificação do mesmo.

## **EMBALAGEM:**

5L



20L



## Anexo III – Ficha de Equipamento



### QFC EQUIPAMENTO DE PROJECCÃO DE ESPUMA COM COMPRESSOR

#### APLICAÇÕES:

- É um equipamento para projecção de espuma em Indústrias Agro – Alimentares.
- Facilita a higienização em equipamentos e locais de difícil acesso.
- Permite efectuar o enxaguamento e a aplicação de dois produtos de higienização (um detergente espumante e um desinfectante).
- A escolha da função desejada é efectuada através da válvula de selecção.



#### BENEFÍCIOS:

- **Simple de Usar:** Não requer a pré – instalação de ar comprimido nas instalações fabris (compressor incorporado).
- **Redução de Custos:** Graças à sua mobilidade, simplicidade e eficácia permite reduzir os custos com mão-de-obra, químicos e água.
- **Equipamento de Média Pressão:** Previne a formação de aerossóis, não comprometendo desta forma a eficácia da higienização
- **Espuma Compacta:** Devido ao elevado poder de aderência, otimiza o tempo de contacto entre o produto e a superfície a higienizar.

### **ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS:**

- Mangueira com 25 metros
- Concentração Regulável, de 3 a 4%
- Bomba: 2m<sup>3</sup> / h a 20 Bar
- Não necessita ar comprimido

### **ACESSÓRIOS:**

- Lança de Aplicação de Espuma em Aço Inoxidável
- Lança de Enxaguamento em Aço Inoxidável
- Mangueira de Qualidade Alimentar

## Anexo IV – Ficha do Manual de Vinificação



*higiene global*

### Prensas Hidráulicas e Pneumáticas

De acordo com o tipo de sujidade deste equipamento (sujidade orgânica), a solução mais adequada para a sua higienização passa pela utilização de espumas, de preferência fortemente alcalinas.



### Sugestão de Higienização

#### A) Sem Cloro

Produto	Frequência	Método de Aplicação	Concentração	Tempo de Contacto
	Após Utilização	Espuma	3 – 8%	10 - 15 Minutos

#### B) Com Cloro

Produto	Frequência	Método de Aplicação	Concentração	Tempo de Contacto
	Após Utilização	Espuma	2 - 4%	10 - 15 Minutos

❖ Aspectos a ter em conta **antes da aplicação do produto:**

1º Desligar o equipamento da corrente, de modo a garantir que a operação decorre de forma segura e sem qualquer risco para o operador.

2º Remover os resíduos maiores e fazer um pré – enxaguamento.

❖ **Depois de aplicar o produto:** no caso das zonas de maior sujidade, pode haver a necessidade de esfregar, o que facilita a remoção dos resíduos.

- Enxaguar abundantemente de forma a garantir a eliminação de todos os resíduos de produto nas superfícies.

Exemplo de cálculo:

1º contagem do número de colónias por cada placa.

2º Multiplica-se o valor médio pelo inverso do factor de diluição

3º Expressar os resultados em UFC / mL

4º Converter os resultados e apresentar em UFC cm<sup>-2</sup>

Tabela 2 - Exemplo de cálculo das UFC cm<sup>-2</sup>

	Sem Diluição - Depósito do Vinho Branco (1ª Recolha)					
	Sub – Amostra A		Sub – Amostra B		Sub – Amostra C	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
Número de Colónias	296	292	304	288	292	308
UFC Totais	888	876	912	864	876	924
UFC cm <sup>-2**</sup>	177	175	182	173	175	185
Média Sub - Amostras	176 ± 2		178 ± 7		180 ± 7	
Média Final (UFC cm <sup>-2</sup> )	178 ± 2					

\*Tendo em conta que o volume do líquido de transporte era 3 mL, o número de UFC totais, tem de ser multiplicado por 3.

\*\*Tendo em conta que a amostra foi retirada de uma área de 5 cm<sup>2</sup>, tem de se dividir o valor final por 5.