



Universidade de Aveiro
2020

Departamento de Química

**JOSÉ PEDRO
PENETRA MOURA
DE CARVALHO**

**MONITORIZAÇÃO AMBIENTAL NO ÂMBITO
DE PRÉ-REQUISITOS DE UM SISTEMA
HACCP**



Universidade de Aveiro
2020

Departamento de Química

**JOSÉ PEDRO
PENETRA MOURA
DE CARVALHO**

**MONITORIZAÇÃO AMBIENTAL NO ÂMBITO
DE PRÉ-REQUISITOS DE UM SISTEMA
HACCP**

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 Ana Maria Pissarra Coelho Gil, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Dra. Carina Pereira, Técnica de Qualidade e Segurança Alimentar da Dan Cake (Portugal) S.A., Unidade Fabril de Coimbra.

o júri

presidente

Prof. Doutor João Filipe Colardelle da Luz Mano
Professor Catedrático, Universidade de Aveiro

Doutora Liliana Gonçalves Fidalgo
Professora Adjunta, Instituto Politécnico de Beja

Prof. Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil
Professora Associada com Agregação, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Às minhas orientadoras, a Professora Doutora Ana Maria Gil e a Dra. Carina Pereira, pela disponibilidade e conhecimento transmitido ao longo da execução deste trabalho.

À empresa Dan Cake (Portugal) S.A. e a todas as pessoas com quem contactei neste meio, com um especial agradecimento ao Pedro Ferreira por toda a atenção, simpatia e amizade.

Aos amigos que contribuíram de forma positiva ao longo do período de estágio.

Por fim, aos meus pais e irmãos, que tudo fizeram para que nada faltasse a cada dia do meu percurso académico.

palavras-chave HACCP, Boas Práticas, pré-requisitos, higienização, manipuladores, superfícies, equipamentos, microbiologia

resumo A “higiene das instalações, equipamentos e utensílios” e a “higiene pessoal” na indústria alimentar são fundamentais para garantir o controlo, diminuição ou eliminação dos perigos biológicos no ambiente fabril e, conseqüentemente, da contaminação dos produtos. A correta implementação destas Boas Práticas de Higiene e de Fabrico, consideradas pré-requisitos de um sistema *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP), é necessária antes da aplicação dos procedimentos baseados na metodologia HACCP, servindo de sustento à implementação e funcionamento do sistema HACCP/Plano de Segurança Alimentar da empresa onde foi realizado o estágio. O presente trabalho teve como objetivo a monitorização da eficácia das regras estabelecidas, numa empresa da indústria alimentar, relativamente aos procedimentos de higienização dos equipamentos e utensílios, e das regras aplicadas à higiene do fardamento de trabalho e das mãos (higiene pessoal). A monitorização destes pré-requisitos foi feita através de amostragem, por zaragatoa, de superfícies de equipamentos, utensílios, mãos e fardas de colaboradores, para determinação da carga microbiana contida nestas superfícies. Devido à situação de pandemia da COVID-19, dedicou-se uma parte do tempo de estágio à realização de algumas atividades no âmbito da higiene pessoal inseridas no plano de contingência, nomeadamente a elaboração de ajudas visuais para reforço da frequência de higienização das mãos por parte dos colaboradores.

Quanto ao pré-requisito “higiene das instalações, equipamentos e utensílios”, em análises microbiológicas a superfícies em contacto com alimentos após higienização, os microrganismos analisados e respetivos limites de aceitação foram: microrganismos mesófilos aeróbios, como indicador das condições higiénicas das superfícies ($1,0 \times 10^3$ UFC/ml para zonas de massas e $1,0 \times 10^2$ UFC/ml para zonas pós-forno); bolores e leveduras, como indicadores de microrganismos associados à deterioração de alimentos ($1,0 \times 10^2$ UFC/ml em zonas de massas e $5,0 \times 10^1$ UFC/ml em zonas pós-forno) e *Escherichia coli*, como indicador de contaminação fecal e da presença patogénicos entéricos (<1 UFC/ml para todas as zonas da fábrica). Num total de 57 amostras recolhidas de superfícies de contacto com produto, 7 amostras excederam o limite de aceitação para microrganismos mesófilos aeróbios, das quais 6 amostras excederam simultaneamente o limite de aceitação de leveduras. Para as 7 amostras com resultados acima do limite de aceitação para pelo menos um parâmetro, repetiu-se a amostragem e análise, porém até à data de fim do estágio só se obteve os resultados a 5 amostras, tendo sido obtidos resultados dentro dos limites de aceitação para todos os parâmetros, provando que os primeiros resultados se devem apenas a uma contaminação pontual na superfície dos utensílios, ou ao possível não-cumprimento rigoroso do procedimento de higienização estabelecido pela empresa. Em superfícies sem contacto com produto, os microrganismos pesquisados foram as bactérias patogénicas *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. O limite de aceitação estabelecido para as análises às duas bactérias (a sua ausência) foi cumprido para todas as amostras analisadas.

Relativamente ao pré-requisito “higiene pessoal”, os microrganismos analisados e respetivos limites de aceitação nas análises às mãos e fardas dos colaboradores foram: mesófilos aeróbios ($1,0 \times 10^3$ UFC/ml); *E. coli*, como indicador de contaminação fecal (<1 UFC/ml); e *Staphylococcus coagulase* positiva, como indicador da flora microbiana residente na pele humana ($\leq 1,0 \times 10^1$ UFC/ml). A amostragem, por zaragatoa, das mãos dos colaboradores foi feita após a sua higienização, para verificar a eficácia do procedimento utilizado. Todas as amostras analisadas apresentaram resultados abaixo dos limites de aceitação para todos parâmetros microbiológicos referidos. De forma semelhante, em relação às amostras recolhidas das fardas dos colaboradores, em todas foram obtidos resultados abaixo dos limites de aceitação para todos os parâmetros microbiológicos.

Deste modo, verificou-se que as regras que foram verificadas na empresa relativamente aos procedimentos de higienização dos equipamentos e utensílios são eficazes, assim como as regras aplicadas à higiene das mãos e do fardamento de trabalho. Por isso, as Boas Práticas de Higiene no âmbito dos pré-requisitos abordados nesta dissertação estão implementadas, assegurando um suporte adequado para o funcionamento do sistema HACCP/Plano de Segurança Alimentar da empresa.

keywords HACCP, Good Practices, prerequisites, hygiene, food handlers, surfaces, equipment, microbiology

abstract In food industry, “facilities, equipment and utensils hygiene” and “personal hygiene” are essential to ensure control, reduction or elimination of biological hazards in food processing environment and, therefore, product contamination. The correct execution of these Good Hygiene and Manufacturing Practices, considered prerequisites of a Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system, is necessary before the application of procedures based on the HACCP methodology, as a support for the implementation and operation of the HACCP system/Food Safety Plan of the company where the internship took place. The present work aimed to monitor the effectiveness of the established rules regarding hygiene procedures of equipment and utensils, and the rules applied to the hygiene of work uniforms and hands (personal hygiene), in a food industry company. The monitoring of these prerequisites was done by swab sampling of surfaces of equipment, utensils, hands and uniforms of employees, to determine the microbial load contained in these surfaces. Due to the COVID-19 pandemic, part of the internship was dedicated to perform activities in the scope of personal hygiene included in the contingency plan, in particular the development of visual aids to reinforce the frequency of hand hygiene by employees.

As for the “facilities, equipment and utensils hygiene” prerequisite, in microbiological analyses of food contact surfaces after sanitation, the analyzed microorganisms and their respective acceptance limits were: aerobic mesophilic microorganisms, as an indicator of surfaces hygienic conditions (1.0×10^3 CFU/ml for raw-ingredient zones and 1.0×10^2 CFU/ml for post-oven zones); molds and yeasts, as indicators of food spoilage microorganisms (1.0×10^2 CFU/ml in raw-ingredient zones and 5.0×10^1 CFU/ml in post-oven zones) and *Escherichia coli*, as an indicator of faecal contamination and enteric pathogens presence (<1 CFU/ml for all areas of the plant). In a total of 57 samples from food contact surfaces, 7 of them exceeded the acceptance limit for aerobic mesophilic microorganisms, of which 6 samples simultaneously exceeded yeast acceptance limit. For the 7 samples with results above the acceptance limit for at least one parameter, sampling and analysis were repeated. However, until the end of the internship, the results were only obtained for 5 samples, which achieved results within the acceptance limits for all parameters, proving that the first results are only due to occasional contamination on utensils surfaces, or to the possible non-compliance with the hygiene procedure established by the company. On non-food contact surfaces, the investigated microorganisms were the pathogenic bacteria *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. The acceptance limit established for the analysis of the two bacteria (their absence) was met for all samples analyzed. Regarding “personal hygiene” prerequisite, the analyzed microorganisms and respective acceptance limits in the analysis of employees’ hands and uniforms were: aerobic mesophiles (1.0×10^3 CFU/ml); *E. coli*, as an indicator of faecal contamination (<1 CFU/ml); and coagulase-positive *Staphylococcus*, as an indicator of microbial flora residing in human skin ($\leq 1.0 \times 10^1$ CFU/ml). Swab sampling of employees’ hands was carried out after cleaning, to verify the effectiveness of the procedure. All analyzed samples showed results below the acceptance limits for all referred microbiological parameters. Similarly, regarding samples collected from employees’ uniforms, every sample showed results below the acceptance limits for all microbiological parameters. Therefore, it was found that the rules that were verified regarding the hygiene procedures of equipment and utensils in the company are effective, as well as the rules applied to hand hygiene and work uniforms. Hence, Good Hygiene Practices within the scope of the prerequisites covered in this dissertation are implemented, ensuring appropriate support for the functioning of the company’s HACCP/Food Safety Plan.

Índice

1. Contextualização e objetivos do estágio	1
1.1. Apresentação da empresa – Dan Cake (Portugal) S.A.	1
1.2. Contexto e objetivos do estágio	1
2. Introdução	3
2.1. Noções gerais de segurança alimentar	3
2.2. Tipos de perigos alimentares	5
2.2.1. Fatores que afetam o crescimento dos microrganismos.....	8
2.2.2. Fontes de contaminação microbiológica dos alimentos	10
2.2.3. Microrganismos com origem no ambiente fabril	11
2.3. Risco alimentar e análise de risco	14
2.4. Sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>)	15
2.5. Programas de pré-requisitos.....	16
2.5.1. Higiene pessoal e formação.....	17
2.5.2. Higienização de instalações, equipamentos e utensílios	20
2.6. O impacto do novo coronavírus (COVID-19) na segurança alimentar	23
2.6.1. Contaminação de alimentos ou superfícies em contacto com alimentos por SARS-CoV-2 e transmissão do vírus através da ingestão de alimentos contaminados	24
2.6.2. Medidas de segurança alimentar e dos colaboradores na indústria alimentar... 28	
3. Material e Métodos	32
3.1. Monitorização da eficácia da higienização de equipamentos e utensílios.....	32
3.2. Monitorização da higiene pessoal dos colaboradores.....	34
4. Resultados e Discussão	35
4.1. Monitorização da eficácia da higienização de equipamentos e utensílios.....	35
4.2. Monitorização da higiene pessoal dos colaboradores.....	56
5. Atividades realizadas no âmbito da prevenção da transmissão do SARS-CoV-2 na empresa.....	63
6. Outras atividades desenvolvidas no estágio.....	66
7. Conclusão.....	68
8. Referências Bibliográficas	70

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Planificação e calendarização das atividades previstas no estágio a realizar na empresa Dan Cake. Células preenchidas a cor indicam os meses em que foi realizada cada atividade.	2
Tabela 2 – Resumo das atividades realizadas no estágio na Dan Cake, até à data de término do mesmo. Células de cor cinzenta indicam os meses em que foi realizada cada atividade, e células a amarelo representam os períodos de inatividade para cada tarefa, impostas pela interrupção do estágio devido à pandemia COVID-19.	3
Tabela 3 - Principais fatores para o desenvolvimento dos principais microrganismos patogénicos em alimentos (Adaptado de Baptista e Venâncio, 2003; ASAE, 2020). Os microrganismos mais relevantes para o presente trabalho estão indicados a negrito.....	10
Tabela 4 - Princípios da metodologia de HACCP (Adaptado de Baptista et al., 2003).	16
Tabela 5 - Resumo do plano de higienização implementado na empresa até ao início do estágio.	22
Tabela 6 - Estabilidade de NoV e CoV e respetivos substitutos sob diferentes condições (Adaptado de Li et al., 2020).	26
Tabela 7 - Plano de amostragem para monitorização da eficácia dos processos de higienização na empresa.	32
Tabela 8 - Critério de aceitação para os parâmetros microbiológicos em colheitas a superfícies do ambiente fabril na empresa.	33
Tabela 9 - Plano de amostragem para verificação da eficácia dos processos de higienização das mãos e das fardas de manipuladores.	34
Tabela 10 - Critérios de aceitação para os parâmetros microbiológicos em amostras às mãos e fardas dos manipuladores.	34
Tabela 11 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos da zona de massas da fábrica.	35
Tabela 12 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos da Zona de arrefecimento e embalagem das linhas de produção na fábrica.	37
Tabela 13 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos/utensílios de apoio à produção, que entram em contacto com matérias-primas ou produto.	40
Tabela 14 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies interiores de mangueiras usadas no sistema CIP / circuito de ovos.	43
Tabela 15 - Comparação dos resultados analíticos das repetições das amostragens de todas as superfícies que obtiveram resultados acima dos critérios de aceitação para pelo menos um parâmetro, com os respetivos resultados da sua primeira amostragem.	44
Tabela 16 - Plano de higienização do equipamento “Depositador de açúcar” anteriormente implementado na empresa, antes das sucessivas análises com resultados acima dos critérios de aceitação.	47
Tabela 17 - Resultados analíticos da primeira e segunda amostragem ao equipamento “Depositador de açúcar” feitas em estágio. A primeira amostragem serviu como	

verificação da eficácia de um novo procedimento de higienização. A segunda amostragem teve como objetivo a validação do novo procedimento e consequente alteração do plano de higienização do equipamento.	48
Tabela 18 - Novo plano de higienização implementado na empresa para o equipamento “Depositor de açúcar”, após validação através de duas análises microbiológicas satisfatórias sucessivas à superfície do equipamento.	49
Tabela 19 - Resultados analíticos obtidos das pesquisas a <i>Salmonella</i> spp. feitas nas instalações da empresa.....	53
Tabela 20 - Resultados analíticos obtidos das pesquisas a <i>L. monocytogenes</i> feitas nas instalações da empresa.....	54
Tabela 21 - Resultados analíticos obtidos na verificação da eficácia de higienização das mãos de colaboradores da empresa.	56
Tabela 22 - Resultados analíticos obtidos na verificação da eficácia de higienização das fardas de colaboradores da empresa.	60

Índice de Figuras

Figura 1 – Evolução do logótipo da marca Dan Cake: de 1978 a 2008 (à esquerda), de 2008 a 2014 (ao centro) e de 2014 até à atualidade (à direita).....	1
Figura 2 – Taxas de crescimento de microrganismos em alimentos em função da sua atividade de água (Adaptado de van den Berg & Bruin, 1981).....	8
Figura 3 - Esquema representativo da interação entre os três componentes da análise de risco (Adaptado de Abt et al., 2010).....	15
Figura 4 - Áreas abrangidas pelo programa de pré-requisitos (adaptado de Baptista et al., 2003).....	16
Figura 5 – Estrutura química de digluconato de clorexidina (Adaptado de Fiorentino et al., 2013).....	18
Figura 6 - Estrutura química de triclosan (Adaptado de Ma et al., 2013).	18
Figura 7 - Estrutura química de um "quelato", composta pelo ligando dissociado (EDTA ⁴⁻) e pelo ião metálico (M) (Adaptado de Mali et al., 2014).	20
Figura 8 - Exemplares de zaragatoas utilizadas para recolha de amostra para análise microbiológica em superfícies.....	33
Figura 9 - Ajuda visual elaborada no âmbito da prevenção da transmissão do vírus SARS-CoV-2, para reforçar as medidas higienização das mãos dos colaboradores.	64
Figura 10 - Ajuda visual, elaborada no âmbito da prevenção da transmissão do vírus SARS-CoV-2, para recomendação da utilização dos bebedouros exclusivamente para enchimento de garrafas com água.	65
Figura 11 - Ajuda visual, elaborada no âmbito do pré-requisito higiene pessoal, com indicação das situações em que deve ser feita a higienização das mãos.	66
Figura 12 - Ajuda visual, elaborada no âmbito do pré-requisito higiene pessoal, com indicação do procedimento adequado para a lavagem eficaz das mãos.	67

Lista de Abreviaturas

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
BRC – *British Retail Consortium*
CAC – Comissão do *Codex Alimentarius*
CDC – *Center for Disease Control*
CE – Comissão Europeia
CIP – *Cleaning-in-place*
DMI – Dose Mínima Infeciosa
ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control*
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EHEC – *E. coli* enterohemorrágica
EIEC – *E. coli* enteroinvasiva
EPEC – *E. coli* enteropatogénica
EPI – Equipamento de Proteção Individual
ETEC – *E. coli* enterotoxigénica
EUA – Estados Unidos da América
FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA – *Food and Drug Administration*
FIPA – Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares
FSMA – *Food Safety Modernization Act*
FSS – *Food Standards Scotland*
GHP – *Good Hygiene Practices*
GMP – *Good Manufacturing Practices*
HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points*
IFS – *International Food Standard*
NASA – *National Aeronautics and Space Administration*
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCC – Pontos Críticos de Controlo
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PPR – Programa de Pré-Requisitos
UFC – Unidades formadoras de colónias
UFP – Unidades formadoras de placas
USDA – *United States Department of Agriculture*

1. Contextualização e objetivos do estágio

1.1. Apresentação da empresa – Dan Cake (Portugal) S.A.

A Dan Cake (Portugal) S.A é uma empresa portuguesa, fundada em 1978, especializada na produção e comercialização de produtos como bolachas, biscoitos, tostas e pastelaria de conservação (Dan Cake, 2019b).

Os produtos Dan Cake estão presentes em cerca de 70 países, abrangendo os 5 continentes, sendo que os dados mais recentes indicam que a exportação representa 78% do volume total de vendas. Deste modo, os seus produtos assumem a marca “Dan Cake” em países de expressão oficial portuguesa (à exceção de Timor-Leste), e para todos os países em que não se aplica esta categoria é usada a marca “Danesita” ou “Danor”. Para além destas marcas, a empresa faz também a produção e venda para marcas de terceiros, assumindo a marca própria de alguns clientes (Dan Cake, 2019b). A evolução da imagem Dan Cake é apresentada na Figura 1:



Figura 1 – Evolução do logótipo da marca Dan Cake: de 1978 a 2008 (à esquerda), de 2008 a 2014 (ao centro) e de 2014 até à atualidade (à direita).

A empresa tem duas unidades fabris, em Coimbra e na Póvoa de Santa Iria, tendo no total 18 linhas de produção. A unidade fabril de Coimbra, onde foi realizado o estágio, produz *butter cookies*, queques e madalenas simples e recheados, biscoitos e bolachas, croissants, pipocas, waffles e palitos. Em 2005, devido ao crescimento em mercado internacional, ambas as unidades fabris obtiveram a certificação nos referenciais normativos *International Food Standard (IFS)* e *British Retail Consortium (BRC)* (Dan Cake, 2019b).

1.2. Contexto e objetivos do estágio

A segurança alimentar tem sido uma das exigências mais importantes para a indústria alimentar da atualidade, o que em parte se deve ao aumento do número de casos de doenças de origem alimentar, surgindo a necessidade de garantir que os alimentos não vão ser prejudiciais para a saúde do consumidor. Estima-se que cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos, como bactérias patogénicas, parasitas, vírus ou fungos (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE], 2019). Para esse efeito, o Regulamento (CE) n.º 853/2004 define que as empresas envolvidas nesta indústria devem assegurar o controlo dos seus produtos ao longo de toda a cadeia alimentar, adotando um sistema de gestão de segurança alimentar baseado na metodologia *Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP)*. Esta metodologia baseia-se na análise dos perigos e avaliação dos riscos com impacto na segurança alimentar, e na identificação de controlos preventivos e pontos críticos de controlo, de forma a eliminar, reduzir ou prevenir a ocorrência desses perigos (Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares [FIPA], 2002). Um sistema HACCP deve ser sustentado pelo cumprimento de

pré-requisitos e boas práticas de fabrico (Baptista & Antunes, 2005). Do conjunto de procedimentos que constituem os pré-requisitos, a higiene das instalações, equipamentos e utensílios onde se manipulam e preparam alimentos, bem como a higiene pessoal dos manipuladores de alimentos, são dos aspetos mais importantes (Castro, 2008). Deste modo, a “higiene de instalações, equipamentos e utensílios” e a “higiene pessoal” são dois dos pré-requisitos estabelecidos na empresa Dan Cake, nos quais são definidos métodos de controlo para diminuição ou eliminação das contaminações em ambiente fabril e, conseqüentemente, da contaminação dos produtos, sendo a eficácia da sua implementação monitorizada através de análises microbiológicas (Adams & Moss, 2000; Baptista, 2003). Na Dan Cake, o objetivo desta monitorização é efetuar um controlo periódico destes pré-requisitos, desencadeando ações corretivas e melhorias sempre que se verifique um resultado acima dos critérios de aceitação definidos pela análise de risco da empresa. Assim, este estágio teve como objetivo o acompanhamento da monitorização microbiológica realizada no âmbito dos pré-requisitos referidos, que servem de base para o Sistema HACCP/Plano de Segurança Alimentar implementado na Dan Cake.

Durante o desenvolvimento do estágio pretendeu-se atingir os seguintes objetivos: acompanhamento e realização de colheitas de amostras ambientais (i.e. de superfícies de mãos, fardas, instalações, equipamentos e utensílios) para análise microbiológica levada a cabo num laboratório externo; verificação dos boletins de análise emitidos pelo laboratório externo e interpretação dos resultados com base nos critérios de aceitação definidos; atualização do histórico interno dos resultados analíticos obtidos no âmbito da monitorização ambiental dos pré-requisitos “higiene das instalações, equipamentos e utensílios” e “higiene pessoal”; definição de ações corretivas no seguimento de resultados acima dos critérios de aceitação e acompanhamento das ações corretivas definidas, verificando a sua implementação e eficácia. A Tabela 1 apresenta o plano de atividades previstas no início do estágio:

Tabela 1 - Planificação e calendarização das atividades previstas no estágio a realizar na empresa Dan Cake. Células preenchidas a cor indicam os meses em que foi realizada cada atividade.


Tarefas/Atividades	out.	nov.	dez.	jan.	fev.	mar.	abr.	mai.
Pesquisa Bibliográfica.								
Acolhimento na empresa.								
Enquadramento na documentação referente ao sistema HACCP/Plano de Segurança Alimentar da empresa.								
Enquadramento na documentação referente ao Programa de Pré-Requisitos da empresa.								
Acompanhamento e realização de colheitas de amostras ambientais de superfícies (mãos, fardas, equipamentos e utensílios), água e ar.								
Verificação dos boletins de análise emitidos pelo laboratório externo e interpretação dos resultados com base nos critérios de aceitação definidos.								
Atualização do histórico interno dos resultados analíticos obtidos no âmbito da monitorização ambiental dos pré-requisitos “higiene de instalações, equipamentos e utensílios”, “qualidade da água”, “qualidade do ar” e “higiene pessoal”.								
Verificação de resultados acima dos critérios de aceitação e definição de ações corretivas no seu seguimento.								
Acompanhamento das ações corretivas definidas, verificando a sua implementação e eficácia.								

No entanto, o plano de atividades previsto sofreu alterações ao longo do estágio, como é possível verificar na Tabela 2, que representa o plano de atividades realizadas à data de fim de estágio e que serão descritas mais à frente. Nesta tabela, é possível observar que foram realizadas tarefas para outros departamentos da empresa que não estavam previstas inicialmente. Para além disso, algumas tarefas do âmbito do tema de estágio sofreram períodos de inatividade durante a interrupção nas atividades presenciais devido à situação pandémica da COVID-19.

Tabela 2 – Resumo das atividades realizadas no estágio na Dan Cake, até à data de término do mesmo. Células de cor cinzenta indicam os meses em que foi realizada cada atividade, e células a amarelo representam os períodos de inatividade para cada tarefa, impostas pela interrupção do estágio devido à pandemia COVID-19.

Tarefas/Atividades	out.	nov.	dez.	jan.	fev.	mar.	abr.	mai.
Pesquisa Bibliográfica.								
Acolhimento na empresa.								
Enquadramento na documentação referente ao sistema HACCP/Plano de Segurança Alimentar da empresa.								
Enquadramento na documentação referente ao Programa de Pré-Requisitos da empresa.								
Realização de colheitas de amostras ambientais a superfícies (mãos, fardas, equipamentos e utensílios).								
Verificação dos boletins de análise emitidos pelo laboratório externo e interpretação dos resultados com base nos critérios de aceitação definidos.								
Atualização do histórico interno dos resultados analíticos obtidos no âmbito da monitorização ambiental dos pré-requisitos “higiene de instalações, equipamentos e utensílios” e “higiene pessoal.								
Verificação de resultados acima dos critérios de aceitação e definição de ações corretivas no seu seguimento.								
Acompanhamento das ações corretivas definidas, verificando a sua implementação e eficácia.								
Acompanhamento de colheitas de amostras ambientais de água e ar.								
Levantamento das tarefas de higiene em falta, afetas à equipa de produção.								
Elaboração de ajudas visuais para incentivo ao cumprimento das Boas Práticas pelos colaboradores.								
Atualização de cadastros no âmbito do pré-requisito “gestão de vidros, plásticos e acrílicos”.								
Elaboração de etiquetas de produtos da empresa através de programa informático.								
Validação de design de artes finais de embalagens.								
Elaboração de ajudas visuais com recomendações aos colaboradores no âmbito do plano de contingência da doença COVID-19.								

 - meses em que foi realizada cada atividade;

 - períodos de inatividade impostos pela interrupção do estágio devido à pandemia COVID-19.

2. Introdução

2.1. Noções gerais de segurança alimentar

O conceito de segurança alimentar pode ser definido como uma necessidade de todas as pessoas, em todos os momentos, terem acesso físico, social e económico a alimentos suficientes, seguros e nutritivos que satisfaçam as suas necessidades nutricionais e

preferências alimentares para uma vida ativa e saudável (Robertson et al., 2004). A preocupação crescente, por parte da indústria alimentar, com a segurança e o controlo do fornecimento de alimentos surge de fatores como: o aumento do número de casos de doenças de origem alimentar; aparecimento de novos riscos graves na cadeia alimentar; globalização do comércio alimentar; mudanças demográficas; aumento de grupos vulneráveis e necessidade de procedimentos de avaliação de risco adequados para as novas tecnologias (*Food and Agriculture Organization* [FAO], 2003).

Em 1963, foi criada, pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial de Saúde (OMS), a Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC), com o intuito de assegurar práticas comerciais justas na área alimentar e promover a coordenação de todas as normas alimentares, sendo constituída atualmente por 188 países-membros e uma organização-membro (a União Europeia) (WHO & FAO, 2006b; Thow, 2019). O *Codex Alimentarius* consiste numa coleção de documentos, que inclui os códigos de boas práticas recomendadas, considerados essenciais para garantir a segurança dos alimentos (WHO & FAO, 2006b). Ao Código Internacional de Práticas e Princípios Gerais de Higiene Alimentar (cuja versão atual é o código CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003) foi incorporado, em 1999, a descrição da metodologia HACCP (Baptista et al., 2003). Deste modo, estes códigos de boas práticas incluídos no *Codex Alimentarius* funcionam como programas de pré-requisitos (PPR) para a implementação de um sistema HACCP, assegurando as condições operacionais e ambientais básicas necessárias para a produção de alimentos inócuos. Assim, os sistemas HACCP devem ser implementados sobre uma base sólida de cumprimento de pré-requisitos, tais como os que se encontram incluídos no âmbito das Boas Práticas de Fabrico (GMP – *Good Manufacturing Practices*) e das Boas Práticas de Higiene (GHP – *Good Hygiene Practices*) (Baptista et al., 2003; Baptista & Antunes, 2005; *World Health Organization* [WHO] & FAO, 2006b). Nesse sentido, e com base no documento *Codex Alimentarius*, a Comissão Europeia (CE) elaborou referências e regulamentos, como o Regulamento (CE) n.º 178/2002 e o Regulamento (CE) n.º 852/2004, que fornecem um conjunto de princípios e boas práticas a seguir, bem como os requisitos básicos a que as instalações alimentares devem obedecer. Portugal apresenta estes regulamentos como legislação-base obrigatória a seguir por todas as empresas do ramo alimentar, sendo a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) a entidade responsável pela definição, teste e aceitação do controlo legislativo dos alimentos. O Regulamento (CE) n.º 852/2004, o mais importante e adequado às atividades da Dan Cake e do presente estágio, estabelece as regras gerais destinadas aos colaboradores das empresas do sector alimentar no que se refere à higiene da produção e expedição dos géneros alimentícios, referindo também a obrigatoriedade legal na implementação de programas de segurança alimentar baseados em programas de pré-requisitos e nos princípios HACCP (ASAE, 2020; Baptista et al., 2003; Potes, 2005). Existe também a possibilidade, de carácter opcional, de implementar sistemas de gestão de qualidade e segurança alimentar baseados em normas internacionais, permitindo alcançar a uniformidade, normalização, e reconhecimento através da certificação, como é o caso da NP EN ISO 9001:2008 e ISO 22000, havendo ainda normas específicas para retalho em certos países, como a IFS e BRC

(Henriques, 2014; Pereira, 2010). A empresa Dan Cake desenvolveu um sistema/Plano de Segurança Alimentar que integra o programa de pré-requisitos, medidas de controlo e controlos preventivos desde a seleção/receção das matérias-primas e materiais de embalagem, passando pelas etapas de fabrico, até à expedição (Dan Cake, 2019a), utilizando assim como base o método HACCP e as normas IFS e BRC. Adicionalmente, enquanto exportador de produtos alimentares para os Estados Unidos da América (EUA), houve a necessidade de aplicar a norma *Food Safety Modernization Act* (FSMA), da *Food and Drug Administration* (FDA).

2.2. Tipos de perigos alimentares

De acordo com o relatório emitido pela OMS em 2015 intitulado “Estimativas da OMS da incidência global de doenças transmitidas por alimentos”, a nível mundial, foram detetados 31 perigos de origem alimentar causadores de 32 doenças. Juntos, os 31 perigos causaram 600 milhões de doenças transmitidas por alimentos e 420 000 mortes em 2010 (Havelaar et al., 2015). A CAC definiu o conceito de perigo em alimentos como qualquer propriedade biológica, física ou química, que possa tornar um alimento prejudicial para consumo humano (Baptista & Venâncio, 2003). Deste modo, os perigos alimentares podem ser agrupados em três categorias: químicos, físicos ou biológicos.

Os perigos químicos presentes nos alimentos podem ter uma ocorrência natural ou resultarem de uma adição durante o processamento do alimento. Nestes, incluem-se os contaminantes de origens industriais (dioxinas, metais pesados), toxinas produzidas por organismos vivos como fungos, algas e algumas plantas e frutos, contaminantes resultantes da tecnologia usada no processamento alimentar, resíduos de pesticidas, de medicamentos veterinários e de produtos que migram dos materiais em contacto com os alimentos (ASAE, 2020). Também os alergénios poderão ser considerados perigos químicos. São substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, podem desencadear alergias ou intolerância nos consumidores. Os principais alergénios alimentares são o amendoim, soja, nozes, leite, ovos, crustáceos, peixe e trigo (Flaherty, 2012). Na Dan Cake, consideram-se como perigos químicos: aditivos; produtos de higienização; produtos de manutenção de equipamentos; alergénios; resíduos de pesticidas, medicamentos veterinários e organismos geneticamente modificados; e perigos radiológicos.

Os perigos físicos resultam da inclusão inadvertida de materiais estranhos prejudiciais no produto final, com potencial para induzir ferimentos ou doenças. Este tipo de perigo pode causar lesões mecânicas no aparelho digestivo (e.g. quebra de dentes, cortes ou perfuração de mucosas). Existe também o risco de asfixia através da deglutição de um alimento (ou seu constituinte) e bloqueio das vias respiratórias (ASAE, 2020). As principais fontes de riscos físicos podem incluir o ambiente de produção, matérias-primas e ingredientes, equipamentos da fábrica e funcionários. As estratégias adotadas para o controlo de materiais estranhos geralmente incluem inspeção visual, deteção de metais, uso de íman, sistemas de visão automatizados, tecnologia de raios-X, filtros e peneiras (Keener, 2001). A Dan Cake

considera como perigos físicos relevantes: as matérias estranhas associadas às matérias-primas; objetos e peças de equipamentos, operadores e do meio ambiente. Para o controlo destes perigos, a empresa dispõe de filtros e detetores de metais.

Os perigos biológicos são o tipo de perigo que representa maior risco à inocuidade dos alimentos, estimando-se que cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos, como bactérias patogénicas, parasitas, vírus e fungos (ASAE, 2020). Uma vez que maioria dos alimentos são meios ótimos para o desenvolvimento de microrganismos, devido a fatores como, por exemplo, o seu conteúdo em nutrientes e à sua atividade de água (a_w), estes permanecem e desenvolvem-se nos alimentos, que se tornam num veículo de transmissão de doenças (Baptista & Venâncio, 2003; Forsythe, 2011). Os fatores que afetam o crescimento de microrganismos em produtos Dan Cake, assim como a sua fonte em ambiente fabril, serão descritos no ponto 2.2.1. e 2.2.2, respetivamente.

As bactérias são seres-vivos unicelulares, com estrutura simples, e replicam-se rapidamente em condições favoráveis de nutrientes, temperatura, pH, humidade e oxigénio, sendo ao mesmo tempo capazes de rápida adaptação a ambientes menos favoráveis (ASAE, 2020). As bactérias patogénicas são os microrganismos que apresentam maior prevalência em doenças de origem alimentar, causando doenças que vão desde cólicas a morte, sendo exemplos disso *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia* spp., *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. e *Listeria monocytogenes* (Fu et al., 2016; Safavieh et al., 2015).

Ao grupo dos fungos pertencem os bolores e as leveduras. Em condições ácidas e de baixa a_w (como cereais, alimentos salgados, alimentos acidificados e alimentos secos), a sua velocidade de propagação é maior do que a das bactérias, e o risco associado a este perigo deve-se à produção de micotoxinas em alguns géneros, como é o caso de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. No entanto, este perigo está mais frequentemente associado à deterioração rápida dos produtos, tornando-os impróprios para consumo (Baptista & Venâncio, 2003; Forsythe & Hayes, 1998; *United States Department of Agriculture* [USDA], 2012). Estes mecanismos de deterioração serão descritos com maior detalhe na seção 2.2.3.

Os vírus são agentes infecciosos com uma organização acelular muito simples: uma cápsula proteica e um ácido nucleico no seu interior, que poderá ser ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA). Para se multiplicarem, requerem que uma célula viva específica lhes sirva de hospedeiro, o que os torna parasitas intracelulares obrigatórios, não se reproduzindo nos alimentos. No entanto, a sua destruição apenas ocorre se o alimento for devidamente cozinhado (Baptista & Venâncio, 2003; ASAE, 2020). Os principais vírus de origem alimentar serão descritos no ponto 2.6. desta dissertação.

Os parasitas, como vermes (pluricelulares) e protozoários (unicelulares), são organismos que vivem sobre ou no interior de outro organismo para o qual são específicos (o hospedeiro), beneficiando desta associação enquanto prejudicam o hospedeiro, do qual geralmente obtêm

nutrientes (ASAE, 2020). Os animais são, normalmente, hospedeiros destes parasitas, podendo transmiti-los ao homem através do consumo da sua carne, ou pelo contacto com animais, na sua maioria domésticos. Desta forma, os parasitas transportados por manipuladores de alimentos serão transmitidos a esses alimentos e, finalmente, propagados aos consumidores dos produtos alimentares manipulados, se se der o caso de estes não sofrerem qualquer processamento térmico. Entre os principais parasitas causadores de doenças de origem alimentar, encontram-se: *Toxoplasma gondii*, *Taenia saginata*, *Giardia lamblia*; *Fasciola hepática*, *Cyclospora cayentanensis*, etc. (Baptista & Venâncio, 2003; USDA, 2012).

A empresa Dan Cake considera como perigos biológicos presentes em ambiente fabril, i.e, em superfícies de equipamentos e mãos/fardas de colaboradores, as bactérias patogénicas *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli* e, como agentes gerais de deterioração dos produtos, bolores e leveduras. Estes perigos biológicos foram os principais alvos de estudo do presente estágio. Deste modo, os motivos para a escolha destes microrganismos como perigos biológicos, assim como as características destes microrganismos, serão descritos com maior detalhe de seguida.

Os microrganismos patogénicos causam doença de origem alimentar em humanos através de três mecanismos distintos: infeção, intoxicação e infeções mediadas por toxinas (Baptista & Venâncio, 2003).

As infeções são causadas pela ingestão de alimentos que contêm microrganismos vivos prejudiciais. O microrganismo multiplica-se nos alimentos até atingir a dose mínima infecciosa (DMI), que corresponde ao número de microrganismos necessários para causar doença nos seres humanos (USDA, 2012). Após a ingestão, algumas bactérias resistem ao ambiente ácido do estômago e passam para o intestino delgado, infetando a superfície do intestino e podendo até invadir outras estruturas do corpo. A maioria das infeções alimentares resulta em diarreia e desconforto abdominal. *Salmonella*, *L. monocytogenes* e algumas estirpes patogénicas de *E. coli* (como será descrito em maior pormenor mais à frente) são exemplos de microrganismos analisados na Dan Cake que causam doença em humanos através do mecanismo de infeção. Alguns dos fatores que influenciam as infeções incluem: o estado imunológico do hospedeiro - imunodeprimido ou imunocompetente; a eficiência do organismo patogénico em ligar-se e penetrar nos tecidos-alvo; o número de organismos patogénicos que entram no corpo (ASAE, 2020; Baptista & Venâncio, 2003; USDA, 2012).

As intoxicações são causadas pela ingestão de alimentos que contêm toxinas libertadas por microrganismos patogénicos, que permanecem nos alimentos mesmo que estes microrganismos que estão na sua origem tenham sido eliminados. A ingestão de alimentos que contêm toxinas perturba um alvo específico, como o trato gastrointestinal ou o sistema nervoso. Os sintomas de intoxicação variam desde vômito e diarreia a funções musculares gravemente comprometidas. Exemplos deste mecanismo são a enterotoxina de *S. aureus* e

as micotoxinas (dos fungos), sendo ambos os microrganismos analisados na Dan Cake (Baptista & Venâncio, 2003; USDA, 2012).

Por último, as infecções mediadas por toxinas são causadas pela ingestão de alimentos contendo uma determinada quantidade de microrganismos patogênicos capazes de produzir ou libertar toxinas quando ingeridos, sendo algumas estirpes patogênicas de *E. coli* um exemplo desse mecanismo, como será detalhado mais à frente (Baptista & Venâncio, 2003; ASAE, 2020).

2.2.1. Fatores que afetam o crescimento dos microrganismos

Variados fatores promovem, previnem ou limitam o crescimento de microrganismos em produtos alimentares. Estes podem ser divididos em dois grupos: intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos referem-se a propriedades físico-químicas do próprio alimento, como por exemplo a a_w , o pH, o conteúdo em nutrientes, a existência de constituintes antimicrobianos e o potencial de oxidação-redução (E_h). Os fatores extrínsecos prendem-se com as condições de processamento ou ao ambiente de armazenamento, como é o caso da temperatura, da humidade relativa e da composição atmosférica (Forsythe, 2011). Como fatores mais importantes para o presente estágio, uma vez que se aplicam especificamente aos produtos Dan Cake e influenciam os microrganismos em estudo, destacam-se a a_w , a temperatura e a humidade relativa.

A a_w é o parâmetro que mede a disponibilidade de água num alimento. Define-se como a relação que existe entre a pressão de vapor de um alimento (P) e a pressão de vapor de água pura à mesma temperatura (P_0), que é traduzida pela expressão $a_w = P/P_0$. A um alimento totalmente desidratado corresponde um valor de a_w de 0,00 e, a uma solução de água pura, um valor de a_w de 1,00 (Forsythe, 2011). A Figura 2 apresenta, entre outras informações, a velocidade de crescimento de microrganismos em função do valor de a_w :

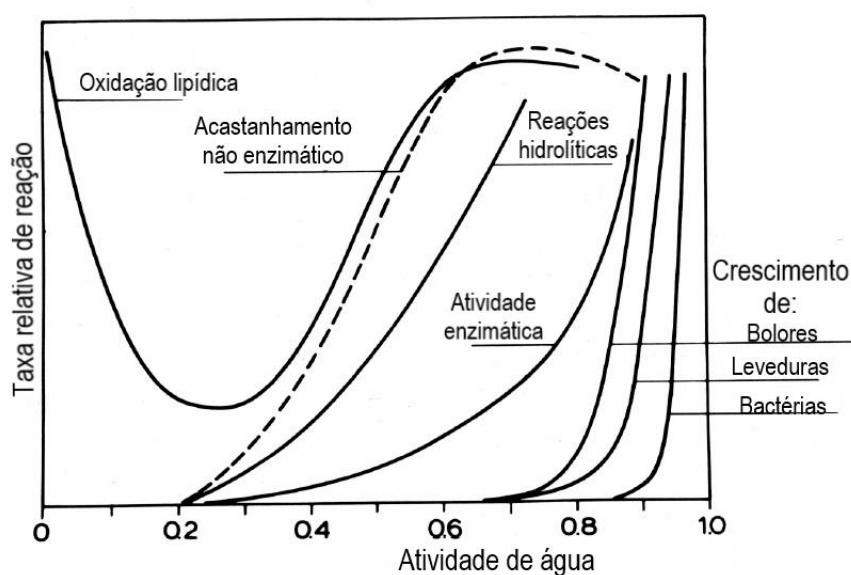


Figura 2 – Taxas de crescimento de microrganismos em alimentos em função da sua atividade de água (Adaptado de van den Berg & Bruin, 1981).

Para valores abaixo da a_w mínima para crescimento, as bactérias poderão não morrer, ficando dormentes e, desta forma, infecciosas. A a_w tem sido amplamente utilizada como fator de preservação, através do sal (em carne e peixe) e açúcar (na confecção de compotas) (Forsythe, 2011). Quando a a_w é inferior a 0.85, o crescimento da maioria das bactérias patogênicas encontra-se controlado, ao contrário dos bolores e leveduras, que têm capacidade de se desenvolver em valores de a_w inferiores (Baptista & Linhares, 2005).

No que diz respeito à sua temperatura ótima de crescimento, os microrganismos podem ser agrupados em quatro grupos principais: termófilos, cuja temperatura ótima se situa entre 40°C e 65°C; mesófilos, com temperatura ótima situada entre 20°C e 40°C, sendo o grupo em que se encontra a maioria dos microrganismos patogênicos; psicrófilos, que apresentam um bom crescimento a 0°C, sendo que a sua temperatura ótima se encontra em valores iguais ou inferiores a 15°C; psicotróficos, microrganismos com bom crescimento a temperaturas entre 0°C e 7°C, cuja temperatura ótima está entre 20°C e 30°C (Choi, 2013; Baptista & Venâncio, 2003). O crescimento bacteriano pode ser controlado através da manutenção dos alimentos a temperaturas acima ou abaixo da gama de temperaturas de crescimento das bactérias. Assim, os métodos que podem ser usados para controlar o crescimento de microrganismos são a refrigeração, congelamento ou a permanência do alimento a uma temperatura elevada. No entanto, a forma mais eficaz de controlar os microrganismos de forma definitiva é a sua morte através do calor. O mesmo não acontece com as temperaturas baixas, visto que a congelação não causa a destruição dos microrganismos, mantendo-os apenas num estado inativo (Baptista & Venâncio, 2003; USDA, 2012).

A humidade relativa corresponde ao rácio entre a quantidade de vapor de água presente no ar (humidade absoluta) e a quantidade máxima de vapor que esse ar pode reter (ponto de saturação) à mesma temperatura. Se um alimento com baixa a_w for armazenado num ambiente com alta humidade relativa, a água é transferida do ambiente gasoso para o alimento, aumentando a sua a_w (Baptista & Venâncio, 2003). No início deste processo, ocorre condensação na superfície do alimento, criando pontos localizados de alta a_w . Nestes pontos, os microrganismos que permaneceram viáveis, mas incapazes de crescer, podem agora germinar e crescer. Desta forma, produzem água como um produto final da respiração, aumentando assim a a_w do seu ambiente próximo, de modo a que eventualmente microrganismos que exigem elevada a_w sejam capazes de crescer e deteriorar alimentos que foram inicialmente considerados microbiologicamente estáveis (Adams & Moss, 2000).

Na Tabela 3, descrevem-se os principais fatores para o desenvolvimento dos principais microrganismos patogênicos associados a alimentos:

Tabela 3 - Principais fatores para o desenvolvimento dos principais microrganismos patogênicos em alimentos (Adaptado de Baptista e Venâncio, 2003; ASAE, 2020). Os microrganismos mais relevantes para o presente trabalho estão indicados a negrito.

Perigos Biológicos	Temperatura (°C)		a _w Mín
	Mín	Máx	
<i>E. coli</i>	7,0	46,0	0,95
<i>L. monocytogenes</i>	-0,4	45,0	0,92
<i>Salmonella spp.</i>	5,0	47,0	0,94
<i>S. aureus</i> (células)	7,0	48,0	0,83
<i>S. aureus</i> (toxina)	10,0	46,0	0,88
<i>B. cereus</i>	5,0	55,0	0,93
<i>Campylobacter jejuni</i>	32,0	45,0	0,98
<i>Clostridium botulinum</i>	3,0	50,0	0,93
<i>Clostridium perfringens</i>	12,0	50,0	0,94
<i>Shigella spp.</i>	7,0	47,0	0,97

Todos os alimentos produzidos na Dan Cake, pela natureza da sua composição, processamento, e características físicas e químicas, pertencem a uma categoria de produtos raramente associados a toxinfecções alimentares. São maioritariamente produtos com baixa a_w, e o seu processo de fabrico envolve altas temperaturas de forno, o que os torna microbiologicamente estáveis desde que permaneçam em ambientes secos. Os ingredientes adicionados após a saída do forno poderão afetar o estado microbiológico do produto. No entanto, os valores baixos de a_w destes ingredientes (doces, geleias, cremes) torna-os igualmente estáveis em termos microbiológicos.

2.2.2. Fontes de contaminação microbiológica dos alimentos

Os patogênicos transmitidos por alimentos podem entrar nos produtos em fábricas de processamento de alimentos através de três mecanismos: pelas matérias-primas, colaboradores ou pelo próprio ambiente fabril (USDA, 2012).

As matérias-primas podem estar contaminadas com patogênicos e causar doenças se forem adicionadas aos produtos após tratamentos de letalidade. A flora microbiana de matérias-primas que entram numa fábrica de alimentos pode ser controlada através de fornecedores com boa reputação, certificados de qualidade, monitorização da temperatura na receção, etc. (USDA, 2012; Forsythe, 2011).

As mãos e as roupas dos indivíduos que manipulam alimentos podem conter microrganismos que refletem o ambiente e os hábitos de higiene, podendo ter origem no trato gastrointestinal, solo, água, poeira, etc. Posteriormente, a falta de higiene pessoal, como a lavagem inadequada ou inexistente das mãos após ida às instalações sanitárias, pode levar ao aparecimento de patogênicos sob as unhas, levando à contaminação do produto manuseado. Os manipuladores de alimentos têm uma forte contribuição para surtos de doenças de origem alimentar, devendo-se sobretudo ao transporte de bactérias como *Salmonella spp.*, *S. aureus* e *E. coli* (USDA, 2012; Forsythe, 2011; Adams & Moss, 2000).

No que diz respeito ao ambiente fabril, o ar e as poeiras que se movem pelas instalações de processamento podem transportar uma grande variedade de patogênicos, sendo exemplo disso *L. monocytogenes*. Muitas bactérias são também transportadas pelo solo e pela água, o que pode contaminar os alimentos. Estas incluem, entre outros, bactérias dos gêneros *Listeria*, *Salmonella* e *Escherichia* (USDA, 2012). As superfícies de utensílios e equipamentos podem adquirir microrganismos e outros detritos provenientes não só do ar, como também de operadores e de materiais utilizados na área de produção (Marriott et al. 2018). Como as matérias-primas também podem ser uma fonte de contaminação, os equipamentos podem reter produtos contaminados e levar à formação de biofilmes quando não são limpos ou mantidos adequadamente e, por isso, servem como vetor para contaminação cruzada (USDA, 2012; Forsythe, 2011).

2.2.3. Microrganismos com origem no ambiente fabril

Alguns microrganismos, desde patogênicos, indicadores e deterioradores de alimentos, estão tipicamente presentes no ambiente de processamento de alimentos e são importantes em atividades de avaliação da segurança, higiene e qualidade sanitária de alimentos e ambientes de processamento, atividades essas que serão detalhadas mais à frente (Beno et al., 2016). As bactérias patogênicas *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* são das mais propícias a estarem presentes no ambiente de processamento de alimentos, pois têm sido dos microrganismos mais detetados em alimentos prontos-a-comer. Por outro lado, *E. coli* é indicadora de ocorrência de contaminações de origem fecal, enquanto bolores e leveduras são indicadores de microrganismos de deterioração de alimentos (Forsythe, 2011). Deste modo, o estudo incidiu especificamente nestes microrganismos, sobre os quais se procede de seguida a uma breve descrição.

Salmonella spp. é um microrganismo patogênico entérico associado ao trato intestinal de muitos animais. Devido a práticas de higiene incorretas durante a produção de alimentos, principalmente de carne de animais para consumo, ovos e leite, estes podem ser contaminados ao contactarem com matéria fecal de animais infetados. Seguidamente, estes alimentos podem contaminar equipamentos e superfícies de ambientes de processamento de alimentos, quando limpos e desinfetados de forma inadequada, e assim funcionar como fonte da bactéria (ASAE, 2020). Esta não forma esporos e, por isso, é relativamente sensível a temperaturas altas, podendo ser destruída a 60°C em 15 a 20 minutos (Chaves et al., 2016). No entanto, pode sobreviver em condições de seca extrema por longos períodos (Podolak et al., 2010; Van Doren et al., 2013).

As doenças causadas por *Salmonella* podem ser subdivididas em três grupos: a febre tifóide, tendo como agente o serotipo *Salmonella typhi*; a febre entérica, que é causada por *Salmonella paratyphi*, e as enterocolites ou salmoneloses, causadas pelos restantes serotipos de *Salmonella*, como *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Virchow*, entre outras. No caso da salmonelose, é reconhecida como uma das principais infeções transmitidas pelo consumo de alimentos (Cardoso e Carvalho, 2006; ASAE, 2020). No ano de 2018, de acordo com o relatório anual de zoonoses da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

(EFSA), *Salmonella* spp. foi o patogénico responsável pelo maior número de casos de doenças de origem alimentar na população da União Europeia, com 11 581 casos reportados, causando o segundo maior número de mortes (8 mortes). Em Portugal, no mesmo ano, ocorreram 302 casos de salmonelose (EFSA & *European Centre for Disease Prevention and Control* [ECDC], 2019), o que faz de *Salmonella* spp. um patogénico de elevada importância para a Dan Cake e, consequentemente, para o presente estágio.

A bactéria *L. monocytogenes* é um microrganismo patogénico de distribuição ubiqüitária. Pode sobreviver por longos períodos no ambiente (solo, planta e água), multiplicar-se a baixas temperaturas (até -0,4°C), o que faz com que tenha potencial para crescer em alimentos em armazenamento refrigerado e sobreviver por longos períodos em alimentos congelados (Ryser & Buchanan, 2013; Vivant et al., 2013; ASAE, 2020). *L. monocytogenes* é um patogénico transmitido por alimentos tipicamente associado à contaminação de alimentos prontos-a-comer através do ambiente de processamento, podendo ser encontrada em equipamentos, utensílios, seres humanos, na água, no ar, etc., e pode formar biofilmes, que servem como capas protetoras. Uma vez formados, os biofilmes podem persistir por longos períodos (anos), são muito difíceis de remover e fornecem proteção contra produtos químicos usados para limpeza e higienização de superfícies, congelamento, secagem e calor (ASAE, 2020; USDA, 2012; Beno et al., 2016). A amostragem deste microrganismo patogénico em superfícies ambientais é feita sobretudo em ralos de chão visto que estão geralmente localizados em lugares centrais de todas as zonas de produção. Para além disso, os microrganismos (incluindo patogénicos) associados aos alimentos que estejam presentes quer em superfícies de contato com alimentos, quer em superfícies sem contato com alimentos, poderão deslocar-se para os ralos após a higienização destas superfícies (Dzienciol et al., 2016; Stessl et al., 2020). Outro motivo é a presença contínua de humidade e matéria orgânica nos ralos, condições ideais para a proliferação de *L. monocytogenes* (Saini et al., 2012). Este patogénico humano causa listeriose, doença que tem maior impacto nos grupos de risco, nomeadamente em idosos, mulheres grávidas (o resultado da exposição do feto ao patogénico resulta em aborto espontâneo, nadomorto ou sepsis neonatal), diabéticos, pessoas em diálise renal e imunocomprometidos. Dados epidemiológicos existentes sugerem que a sua DMI seja elevada (ASAE, 2020; USDA, 2012). No ano de 2018, de acordo com a EFSA, *L. monocytogenes* foi o patogénico transmitido por alimentos responsável pelo maior número de mortes (21 mortes), tendo também a maior taxa de mortalidade, com 13.2 mortes por cada 100 casos de infeção. Em Portugal, houve 64 casos de listeriose no ano de 2018 (EFSA & ECDC, 2019). Assim, estes factos tornam este patogénico importante para a indústria alimentar, em particular para a Dan Cake e para o presente estágio.

A importância da monitorização de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em superfícies de instalações de processamento de alimentos prontos-a-comer expostos ao meio ambiente foi reconhecida pela norma FSMA, da FDA dos EUA (Beno et al., 2016). A Dan Cake tornou-se recentemente uma empresa também regulada pela FDA e, por isso, a monitorização destes

patogénicos é de extrema importância para a empresa e, conseqüentemente, para o presente estágio.

A bactéria *S. aureus* é um microrganismo patogénico que existe no ar, poeiras, esgotos, água, ou leite, e em equipamentos de produção alimentar, superfícies ambientais, seres humanos e animais. Está associada às membranas mucosas (nariz e garganta) e é geralmente encontrada na pele e cabelos de humanos e animais saudáveis, em feridas, lesões e furúnculos infectados em humanos e animais, disseminando-se facilmente pelo ar através de tosse e espirros. Assim, manipuladores de alimentos, equipamentos e superfícies ambientais são, geralmente, as principais fontes de surtos de intoxicação alimentar por contaminação por *S. aureus* (USDA, 2012; Ayçiçek et al., 2005; Genigeorgis, 1989). A intoxicação alimentar por este patogénico é causada pelo consumo de uma enterotoxina produzida por certas estirpes de *S. aureus*. Apesar de os microrganismos serem destruídos pelo calor e por quase todos os agentes desinfetantes, a sua toxina é estável a temperaturas elevadas. Por isso, as contagens totais de *S. aureus* podem não indicar se a toxina está presente. A destruição da enterotoxina é obtida por tratamento a 100°C durante 30 minutos (ASAE, 2020; USDA, 2012).

Intoxicação alimentar por *S. aureus* é das intoxicações alimentares mais prevalentes a nível mundial. Na Europa, o número de surtos de intoxicação por *S. aureus* está a aumentar, com 434 surtos em 2015, o que equivale a 10% de todos os surtos relatados nesse ano (EFSA & ECDC, 2016). Os alimentos que requerem uma manipulação considerável durante a preparação estão frequentemente envolvidos na intoxicação alimentar por *S. aureus*, sendo os manipuladores de alimentos, equipamentos e superfícies ambientais as principais fontes de surtos de intoxicação alimentar por contaminação por este patogénico (USDA, 2012; Genigeorgis, 1989). Por estes motivos, *S. aureus* é uma bactéria frequentemente isolada em estudos sobre contaminação de alimentos pelas mãos de manipuladores (Litz et al., 2007; Millezi et al., 2007). Deste modo, na Dan Cake, é importante a quantificação desta bactéria patogénica nas mãos e fardas de colaboradores após a sua higienização.

A bactéria *E. coli* é uma habitante universal do intestino humano e de outros animais (Adams & Moss, 2000). A maioria das estirpes de *E. coli* não representa perigo para o seu hospedeiro. No entanto, algumas estirpes são consideradas patogénicas associadas ao consumo de alimentos, causando diarreia, sendo classificadas com base nos seus fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, síndromas clínicos e serologia. Assim, distinguem-se quatro estirpes de *E. coli*: *E. coli* enteropatogénicas (EPEC), que têm a capacidade de colonizar o intestino, onde causam lesões nas microvilosidades, não havendo evidência da invasão dos tecidos; *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), que colonizam o intestino através das fímbrias, tendo capacidade de produzir toxinas; *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), que atuam na mucosa do cólon, invadindo as células epiteliais, multiplicando-se e, eventualmente, causando uma úlcera no intestino; e, por fim, *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), onde se inclui *E. coli* O157:H7, que produzem toxinas citotóxicas para as células vero (rim do macaco verde africano), as verotoxinas, também chamadas toxinas *Shiga-like*. Aparentemente, as EHEC colonizam o trato intestinal e produzem a(s) verotoxina(s) que são ativas no cólon (ASAE,

2020; Adams & Moss, 2000). Manipuladores de alimentos contaminados têm sido frequentemente responsáveis por surtos causados por EPEC, EIEC and ETEC (Adams & Moss, 2000). Em 2018, as estirpes patogênicas de *E. coli* foram responsáveis por 621 casos de doença transmitida por alimentos, não resultando em nenhuma morte (EFSA & ECDC, 2019).

A presença comum de *E. coli* nas fezes, o seu fácil cultivo e o caráter geralmente não patogênico levaram à adoção de *E. coli* como um indicador de contaminação fecal e da possível presença de patogênicos entéricos (Adams & Moss, 2000). Estes motivos dão também relevância ao seu isolamento em amostras de mãos (Ayçiçek et al., 2004). Assim, é importante para a indústria alimentar e, particularmente, para a Dan Cake e para o presente estágio, quantificar esta bactéria em análises feitas às superfícies de equipamentos, mãos e fardas de colaboradores, como será detalhado mais à frente.

A deterioração dos alimentos é um processo metabólico que faz com que os alimentos fiquem indesejáveis ou inaceitáveis para o consumo humano devido a alterações nas características sensoriais. Os alimentos estragados podem ser seguros para comer, ou seja, podem não causar doenças por não conterem patogênicos ou toxinas, mas as alterações na textura, cheiro, sabor ou aparência fazem com que sejam rejeitados (Rawat, 2015). Os bolores e leveduras são dos microrganismos de deterioração mais problemáticos. Os bolores são organismos multicelulares que formam filamentos tubulares semelhantes a raízes - as hifas - cujo conjunto forma o micélio de uma colônia. Na maioria dos bolores, uma parte do micélio penetra no produto alimentar e absorve os nutrientes, enquanto que outras hifas permanecem superficialmente, acima do substrato (Forsythe & Hayes, 1998; Lacasse, 1995). As leveduras são corpos vivos microscópicos unicelulares, geralmente em forma de ovo, que têm a capacidade de deteriorar alimentos ricos em açúcar (como é o caso de *Saccharomyces*) (Rost, 2006; Forsythe, 2011). A quantificação de bolores e leveduras em superfícies de equipamentos é de grande importância para o presente estágio, para monitorização da eficácia dos procedimentos de higienização na fábrica, como será descrito a seguir.

2.3. Risco alimentar e análise de risco

O *Codex Alimentarius* define perigo como “um agente biológico, químico ou físico em alimentos, com potencial de causar um efeito adverso à saúde”, e risco como “uma função da probabilidade de um efeito adverso à saúde e da severidade desse efeito, como consequência de perigos em alimentos” (CAC, 2006). A análise de risco é usada para desenvolver uma estimativa dos riscos para a saúde e segurança humana, para identificar e implementar medidas apropriadas para controlar os riscos e para comunicar com as partes interessadas os riscos e medidas aplicadas (WHO & FAO, 2006a). A análise de risco foi definida pela CAC como um processo que consiste em três componentes: avaliação de riscos, gestão de riscos e comunicação de riscos (CAC, 2006). A Figura 3 representa o processo de análise de risco, deixando claro que existe uma separação funcional dos três componentes e, ao mesmo tempo, uma necessidade de comunicação e interação entre os responsáveis de cada um deles (WHO, 2009):

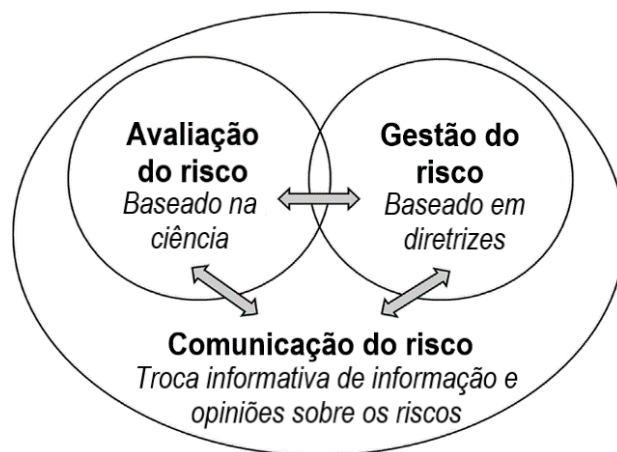


Figura 3 - Esquema representativo da interação entre os três componentes da análise de risco (Adaptado de Abt et al., 2010).

A avaliação de riscos é um processo com base científica que consiste nas seguintes etapas: identificação de perigos, caracterização de perigos, avaliação da exposição e caracterização de riscos (CAC, 2006).

A gestão de riscos é o processo, distinto da avaliação de riscos, de ponderação de alternativas em consulta com todas as partes interessadas. Considera a avaliação de riscos e outros fatores relevantes para a proteção da saúde dos consumidores e para a promoção de práticas de comércio justo e, por fim, a seleção de opções apropriadas de prevenção e controle (CAC, 2006).

A comunicação de risco é a troca interativa de informações e opiniões acerca do risco e fatores relacionados com o risco entre avaliadores e gestores de risco, consumidores, indústria, comunidade acadêmica e outras partes interessadas. Neste processo inclui-se a explicação de resultados da avaliação de risco e a base das decisões de gestão de riscos (CAC, 2006).

2.4. Sistema de Análise de Perigos e Controle de Pontos Críticos (*Hazard Analysis and Critical Control Points*)

O sistema de HACCP é um sistema preventivo que visa garantir a segurança dos alimentos, identificando perigos específicos associados a alimentos ou bebidas e estabelecendo sistemas de controle para esses perigos, com foco na prevenção (Pardo et al., 2013). Foi desenvolvido pela *Pillsbury Corporation*, nos anos 60, devido à necessidade da *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) garantir a segurança dos alimentos fornecidos nas primeiras viagens tripuladas ao espaço, combinando princípios de microbiologia dos alimentos com a avaliação de perigos físicos e químicos durante o processo produtivo (FIPA, 2002).

Este sistema baseia-se em considerar as diversas etapas da produção de alimentos, analisar os potenciais perigos à saúde dos consumidores e determinar medidas preventivas para os controlar. Entre as suas vantagens, está uma maior satisfação do consumidor, o aparecimento de empresas mais competitivas, a possibilidade de conquista de novos mercados nacionais e internacionais e a redução de perdas de matérias-primas, embalagens e produtos (FIPA,

2002). De acordo com o *Codex Alimentarius*, o sistema HACCP é baseado em sete princípios, como descrito na Tabela 4:

Tabela 4 - Princípios da metodologia de HACCP (Adaptado de Baptista et al., 2003).

Princípios	Descrição
1	Análise de perigos
2	Determinação dos PCC*, usando a árvore de decisão
3	Estabelecimento dos limites críticos
4	Estabelecimento do sistema para monitorizar os PCC
5	Estabelecimento de ações corretivas
6	Verificação para confirmar que o sistema funciona eficazmente
7	Registo das informações, procedimentos e registos

*PCC – Pontos Críticos de Controlo.

Para a elaboração de um plano de HACCP, planeia-se a aplicação dos sete princípios mencionados, aos quais se adicionam cinco passos preliminares: formação da equipa HACCP, descrição do produto e processo, identificação do uso pretendido, elaboração do fluxograma e verificação do fluxograma (Baptista et al., 2003).

2.5. Programas de pré-requisitos

O Regulamento (CE) n.º 852/2004 exige que os operadores das empresas do setor alimentar cumpram requisitos gerais de higiene, denominados GHP e GMP. A junção destes requisitos representa os PPR, a base da estrutura onde o sistema HACCP será implementado, sendo necessária a implementação dos PPR antes da aplicação dos procedimentos baseados no HACCP (CE, 2016). Os PPR controlam os perigos associados a todas as áreas da empresa (serviços, pessoal, instalações e equipamentos), enquanto que o sistema HACCP controla os perigos associados diretamente ao processo, ou seja, às etapas pelas quais os alimentos passam (desde a zona de confeção à zona de armazenamento ou distribuição) e que revelem um grau de risco significativo (Araújo, 1997). Deste modo, os PPR são estabelecidos e geridos separadamente do plano HACCP (CE, 2016). Para cumprir com os requisitos legais, um PPR deve estabelecer regras quanto à construção de instalações, ventilação, iluminação, qualificação e avaliação de fornecedores, especificações de matérias-primas, equipamentos, higienização, higiene pessoal, receção, armazenamento e expedição, rastreabilidade, controlo de pragas, remoção de resíduos, abastecimento de água e instalações sanitárias (Baptista et al., 2003). As áreas abrangentes destes pré-requisitos estão sumariadas na Figura 4:

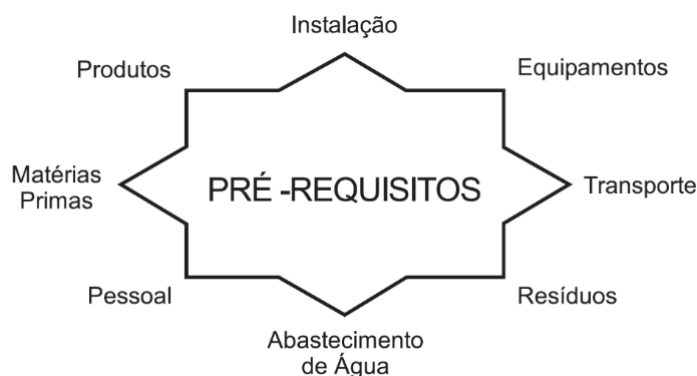


Figura 4 - Áreas abrangidas pelo programa de pré-requisitos (adaptado de Baptista et al., 2003).

No caso da empresa Dan Cake, estão já implementados os seguintes pré-requisitos: instalações; higiene de instalações e equipamentos; qualidade da água; qualidade do ar; controlo de pragas; higiene pessoal; gestão de vidros, plásticos e acrílicos; manutenção; alergénios; matérias-primas e materiais de embalagem; rastreabilidade e defesa dos alimentos. Os métodos de controlo descritos nas secções seguintes são a forma mais eficaz de controlar a qualidade microbiológica dos produtos alimentares, uma vez que intervêm nas fontes de contaminação durante o processo de produção e são frequentemente considerados como códigos de boas práticas de higiene e de fabrico, fazendo assim parte de um PPR (Adams & Moss, 2000). Estes pré-requisitos estão também implementados na empresa e foram o principal objeto de estudo no presente estágio, visto que a sua eficácia pode ser validada e monitorizada através de análises microbiológicas, como será comprovado mais à frente.

2.5.1. Higiene pessoal e formação

A literatura recomenda que todos os cortes, feridas e outras lesões cutâneas devem ser cobertas com curativos à prova de água. Para não excluir portadores de *S. aureus* de zonas de produção, uma vez que 30-40% dos seres humanos transportam naturalmente esta bactéria, estes devem usar luvas e adotar medidas de boa higiene, como evitar limpar o nariz com as luvas. Os manipuladores de alimentos devem ser treinados nos princípios básicos de higiene pessoal e alimentar, nos conceitos básicos de origem, disseminação e crescimento de bactérias, ou adquirir conhecimento sobre microrganismos como a principal causa de deterioração de alimentos e doenças de origem alimentar. Devem existir métodos para realizar a higiene pessoal, e os colaboradores devem ser incentivados a lavar as mãos (Adams & Moss, 2000; Forsythe, 2011). Não é possível desinfetar a pele da mesma forma que são desinfetadas as superfícies de equipamentos alimentares e, desta forma, as mãos são um meio potencial de transferência de microrganismos para alimentos. Assim, os três principais procedimentos para tratamento de contaminação microbiológica das mãos são: lavagem de mãos social, a lavagem higiénica (ou antisséptica) e a desinfecção higiénica das mãos (Kampf & Kramer, 2004).

A lavagem de mãos social consiste na limpeza das mãos com uma barra de sabão simples ou sabão líquido e água, para remoção de sujidade e várias substâncias orgânicas. Normalmente, os sabonetes são produtos à base de detergente e não contêm nenhum ingrediente ativo com atividade antimicrobiana. O uso de água e sabão comum reduz parte da flora das mãos residente, removendo mecanicamente microrganismos pouco aderentes às mãos, no entanto, estes produtos não apresentam um efeito real naqueles microrganismos (Yamamoto et al., 2005; Kampf & Kramer, 2004). A lavagem antisséptica das mãos consiste na limpeza das mãos com água e sabão antimicrobiano, que contém um agente antimicrobiano ativo e, geralmente, está disponível na forma de preparações líquidas. O agente mais utilizado é a clorexidina, na concentração de 2% ou 4%, existindo sob a forma de sais de acetato (diacetato), hidrocloreto e gluconato (Russell & Day, 1993; McDonnell & Russell, 1999), cuja estrutura química está representada na Figura 5:

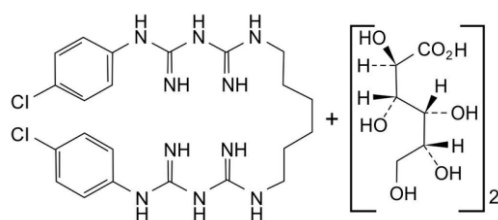


Figura 5 – Estrutura química de digluconato de clorexidina (Adaptado de Fiorentino et al., 2013).

Após causar danos à membrana celular interna bacteriana, a clorexidina induz a precipitação ou coagulação de proteínas e ácidos nucleicos no interior da célula (Richards & Cavill, 1979; Russell, 1986). O triclosan, um composto antimicrobiano bifenólico policlorado, é também frequentemente encontrado em sabonetes antimicrobianos, geralmente na concentração de 1%. O modo de ação do triclosan baseia-se no bloqueio da síntese lipídica por inibição da enzima *enoyl-acyl carrier protein reductase*, que desempenha um papel essencial na síntese lipídica (McMurry et al., 1998; Alfhili & Lee, 2019). A estrutura química do triclosan encontra-se representada na Figura 6:

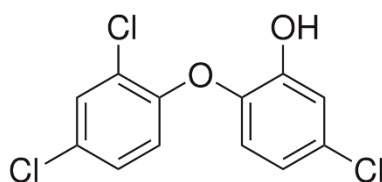


Figura 6 - Estrutura química de triclosan (Adaptado de Ma et al., 2013).

A desinfecção higiênica das mãos consiste na aplicação de um gel à base de álcool nas mãos secas, sem uso de água. O modo de ação dos álcoois (sendo etanol, isopropanol e n-propanol os mais usados neste âmbito) é não-específico, consistindo principalmente na desnaturação e coagulação de proteínas, ocorrendo a lise das células (Kampf & Kramer, 2004; McDonnell & Russell, 1999). Conclui-se que, de forma a minimizar transmissão de microrganismos através das mãos, a sua lavagem com sabão e água remove eficazmente a flora provisória da pele, que corresponde a bactérias entéricas do ambiente, como *E. coli* e *Salmonella*. Contudo, é praticamente impossível remover uma flora residente nas mãos, mesmo com o uso de sabonetes bactericidas, como é o caso de colaboradores portadores de *S. aureus* como flora estabelecida nas vias nasais e nas mãos (Adams & Moss, 2000; Forsythe, 2011).

Na empresa Dan Cake, o pré-requisito “higiene pessoal” define as regras relativas a todos os colaboradores que contactam direta ou indiretamente com os alimentos, de modo a assegurar que estes não constituem uma fonte de contaminação, mantêm um grau adequado de higiene pessoal, seguem as regras estabelecidas de conduta pessoal, apresentam boas condições de saúde e têm formação ou conhecimento dos princípios de higiene adequados à função desempenhada. Pela importância que têm para o presente trabalho, destacam-se as regras aplicadas à higiene do fardamento de trabalho e à higiene das mãos. A farda dos colaboradores deve ser utilizada no perímetro da unidade fabril, devendo ser constituída por uma peça de vestuário limpo, em bom estado de conservação e adequado à função, e por uma touca capaz de cobrir todo o cabelo acompanhada de, se necessário, um tapa

barba/bigode. A limpeza e conservação das fardas é da exclusiva responsabilidade do trabalhador. A sua lavagem deve ser feita frequentemente e a uma temperatura da água igual ou superior a 60°C, utilizando lixívia (na roupa branca) para retirar sujidade mais difícil de remover. Como complemento da lavagem da farda, a mesma deve também ser passada a ferro. Devem ser arrumadas num local limpo, separado de outras roupas, e ser corretamente acondicionadas durante o percurso até à unidade fabril, de modo a garantir que não ocorrem contaminações externas. A empresa tem também regras específicas quanto à lavagem e desinfeção das mãos, devendo estas ser lavadas/desinfetadas antes de iniciar o trabalho, depois de utilizar os sanitários, quando mudam de tarefa; quando assoam o nariz ou mexem nos olhos, cabelo, boca ou orelhas; após a manipulação de matérias-primas e de materiais de embalagem; quando tocam em lixos, químicos ou produtos de limpeza, antes e após as refeições; depois de fumar ou sempre que se considere necessário. As regras básicas de higiene das mãos também contemplam o procedimento a seguir para lavar as mãos de forma correta. Para esse efeito, existem lavatórios devidamente localizados e equipados na zona fabril, com água corrente fria e/ou quente, torneira de comando não manual, recipiente com produto para lavagem das mãos e dispositivo com toalhas de papel descartáveis para secagem higiénica. Como reforço, existem dispensadores de desinfetante nas zonas necessárias. Este pré-requisito garante também uma eficaz divulgação das mesmas regras de conduta para que todos os colaboradores se mantenham recordados e as ponham em prática de forma natural, através não só de um regulamento interno da empresa, como da afixação de cartazes (ajudas visuais) por todos os locais da fábrica. Por exemplo, existem ajudas visuais com instruções sobre “quando” e “como” lavar as mãos, tendo a sua elaboração e colocação sido uma das atividades realizadas no estágio. Exemplares das ajudas visuais elaboradas no âmbito deste pré-requisito encontram-se no capítulo 6 da presente dissertação. A contagem de colónias em placas de agar recuperadas de zaragatoas feitas às mãos de manipuladores de alimentos, antes da sua higienização, e a observação da redução nestes valores atingida pela higienização, tem uma elevada importância (McMeekin, 2003). A colheita de amostras para análise microbiológica das mãos de manipuladores de alimentos pode ser realizada com uma zaragatoa estéril, previamente humedecida em solução salina tamponada com fosfato, ou água peptonada, e aplicada em toda a superfície das mãos e entre os dedos. As colheitas podem, também, ser realizadas através de sacos plásticos esterilizados contendo água salina peptonada, em que cada manipulador mergulha toda a superfície das duas mãos no saco por alguns segundos (Millezi et al., 2007; Campos et al., 2009; Lambrechts et al., 2014; Tartler & Fortuna, 2012). Considerando que bactérias coliformes fecais (como é o caso de *E. coli*) não são encontradas na flora residente da pele (*S. aureus*), a sua pesquisa em manipuladores é de extrema importância, uma vez que podem pertencer à sua flora transitória, indicadora de más práticas de higiene pessoal e de possível presença de patogénicos entéricos (Hobbs & Roberts, 1998). Deste modo, o cumprimento e a eficácia das regras de conduta e higiene pessoal na Dan Cake foram verificados através de análises microbiológicas a mãos e fardas dos colaboradores, sendo um dos principais objetivos do presente estágio.

2.5.2. Higienização de instalações, equipamentos e utensílios

O principal objetivo dos programas de higienização é reduzir o número de patogênicos no ambiente e, portanto, reduzir a possível contaminação de alimentos (Adams & Moss, 2000). A limpeza deve ser realizada em intervalos regulares e frequentes, dependendo da natureza da sujidade ou contaminação a ser removida, do tipo de superfície a ser limpa, dos materiais utilizados na limpeza, do grau de dureza da água e do grau de limpeza requeridos. A limpeza é o primeiro passo da higienização, sendo importante para uma posterior desinfecção eficiente, uma vez que remove sujidade acumulada que pode resultar na inativação do desinfetante ou na proteção dos microrganismos da ação desinfetante (Gibson et al., 1999). É usada limpeza a seco, para remover a sujidade em bruto ou material orgânico, e limpeza húmida com detergente, para remover quaisquer materiais residuais. Para procedimentos de limpeza, não se espera que os detergentes possuam propriedades bactericidas, mas ainda assim estes removem fisicamente um grande número de bactérias (Adams & Moss, 2000; Forsythe, 2011). Os produtos de limpeza alcalinos têm como função quebrar proteínas e lípidos por reações de hidrólise ou solubilização, e podem também funcionar como bactericidas, quando em maiores concentrações, enquanto os produtos ácidos são úteis na solubilização de carbonatos e sais minerais (Baptista, 2003). O principal componente de um detergente é um surfactante (também denominado tensioativo), que é um composto cujas moléculas contêm porções hidrofílicas e hidrofóbicas que reduzem a tensão superficial da fase aquosa para melhorar a sua capacidade de humedecer os resíduos (Adams & Moss, 2000; Forsythe, 2011). Para aumentar a eficácia dos detergentes, podem ser utilizados polifosfatos e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como agentes quelantes, i.e., compostos orgânicos capazes de incorporar iões metálicos, como cálcio, magnésio ou ferro, para formar uma estrutura complexa em forma de anel denominada "quelato", evitando assim a formação de precipitados destes metais (Adams & Moss, 2000; Hart, 2011). Este princípio é exemplificado na Figura 7:

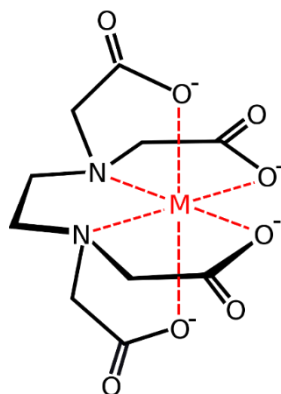


Figura 7 - Estrutura química de um "quelato", composta pelo ligando dissociado (EDTA^{4-}) e pelo íon metálico (M) (Adaptado de Mali et al., 2014).

A etapa final da higienização é o processo de desinfecção, que requer o uso de desinfetantes para reduzir ou eliminar os patogênicos restantes. Os desinfetantes usados em superfícies de contacto com alimentos devem eliminar rapidamente bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus e fungos e a maioria dos esporos de fungos, e inativar alguns esporos

bacterianos. Os desinfetantes devem ser estáveis na presença de resíduos orgânicos, não devem ser tóxicos, irritantes para a pele e olhos, corrosivos, nem devem manchar as superfícies, devem ser inodoros, solúveis em água, estáveis durante o armazenamento e ter um bom rácio qualidade/preço. Os desinfetantes têm um efeito inibitório amplo, não agindo especificamente sobre um único aspeto do metabolismo de uma célula microbiana. Alguns dos tipos de desinfetante mais utilizados na indústria de alimentos, para além dos álcoois, cujo mecanismo de ação já foi descrito na secção 2.5.1, são os compostos halogenados (compostos clorados e iodóforos) e compostos de amónio quaternário (Adams & Moss, 2000; Louie & Reuschlein, 2005).

Os compostos halogenados atuam como agentes oxidantes. No caso de compostos à base de cloro, estes desnaturam proteínas, inibem processos metabólicos vitais de forma irreversível nos microrganismos e destroem ácidos nucleicos (McDonnell & Russell, 1999). Outro composto halogenado que atua de forma semelhante é o iodo (I_2), dissolvido numa solução que contém um surfactante que o mantém estável e que controla a sua libertação, formando um complexo químico designado “iodóforo” (McDonnell & Russell, 1999). Estes são menos eficientes que os compostos de cloro na inativação de esporos bacterianos (Marriott et al., 2018). Os compostos de amónio quaternário são compostos tensioativos catiónicos, que promovem a deterioração da membrana celular, libertando os constituintes celulares (Adams & Moss, 2000; Lambert & Johnston, 2000).

Na Dan Cake, o pré-requisito “higiene das instalações, equipamentos e utensílios” estabelece regras que dizem respeito à limpeza das instalações e higienização dos equipamentos, tendo por base as regras gerais de higiene do *Codex Alimentarius*, de forma a assegurar principalmente: a limpeza das instalações, evitando contaminações de produtos e materiais, o bom estado de conservação e higiene dos equipamentos e utensílios que entram em contacto com os alimentos, a adequação dos produtos de limpeza e desinfeção, e sua utilização de forma a não introduzirem perigo de contaminação nos alimentos. Na Tabela 5 encontra-se resumido o plano de higienização, onde constam os trabalhos de higienização efetuados na empresa e aplicáveis às principais superfícies, equipamentos e utensílios que, direta ou indiretamente, contactam com os alimentos ou os podem contaminar, bem como a frequência com que ocorrem, o seu modo operativo, os produtos químicos e utensílios utilizados. Estas tarefas são realizadas pela própria equipa de produção, ficando os trabalhos de higienização das instalações, refeitório, das instalações sanitárias e gabinetes, assim como paredes e pavimentos, ao encargo da equipa de higiene geral. Apesar das tarefas de higiene geral terem elevada importância numa empresa da indústria alimentar, estas não foram incluídas no plano de higienização, uma vez que se considera mais indicado para o contexto do presente trabalho a descrição da higienização de equipamentos e utensílios e outras superfícies em contacto direto ou indireto com alimentos.

Tabela 5 - Resumo do plano de higienização implementado na empresa até ao início do estágio.

Local de aplicação		Procedimento	Frequência	Produtos químicos usados
Utensílios, tabuleiros, mesas de apoio e outras estruturas		Recolher utensílios, remover resíduos sólidos, esfregar com solução de lavagem, enxaguar e deixar secar.	Fim de produção	Detergente de uso geral
Zona de Massas (antes de cozedura)	Batedeiras, tubagens, máquinas de formação, depositadores de matérias-primas	1. Remover resíduos sólidos com raspador de plástico, passar água nas superfícies para retirar restos de massa, escovar superfícies com solução de lavagem e enxaguar; 2. Escovar superfícies interiores com solução de desinfecção, enxaguar e deixar secar.	Fim de produção, ou semanal (mínimo)	Detergente de uso geral; Alcalino clorado.
	Todas as superfícies que contactam com massa	Pulverizar zonas que contactam com a massa com solução desinfetante	Antes de produção	Desinfetante de base alcoólica
	Equipamentos em geral	Limpeza cuidadosa e pormenorizada de todos os equipamentos, aplicando também desincrustante para retirar sujidade inorgânica, escovar com solução de lavagem e enxaguar	Semestral	Desincrustante ácido; Detergente de uso geral.
	Sistemas de injeção de massa	1. Desmontar equipamentos, passar componentes com água sob pressão, colocar em imersão em solução de lavagem, escovar e enxaguar; 2. Pulverizar com a solução de desinfecção, escovar, enxaguar e deixar secar.	Trimestral	Desengordurante; Desinfetante.
	Potes, baldes, tampas, tabuleiros, caixas de plástico	Passar utensílios por água corrente para retirar o excesso de resíduos, escovar um a um com a solução de lavagem, enxaguar, passando por água limpa corrente e colocar em prateleiras, para escorrer.	Após utilização	Detergente de uso geral; Hipoclorito de sódio.
Câmaras Frigoríficas		Vagar câmara de frio, escovar o teto, as paredes, as prateleiras e o chão com a solução de lavagem, enxaguar com pano embebido em água limpa.	Semanal	Detergente de uso geral
		Repetir circuito anterior, lavar com desinfetante e deixar atuar por 20 minutos.	Quinzenal	Desinfetante amónio quaternário
Utensílios de apoio à produção	Carros de transporte de matérias-primas	Escovar paredes dos carros e as tampas com solução detergente/desinfetante, deixar atuar 10 min., enxaguar com água fria, deixar secar, tapar e colocar em câmara frigorífica, até nova utilização.	Após utilização	Alcalino clorado
	Potes, baldes, tampas, tabuleiros, caixas de plástico	Passar os utensílios por água corrente para retirar o excesso de resíduos, escovar um a um com solução de lavagem, enxaguar, passando por água limpa corrente e colocar em prateleiras, para escorrer.	Após utilização	Detergente de uso geral; Hipoclorito de sódio.
Zona de arrefecimento/ embalagem (depois de cozedura)	Ventoinhas	Aplicar solução de lavagem/desinfecção por toda a ventoinha e esfregar, deixar atuar 10 min., enxaguar com pano embebido em água limpa e deixar secar.	Bimestral	Alcalino clorado
	Forno	Retirar resíduos nas janelas e extremidades do forno, lavar exterior do forno e interior junto às janelas e extremidades, enxaguar com pano embebido em água limpa e deixar secar.	Bimestral	Detergente de uso geral
	Telas, rolos, máquinas de embalar, guilhotinas	Raspar para retirar resíduos, passar superfícies com um pano com solução de lavagem, enxaguar com um pano com água limpa.	Fim de produção ou semanal (mínimo).	Detergente de uso geral
	Superfícies que contactam com produto	Pulverizar as zonas que contactam com o produto com desinfetante e deixar secar	Antes de produção	Desinfetante de base alcoólica

Tabela 5 - Resumo do plano de higienização implementado na empresa até ao início do estágio (2ª parte).

Local de aplicação		Procedimento	Frequência	Produtos químicos usados
Zona de arrefecimento/ embalagem (depois de cozedura)	Sistema de injeção de recheios	1. Passar injetores com água sob pressão para retirar restos de creme, colocar os injetores em imersão na solução de lavagem e desinfeção, escovar e deixar atuar por 30 min., enxaguar, deixar secar e envolver em película aderente; 2. Passar água sob pressão nos orifícios dos bicos de injeção, escovar o interior dos bicos com a solução de lavagem e desinfeção, deixando atuar 15 min., enxaguar com água sob pressão e pulverizar os bicos com álcool.	Fim de produção ou após produção com alergénios	Alcalino clorado; Desinfetante de base alcoólica; Detergente de uso geral.
	Ventosas e tubos de sucção de produto	1. Retirar as ventosas e tubos, limpar os resíduos, colocar em imersão na solução de lavagem, escovar individualmente e passar por água limpa. 2. Colocar em imersão em solução desinfetante durante 15 min., escovar individualmente, passar por água, colocar num tabuleiro para escorrer, colocar em estufa a secar e armazenar num tabuleiro ou balde protegido.	Fim de produção ou semanal (mínimo).	Detergente de uso geral

Para garantir que os procedimentos de limpeza e desinfeção atingem o resultado desejado, e detetar tendências que indiquem uma potencial perda de controlo de higiene no ambiente, é necessária uma forma de avaliação. Um dos testes de avaliação de limpeza de superfície mais habitualmente utilizados é o cultivo microbiológico (Forsythe, 2011; USDA, 2012). Este método envolve estimativas do número total de bactérias viáveis em superfícies, organismos indicadores e, quando necessário, bactérias de deterioração ou patogénicas. As bactérias são removidas das superfícies por meio de zangaratoas estéreis. Como os microrganismos estão desigualmente distribuídos nas superfícies dos equipamentos, devem amostrar-se áreas do maior tamanho possível, bem como os pontos reduzidos e menos acessíveis, como os ralos. Por esse motivo, os métodos de esfregação são os mais adequados (Adams & Moss, 2000; Forsythe, 2011). A zangaratoa aplicada na superfície do material recupera bactérias e fungos, e liberta-os numa solução de extração durante uma etapa de agitação em vórtex, seguida de sementeira em placa ou esfregação, em placas de agar com um meio de crescimento seletivo ou não-seletivo (Ismail et al., 2013; Notermans et al., 1976; Pérez-Rodríguez et al., 2008). A eficácia dos métodos de higienização implementados na empresa foi verificada e monitorizada através de métodos microbiológicos, sendo este um dos dos principais objetivos do estágio.

2.6. O impacto do novo coronavírus (COVID-19) na segurança alimentar

Os vírus podem ser transmitidos de diversas maneiras. Por exemplo, podem ser transmitidos pelas vias respiratórias, através de gotículas (aerossóis) geradas quando um indivíduo infetado tosse, ou por via fecal-oral, quando o material fecal de um indivíduo infetado é inadvertidamente consumido (WHO, 2008b). Os principais vírus transmitidos por alimentos são aqueles que causam infeção através do trato gastrointestinal e são excretados nas fezes e, em alguns casos, no vómito, e são infeciosos para humanos quando ingeridos por via oral. A principal categoria de alimentos implicados em infeções virais são os alimentos minimamente processados, como é o caso de moluscos bivalves e produtos frescos, contaminados com vírus no ambiente de produção primário. No entanto, qualquer tipo de

alimento pode estar implicado em surtos de doenças virais transmitidas por alimentos, especialmente alimentos prontos-a-comer, quando se dá o caso de a contaminação ser causada por manipuladores de alimentos infetados (WHO, 2008b; WHO, 2015). Os vírus mais frequentemente envolvidos em infecções transmitidas por alimentos são o Norovírus (NoV) e o vírus da Hepatite A (HAV) mas, outros vírus, como o Rotavírus Humano (HRV), o vírus da Hepatite E (HEV), Astrovírus, Aichi, Sapovírus, Enterovírus, Coronavírus, Parvovírus e Adenovírus também podem ser transmitidos por alimentos (Koopmans e Duizer, 2004; WHO, 2008b).

Atualmente, o mundo enfrenta uma ameaça sem precedentes com a pandemia de COVID-19 causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), conhecido informalmente como novo coronavírus. O SARS-CoV-2 é um vírus que causa doença respiratória e os principais sintomas de infecção reportados até à data incluem febre, tosse e fadiga, corrimento nasal, espirros, dor de garganta e pneumonia (Law et al., 2020). A COVID-19 é uma doença respiratória cuja via fundamental de transmissão são as gotículas respiratórias emitidas pelos infetados, através de tosse ou espirros, que atingem o nariz, a boca ou os olhos de outra pessoa (infecção por contato direto). Como alternativa, uma vez que as gotículas respiratórias são demasiado pesadas para serem transportadas pelo ar, estas atingem objetos e superfícies em redor da pessoa infetada, contaminando pessoas que contactam nessas superfícies e objetos, ou com as mãos contaminadas da pessoa infetada e, de seguida, contactam com a sua própria boca, nariz ou olhos (infecção por contato indireto) (ASAE, 2020; WHO, 2020a).

2.6.1. Contaminação de alimentos ou superfícies em contacto com alimentos por SARS-CoV-2 e transmissão do vírus através da ingestão de alimentos contaminados

Devido à atual pandemia do SARS-CoV-2, foram levantadas preocupações sobre se este vírus pode ser transmitido através de alimentos e/ou materiais de embalagem de alimentos (Li et al., 2020). Atualmente, não há evidências de que o vírus responsável pela atual pandemia de COVID-19 seja transportado por animais domésticos destinados à alimentação humana, como galinhas, patos e outras aves, porcos, ovelhas, cabras, coelhos, peixe e outros animais (FAO, 2020). Em ambientes de processamento de alimentos, todo o tipo de alimentos pode ser potencialmente contaminado por microrganismos patogénicos, incluindo por coronavírus. A hipótese de contaminação dos alimentos por parte de um indivíduo doente, ou portador assintomático do vírus SARS-CoV-2, pode ocorrer pela emissão de gotículas respiratórias por espirros ou tosse, contaminando o meio ambiente que o rodeia, como equipamentos, superfícies de contacto com alimentos, utensílios ou até o próprio alimento diretamente, ou através da contaminação cruzada a partir das mãos dos trabalhadores para os alimentos, numa ou mais fases da cadeia alimentar. Uma vez depositados sobre superfícies, os coronavírus podem sobreviver em objetos inanimados, como será visto mais à frente (FAO, 2020). Os surtos anteriores de coronavírus relacionados, particularmente, pelo coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente (*Middle East Respiratory Syndrome - MERS-CoV*) e SARS-CoV, mostraram que os alimentos não são

uma via de transmissão relevante para estes vírus e, até ao momento, não há evidências para concluir que o SARS-CoV-2 seja diferente nesse aspeto (EFSA, 2020; FDA, 2020).

Os vírus transmitidos por alimentos são frequentemente detetados nos alimentos, estando a ligação entre muitas das doenças transmitidas por alimentos e o consumo de alimentos contaminados por vírus claramente demonstrada (por exemplo, com a contaminação de alimentos por NoV). Em comparação, apesar do longo histórico e da ampla disseminação de coronavírus (CoV) em comunidades humanas, não há evidências epidemiológicas de que alguma das doenças se tenha devido ao consumo de alimentos e não foi encontrado na literatura nenhum registo da presença de CoV em alimentos (Li et al., 2020). Pode ser contra-argumentado que a presença de CoV poderia ter sido insuficientemente estudada e, no futuro, poderão ser encontrados CoV no conjunto de vírus presentes nos alimentos, especialmente com o uso de tecnologias metagenómicas (uma ferramenta molecular utilizada para analisar genomas coletivos de um local contaminado, extraídos de amostras ambientais, com o objetivo de estudar a comunidade de microrganismos presentes, sem a necessidade de cultivo em laboratório ou conhecimento prévio das comunidades microbianas) (Li et al., 2020; Gosh et al., 2020; Riesenfeld et al., 2004; Eyers et al., 2004). Uma vez que o conhecimento das quantidades e viabilidade do vírus tem uma importância crucial na determinação da sua influência na saúde pública, os resultados de deteções de vírus em alimentos com o uso de métodos moleculares devem ser interpretados com cautela, visto que os métodos moleculares que detetam a presença de ácidos nucleicos não distinguem vírus infecciosos de não-infecciosos (Li et al., 2020).

Possíveis explicações para a ausência de SARS-CoV-2 em alimentos estarão relacionadas com a baixa estabilidade deste tipo de vírus no ambiente (ou seja, o facto de o período em que existe a probabilidade de contaminação ser curto), bem como o facto de ser necessária uma concentração relativamente alta de vírus para que a contaminação tenha viabilidade (ASAE, 2020). Uma vez que os vírus não se conseguem multiplicar sem um hospedeiro, devem ter a capacidade, após serem lançados no meio ambiente, de resistir a possíveis fatores de *stress* ambiental nos sistemas alimentares (como irradiação solar, secagem, temperaturas altas ou baixas e produtos químicos desfavoráveis) e assim permanecer infecciosos por períodos longos o suficiente até serem ingeridos novamente. De facto, o NoV, um dos vírus mais frequentemente envolvidos em infeções transmitidas por alimentos, é conhecido como um “super sobrevivente” nos sistemas alimentares (Li et al., 2020). Assim, a Tabela 6 pretende comparar a estabilidade entre NoV e CoV (e respetivos substitutos) sob diferentes condições possíveis em sistemas alimentares, utilizando métodos baseados na cultura de células ou a partir de estudos com voluntários humanos. Nesta tabela, devido à atual falta de testes robustos de NoV humano em cultura de tecidos, a estabilidade deste vírus é estudada utilizando substitutos, que incluem calicivírus felino (FCV), norovírus murino (MNV) e colifago MS2, que compartilham características patológicas e/ou biológicas com o NoV humano. Embora as estirpes de maior interesse para estes estudos sejam o SARS-CoV e MERS-CoV, o trabalho prático em laboratórios com nível de contenção BSL-3 (um nível de biossegurança muito elevado aplicável a instalações onde se trabalha com agentes causadores de doenças graves ou potencialmente letais) pode ser um desafio significativo e,

por isso, investigadores tendem a utilizar substitutos como o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV), um patogénico diarreico de suínos, e o vírus da hepatite murina (MHV), um patogénico respiratório e entérico em ratos de laboratório, para estudar a sobrevivência e persistência de CoV (Li et al., 2020; Mourya et al., 2014).

Tabela 6 - Estabilidade de NoV e CoV e respetivos substitutos sob diferentes condições (Adaptado de Li et al., 2020).

Condições	Estabilidade do vírus	
	NoV e substitutos	CoV e substitutos
Água e alimentos líquidos	<p>MNV apresentou maior taxa de redução de infeciosidade em águas superficiais do que em águas subterrâneas (Bae & Schwab, 2008).</p> <p>NoV manteve-se infecioso durante 61 dias em águas subterrâneas (Seitz et al., 2011).</p> <p>Em leite após 21 dias de refrigeração a 4°C, MNV não teve redução de infeciosidade, enquanto FCV teve redução de 3 log UFP*/mL (Horm & D'Souza, 2011).</p>	<p>Coronavírus humano (HCoV) sobreviveu em água da torneira por 10 dias a 23°C e mais de 100 dias a 4°C, mas apenas por 2-4 dias em águas residuais (Gundy et al., 2009).</p> <p>A 25°C, TGEV e MHV sobreviveram mais tempo em água ultrapura do que em águas residuais. A 4°C, ambos os vírus sobreviveram por mais de quatro semanas (Casanova et al., 2009).</p> <p>MERS-CoV sobreviveu em leite a 4°C por 72 horas, enquanto que a 22°C perdeu a infeciosidade dentro de 48 horas (van Doremalen et al., 2014).</p>
Alimentos sólidos e superfícies de contacto com produto	<p>MNV à temperatura ambiente: o nível de redução, do mais alto para o mais baixo, foi aço inoxidável (redução de 2.28 log), plástico, borracha, vidro, cerâmica e madeira (redução de 1,29 log) (Kim et al., 2014).</p> <p>Em superfícies de aço inoxidável secas por 7 dias: MNV e FCV com maior redução à temperatura ambiente do que a 4°C (Cannon et al., 2006).</p> <p>Em tiras de aço inoxidável por 30 dias a 25°C: MNV com maior redução em tiras livres de resíduos do que em tiras com resíduos de alface, couve ou carne (Takahashi et al., 2011).</p> <p>HAV, MS2, MNV em ostra e pimento sobreviveram melhor a 4°C e foram inativados a 40°C. Em ostras, HAV e MNV tiveram redução de 1 log a 4°C após 14 dias. No entanto, MNV teve redução de 5 log em pimento a 4°C. A uma determinada temperatura, HAV sobreviveu melhor em humidade relativa (HR) mais alta, enquanto MS2 sobreviveu melhor em HR mais baixa (Lee et al., 2015).</p>	<p>SARS-CoV-2 a 21–23°C: sobrevive mais tempo em superfícies de plástico ou aço inoxidável do que em cobre ou cartão (van Doremalen et al., 2020).</p> <p>SARS-CoV sobreviveu até 4 semanas em superfícies de plástico com HR<50%. Contudo, perdeu infeciosidade com HR>95% em 24 horas (Chan et al., 2011).</p> <p>SARS-CoV manteve infeciosidade em superfícies de poliestireno por 6 dias a 4°C (Rabenau et al., 2005).</p> <p>MERS-CoV sobreviveu mais de 48 horas a 20°C e HR=40% em superfícies de plástico e aço, enquanto sobreviveu apenas por 8 horas a 30°C e HR=80%, e 24 horas a 30°C e HR=30% (van Doremalen et al., 2013).</p> <p>HCoV sobreviveu em alface durante 2 dias de armazenamento, mas não foi recuperado de framboesas ou morangos (Yépez-Gómez et al., 2013).</p>
Alcoóis	<p>Independentemente da concentração ou do tempo de exposição, alcoóis reduziram NoV ligeiramente, mas sem inativação completa (Constantini et al., 2018).</p>	<p>Não foi detetada infeciosidade de SARS-CoV após aplicação de etanol a 70% por 10 min, ou etanol a 100% por 5 min. Isopropanol a 70% e 100% alcançaram >3,31 log de redução de infeciosidade de SARS-CoV após 30 segundos (Rabenau et al., 2005).</p>
Cloro	<p>Completa inativação de NoV em concentrações de 50 ppm de cloro à temperatura ambiente após 1 min. (Constantini et al., 2018).</p>	<p>SARS-CoV pode ser completamente inativado com 10 ppm de cloro por 10 min e 20 ppm de cloro por 1 min (Wang et al., 2005).</p>
UV	<p>A suscetibilidade de MHV é 7 a 10 vezes superior à de MS2 (Walker & Ko, 2007).</p>	

*Unidades formadoras de placas (UFP) é uma medida da quantidade de vírus capazes de fazer a lise de células hospedeiras e formar uma placa.

Como se pode observar na Tabela 6, matrizes com diferentes composições podem ter funções variáveis, seja através de proteção viral contra *stress* ambiental, ou como agentes antivirais a atuar em conjunto com o *stress* ambiental (Li et al., 2020). Os dados sugerem que tanto NoV como CoV são capazes de permanecer infecciosos em alimentos e materiais de embalagem por tempo suficiente (de vários dias a várias semanas) para que a sua transmissão se faça por estes meios, especialmente a baixas temperaturas. No entanto, os estudos de desinfeção mostram que os NoV são indubitavelmente mais resistentes que os CoV à desinfeção por álcoois, cloro e ultravioleta (Li et al., 2020).

Por fim, uma forte evidência da reduzida probabilidade de transmissão de CoV por alimentos é o facto de todos os vírus bem conhecidos, como vírus transmitidos por alimentos, serem transmitidos por via fecal-oral, e estudos recentes comprovam que, de facto, a infeção por NoV humano ocorre principalmente no trato digestivo humano (Ettayebi et al., 2016). As seguintes características contribuem para o sucesso do NoV humano na transmissão através dos alimentos: são extremamente contagiosos, com uma DMI de apenas 10 partículas, e as suas partículas podem ser eliminadas em grandes quantidades através do vómito e fezes dos pacientes, sendo que este último sintoma tem uma elevada prevalência e pode durar até três semanas (Atmar & Estes, 2006; Ayukekbong et al., 2011). No entanto, os CoV, incluindo o recente SARS-CoV-2, transmitem-se principalmente através das vias respiratórias. De facto, existem estudos que demonstram a presença de CoV em amostras de fezes humanas. Numa investigação recente, 41 (55%) de 74 pacientes infetados com SARS-CoV-2 testaram positivo para RNA de SARS-CoV-2 em amostras das suas fezes e a libertação fecal do vírus durou uma média de 27.9 dias após os primeiros sintomas (Wu et al., 2020). No entanto, até ao momento da escrita da presente dissertação, não há evidências claras de que o SARS-CoV-2 possa causar infeção no aparelho digestivo humano. Considerando a alta probabilidade de infeção por SARS-CoV-2, é possível supor que o vírus tenha a capacidade de migrar da ingestão oral para as vias respiratórias através da garganta, por exemplo. No entanto, esta suposição requer uma base sólida de dados experimentais e/ou clínicos de forma qualitativa (para mostrar se é possível a migração do vírus da ingestão oral para as vias respiratórias), e também de forma quantitativa, uma vez que se for necessária a ingestão de grandes quantidades de vírus para causar a migração, a probabilidade desta ocorrência poderá ser muito baixa (WHO, 2020b; Li et al., 2020).

Deste modo, dada a ausência de dados que indiquem que o SARS-CoV-2 se comporta de maneira diferente de outros coronavírus, e dada a comprovada eficácia da aplicação de boas práticas de higiene e procedimentos de limpeza e desinfeção na indústria alimentar para redução das populações de vírus e eliminação da viabilidade de contaminação, assume-se que a transmissão do vírus através dos alimentos está sob controlo. O consenso científico é de que a probabilidade de transmissão de CoV por alimentos é considerada baixa e, portanto, os CoV não devem ser considerados vírus de origem alimentar (Li et al., 2020; ASAE, 2020).

2.6.2. Medidas de segurança alimentar e dos colaboradores na indústria alimentar

A transmissão de SARS-CoV-2 através de alimentos é possível quando um indivíduo infetado contacta com alimentos ou embalagens de alimentos e, de seguida, outro indivíduo o recolhe e contacta com os olhos ou membranas mucosas da boca ou garganta. Da mesma forma, os alimentos frescos podem ser expostos ao SARS-CoV-2 antes da sua congelação. Uma vez que MERS e SARS-CoV-1 podem permanecer infecciosos até 2 anos no estado congelado, a transmissão pode ocorrer durante esse período (Galanakis, 2020; CDC, 2020a). Sistemas de Segurança Alimentar bem implementados, que incluem Boas Práticas de Higiene e HACCP, têm um papel fundamental no controlo de riscos microbiológicos nos ambientes de processamento de alimentos. No entanto, no momento atual, as empresas do setor alimentar devem também dar ênfase a medidas de prevenção e controlo da infeção por SARS-CoV-2, de modo a impedir a disseminação da COVID-19. Estas empresas devem reforçar as medidas de higiene pessoal e atualizar as atividades de formação sobre os princípios de higiene alimentar, pelas seguintes razões: para eliminar ou reduzir o risco de contaminação de superfícies de alimentos e materiais de embalagem de alimentos através dos colaboradores; manter os padrões de segurança alimentar no nível habitual; e manter a saúde e segurança de todos os trabalhadores das cadeias de produção e fornecimento de alimentos, o que é fundamental para sobreviver à atual pandemia, mantendo o fluxo de alimentos ao longo da cadeia alimentar (WHO, 2020a). As medidas apresentadas de seguida podem ser consideradas como uma atualização das Boas Práticas de Higiene, como a limpeza, separação de áreas de processamento, controlo de fornecedores, armazenamento, distribuição e transporte, higiene pessoal e saúde no trabalho, e por esse motivo devem fazer parte do programa de pré-requisitos de empresas da indústria alimentar.

As empresas do setor alimentar devem garantir que os colaboradores infetados com COVID-19 (portadores sintomáticos ou confirmados assintomáticos) e os seus contactos (aqueles que estiveram expostos a casos confirmados) sejam excluídos das instalações de processamento de alimentos. Para esse efeito, primeiro é necessário que os colaboradores sejam conhecedores dos sintomas da COVID-19 (com o objetivo de reconhecê-los em si mesmos ou noutras pessoas o mais cedo possível, para que possam ser reportados), e se minimize o risco de infetar os colegas de trabalho. Os colaboradores não devem apresentar-se ao trabalho com sintomas de COVID-19, devendo notificar a indisposição via telefone ou e-mail. No entanto, em alguns casos, pode dar-se o caso de pessoas infetadas serem assintomáticas, não apresentando quaisquer sinais ou sintomas de doença, ou pré-sintomáticas, apresentando sintomas leves que são facilmente ignorados. Estes também são contagiosos e capazes de transmitir o vírus. Para esse efeito, algumas orientações de segurança alimentar emitidas sugerem que as empresas estabeleçam um controlo de temperatura corporal a todos os colaboradores (AINIA, 2020; WHO, 2020a). As práticas de gestão de pessoal referidas tornam improvável que um trabalhador da indústria alimentar fique doente no local de trabalho com sintomas de COVID-19. No entanto, é necessário desenvolver um plano de ação para gerir essa possibilidade. Neste caso, os colaboradores devem ser removidos das instalações de processamento de alimentos para uma área afastada

de outras pessoas, como uma sala ou área onde possam ser isolados, com uma porta fechada e janelas abertas para ventilação. O funcionário deve seguir as diretrizes nacionais para reportar casos suspeitos de COVID-19 (WHO, 2020a). Se um funcionário for confirmado com COVID-19, é necessário notificar todos os contactos que estiveram próximos do funcionário infetado, para que estes também possam tomar medidas para minimizar o risco de propagação. Todos estes devem praticar o distanciamento físico e ficar em casa por 14 dias a partir da última vez em que tiveram contacto com o caso confirmado. Se a qualquer momento ficarem indispostos dentro do período de isolamento de 14 dias e testarem positivo para COVID-19, tornar-se-ão um caso confirmado e deverão ser geridos como tal. Os funcionários que não tenham tido contacto próximo com o caso confirmado original, devem continuar a tomar as precauções habituais e comparecer ao trabalho normalmente. Não é recomendado o encerramento do local de trabalho (WHO, 2020a). A OMS recomenda que um caso confirmado possa ser libertado de isolamento quando os sintomas desaparecerem e mediante apresentação de dois testes de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) negativos com pelo menos 24 horas de intervalo entre cada um. Se não for possível a realização do teste, a OMS recomenda que um paciente confirmado possa ser libertado de isolamento 14 dias após a resolução dos sintomas (WHO, 2020c).

As empresas da indústria alimentar devem lembrar os colaboradores para que evitem o contacto com os olhos, nariz e boca, de modo a retardar a propagação de germes, e para que tenham uma boa higiene respiratória, cobrindo a boca e o nariz ao tossir ou espirrar, descartar os tecidos e lavar as mãos. A higiene adequada das mãos consiste na lavagem com sabão e água quente corrente durante, pelo menos, 20 segundos. Os colaboradores devem realizar uma lavagem eficaz das mãos à entrada e saída da área de produção de alimentos, e em intervalos regulares durante o processamento de alimentos ou após usar computadores, telefones, maçanetas e outras superfícies por toda a fábrica. Esta recomendação, assim como a importância de uma lavagem cuidadosa e frequente das mãos, deve ser reforçada em todos os locais (WHO, 2020a; *Food Standards Scotland [FSS]*, 2020). Por estes motivos, as empresas devem garantir o fornecimento de instalações sanitárias adequadas, bem como desinfetantes para as mãos que podem ser usados como uma medida adicional, não devendo a sua utilização substituir a lavagem das mãos. Se não estiver disponível sabão e desinfetante de base alcoólica, o uso de água clorada (0,05%) para lavar as mãos é uma opção, não sendo a ideal, uma vez que o uso frequente pode levar a dermatite e asma, aumentando o risco de infeção (WHO, 2020d).

Em relação às superfícies em contato com alimentos e equipamentos de processamento, as empresas devem continuar a aplicar os planos de limpeza e desinfecção existentes para controlar os riscos microbiológicos nos alimentos. No entanto, quando apropriado, em áreas/superfícies com contacto humano mais frequente, deve considerar-se a necessidade de medidas adicionais de desinfecção, utilizando métodos reconhecidos como eficazes contra vírus. Também é importante aumentar a precaução em áreas de entrada de qualquer tipo de material vindo do exterior, como materiais de embalagem que acompanham matérias-primas ou outros produtos (FSS, 2020; AINIA, 2020). Todas as superfícies em quaisquer áreas

comuns como, por exemplo, vestiários e zonas de controlo de entradas devem ser limpas e desinfetadas entre diferentes grupos de funcionários que ocupem esses espaços. Os principais pontos de contato (interruptores, maçanetas, corrimãos, teclados, máquinas de venda automática, etc.) devem ser identificados, para que também possam ser limpos e desinfetados regularmente. Para fins de limpeza, devem ser utilizados desinfetantes de base alcoólica em concentrações de 70 a 80% para superfícies, pois demonstraram reduzir significativamente a infeciosidade do vírus. Desinfetantes comuns com ingredientes ativos à base de compostos de amónio quaternário e cloro também têm também propriedades virucidas (FSS, 2020; WHO, 2020a). Poderá ser necessária uma revisão das operações de monitorização da eficácia da limpeza, aumentando a sua frequência e pontos de amostragem. Como indicador geral do estado higiénico, o método microbiológico de microrganismos mesófilos aeróbios é o mais indicado, pois apesar de não fornecer informações específicas sobre o vírus, é o indicador mais genérico do nível de higiene e permite verificar se a limpeza e desinfeção têm sido eficazes (AINIA, 2020).

Aos colaboradores, deve ser fornecido equipamento de proteção individual (EPI), como máscaras faciais, toucas para o cabelo, luvas descartáveis e sapatos de trabalho com boa aderência, uma vez que podem ser eficazes na redução da transmissão do vírus na indústria alimentar, especialmente em áreas de alto risco em empresas que produzem alimentos prontos-a-comer (WHO, 2020a). Os colaboradores devem ser consciencializados de que o uso de luvas pode permitir a acumulação de bactérias na superfície das mãos. Deste modo, devem ser trocadas com frequência e, quando são removidas, a lavagem das mãos é extremamente importante para evitar a contaminação subsequente dos alimentos. Para além disso, as luvas descartáveis não devem ser usadas no trabalho como substituto da lavagem das mãos, visto que o SARS-CoV-2 pode contaminar luvas descartáveis da mesma forma que contamina as mãos dos trabalhadores. O uso de luvas descartáveis pode dar uma falsa sensação de segurança e pode fazer com que os funcionários não lavem as mãos com a frequência necessária (WHO, 2020a). No que diz respeito ao uso de máscaras, pode não ser seguro para os trabalhadores usarem apenas uma máscara durante toda a duração de um turno de trabalho (oito ou mais horas), pois podem ficar húmidas, sujas ou visivelmente contaminadas durante o turno de trabalho. As empresas devem fornecer máscaras faciais descartáveis novas e prontamente disponíveis aos trabalhadores quando as anteriores apresentarem sinais de desgaste (CDC, 2020b). O uso de viseiras pode fornecer proteção contra eventuais salpicos relacionados com o processo produtivo e contra a transmissão de gotículas respiratórias de pessoa para pessoa, para além de que ajuda a minimizar a contaminação das máscaras. Quando usadas, as viseiras devem ser limpas e desinfetadas após cada turno e, quando não estiverem em uso, devem ser mantidas num local limpo nas instalações de trabalho (CDC, 2020b). O fardamento deve ser lavado diariamente. Recomenda-se a lavagem em máquina com água a 60-90°C e detergente para a roupa. Se não for possível a lavagem na máquina, as fardas podem ser mergulhadas em água quente e sabão, num recipiente grande, utilizando uma vara para mexer com cuidado para evitar salpicos. O recipiente deve ser esvaziado e as fardas embebidas em cloro a 0.05%, por

aproximadamente 30 minutos. Por fim, a farda deve ser enxaguada com água limpa e deve ser deixada a secar completamente à luz do sol. A farda deve ser guardada em locais separados da roupa de uso no dia-a-dia, os colaboradores não devem vir fardados a partir de casa, e não devem sair fardados para o exterior ou para outras zonas da fábrica que não as do processo produtivo (WHO, 2020e; AINIA, 2020).

Como medida para o retardamento da propagação da COVID-19, o distanciamento físico é fundamental. Para isso é necessário minimizar o contacto entre indivíduos potencialmente infetados e indivíduos saudáveis, tanto quanto possível, mantendo pelo menos 1 metro de distância entre os colaboradores. Nos locais onde o próprio ambiente de produção dos alimentos dificulta o distanciamento físico, as empresas da indústria alimentar devem reforçar o uso de EPI, ou de barreiras físicas (como cortinas, placas de acrílico ou materiais semelhantes), ou outras divisórias impermeáveis, de modo a separar os colaboradores (WHO, 2020a; CDC, 2020b). Exemplos de medidas práticas de distanciamento físico no ambiente de processamento de alimentos são: alternar as estações de trabalho em ambos os lados das linhas de processamento, para que os trabalhadores não se encontrem frente-a-frente; distanciar as estações de trabalho, o que pode exigir redução na velocidade das linhas de produção; e limitar o número de funcionários numa área de preparação de alimentos; organizar os colaboradores em grupos de trabalho para reduzir a interação. Deve considerar-se o uso de marcações e sinalização para lembrar os colaboradores de manter distanciamento social na produção e nos intervalos (CDC, 2020b; WHO, 2020a). Os refeitórios de empresas de processamento de alimentos devem permanecer abertos quando não há alternativas práticas para os colaboradores se alimentarem. Os padrões operacionais dos refeitórios devem incluir: manter uma distância física de pelo menos 1 metro entre colaboradores, incluindo nos lugares sentados; alternar horários de pausa entre colaboradores para reduzir o número de pessoas no refeitório num determinado momento; evitar, ao máximo, o contato físico não essencial; afixar cartazes e ajudas visuais promovendo a higiene das mãos e o distanciamento físico; e manter procedimentos de limpeza e desinfecção de equipamentos, instalações, superfícies e pontos de contacto frequente (WHO, 2020a).

Uma vez que o vírus entra nas instalações da empresa quando uma pessoa infetada entra, ou quando produtos ou objetos contaminados são trazidos para as instalações, deve evitar-se todo o tipo de visitas externas à fábrica. Motoristas e outros funcionários responsáveis por fazer entregas às empresas da indústria alimentar precisam ser consciencializados do distanciamento físico ao fazer entregas aos clientes. Os motoristas não devem sair dos seus veículos durante as entregas, e devem usar desinfetante para as mãos antes de passar os documentos de entrega aos funcionários da empresa. Devem ser usados recipientes e embalagens descartáveis para evitar a necessidade de limpeza de uma eventual devolução. Por fim, os alimentos devem ser protegidos da contaminação e, por isso, devem ser separados de outros bens que possam causar contaminação (WHO, 2020a; AINIA, 2020).

3. Material e Métodos

3.1. Monitorização da eficácia da higienização de equipamentos e utensílios

A verificação do estado higiénico de todas as zonas, superfícies, equipamentos e utensílios da unidade fabril pode ser feita por inspeção visual. No entanto, a ausência de sujidade visível nessas superfícies não comprova a ausência de microrganismos associados a condições não higiénicas ou patogénicos. Deste modo, a eficácia dos métodos de higienização das instalações, equipamentos e utensílios foi monitorizada através de colheitas de amostras e posterior realização de análises microbiológicas. De modo a verificar o cumprimento e a eficácia do Plano de Higienização existente na empresa, seguiu-se um plano de amostragem, resumido na Tabela 7, que discrimina os diferentes locais da fábrica onde devem ser realizadas colheitas de amostras, assim como a periodicidade com que são realizadas e os microrganismos-alvo do estudo.

Tabela 7 - Plano de amostragem para monitorização da eficácia dos processos de higienização na empresa.

Locais/Materiais		Frequência	Microrganismos-alvo
Zona de Massas (antes de cozedura)	Superfícies de contacto com produto	Quadrimestral	- Microrganismos a 30°C; - Bolores e leveduras; - <i>E. coli</i> .
	Superfícies s/ contacto com produto (locais secos)	Anual	<i>Salmonella</i> spp.
	Superfícies s/ contacto com produto (locais húmidos e/ou baixa temperatura)	Anual	<i>L. monocytogenes</i>
Zona de embalagem	Superfícies de contacto com produto	Semestral/ Anual (cada linha)	- Microrganismos a 30°C; - Bolores e leveduras; - <i>E. coli</i> .
	Superfícies s/ contacto com produto (locais secos)	Quadrimestral	<i>Salmonella</i> spp.
	Superfícies s/ contacto com produto (locais húmidos e/ou baixa temperatura)	Quadrimestral	<i>L. monocytogenes</i>
Utensílios de apoio à produção		Quadrimestral/ Semestral	- Microrganismos a 30°C; - Bolores e leveduras; - <i>E. coli</i> .
Sistema CIP*	Mangueiras	Trimestral	- Microrganismos a 30°C; - Bolores e leveduras; - <i>E. coli</i> .
Câmaras de Frio		Anual	<i>L. monocytogenes</i>
Sala Lavagens			
Sala Pesagens			
Balneários		Anual	<i>Salmonella</i> spp.
Refeitório		Anual	- Microrganismos a 30°C; - Bolores e leveduras; - <i>E. coli</i> . - <i>Salmonella</i> spp.

*CIP – *Cleaning-in-place*

Este plano de amostragem é construído e continuamente alterado e melhorado tendo em conta o histórico de resultados obtidos pela empresa e com base na análise de risco HACCP. Os microrganismos utilizados para a avaliação da higiene das superfícies foram escolhidos pelos motivos previamente descritos no ponto 2.2.3.. O parâmetro “Microrganismos a 30°C” (também denominados mesófilos aeróbios) inclui todos os microrganismos capazes de crescer num meio ágar sólido rico em nutrientes a uma temperatura de incubação de 30°C (Bartram & Balance, 1996). A partir deste parâmetro é possível fazer uma estimativa da

carga microbiana total dos alimentos, das superfícies e dos equipamentos, sem especificar qual o tipo de bactérias presente. Destaca-se que as amostragens para análise da contaminação por *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* foram sempre realizadas em superfícies sem contacto com produto, uma vez que, tratando-se de microrganismos patogénicos envolvidos em muitos casos de doenças de origem alimentar, são pesquisados nas análises ao produto final. Para além disso, o tratamento de problemas em superfícies sem contacto com o produto deve evitar problemas nas superfícies de contacto com produto. A recolha das amostras para verificar a qualidade higiénica das superfícies (instalações, equipamentos, utensílios) foi feita por esfregaço com zaragatoa (Figura 8).



Figura 8 - Exemplos de zaragatoas utilizadas para recolha de amostra para análise microbiológica em superfícies.

Humedeceu-se uma zaragatoa estéril no diluente contido no tubo, e de seguida passou-se a zaragatoa lenta e firmemente sobre as zonas significativas de cada superfície a amostrar, revertendo a direção entre esfregaços. Para superfícies irregulares e peças individuais, amostraram-se pontos suscetíveis de acumular microrganismos, como cantos, bicos, torneiras, e para grandes superfícies regulares amostraram-se até 10 áreas de 100 cm², mergulhando a zaragatoa no diluente entre esfregaços. No fim, colocou-se a zaragatoa no tubo com diluente. As análises microbiológicas às amostras foram feitas em laboratório externo, com métodos específicos desse laboratório. Posteriormente, os boletins de análise foram recebidos, sendo os valores obtidos comparados com os critérios de aceitação estabelecidos na Dan Cake para diferentes parâmetros microbiológicos, que se encontram apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Critério de aceitação para os parâmetros microbiológicos em colheitas a superfícies do ambiente fabril na empresa.

Área fabril	Valores (UFC/ml*)				Presença	
	Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
Zonas pós-forno e outras	1,0x10 ²	5,0x10 ¹	5,0x10 ¹	<1	Não detetada	Não detetada
Zonas de Massas	1,0x10 ³	1,0x10 ²	1,0x10 ²	<1		

*Resultados em Unidades formadoras de colónias (UFC) por ml de diluente contido no tubo.

O procedimento a tomar na eventualidade de algum dos resultados obtidos se encontrar acima dos critérios de aceitação será descrito na secção 4 da presente dissertação.

3.2. Monitorização da higiene pessoal dos colaboradores

A monitorização do cumprimento das regras de conduta e higiene pessoal estabelecidas na empresa e a verificação da sua eficácia, fizeram-se através de análises microbiológicas a amostras recolhidas das mãos e fardas dos colaboradores. A verificação do estado higiénico/sanitário das mãos e fardas dos manipuladores fez-se com base no plano de amostragem apresentado na Tabela 9, que estabelece a frequência de amostragem adequada para diferentes locais da empresa.

Tabela 9 - Plano de amostragem para verificação da eficácia dos processos de higienização das mãos e das fardas de manipuladores.

Local	Frequência	Microrganismos-alvo
Zona de Pesagens	Semestral	- Microrganismos a 30°C; - <i>E. coli</i> ; - <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.
Zona de Massas	Quadrimestral	
Zona de Recheios	Quadrimestral	
Zona de Arrefecimento/ Embalagem	Quadrimestral	
Técnicos de Manutenção	Semestral	
Técnicos de Qualidade/I&D	Semestral	
Refeitório	Anual	

A recolha de amostras para cada zona da empresa pressupõe a seleção de, pelo menos, um colaborador que esteja numa linha/setor a intervir em atividades de manipulação de alimentos. A cada colaborador foi sempre solicitado que fizesse a lavagem e/ou desinfecção das mãos antes da recolha de amostra. De seguida, foi-lhe pedido que indicasse a última data em que fez a lavagem da farda. Deste modo, foi sempre recolhida uma amostra das mãos e uma amostra da farda ao mesmo colaborador.

A qualidade higiénica de mãos e fardas de manipuladores avaliou-se através de esfregaço por zaragatoa, seguindo o mesmo material e metodologia utilizados nas recolhas para a verificação da higienização de superfícies referida anteriormente no ponto 3.1.2. No caso das mãos, passou-se a zaragatoa lentamente nos espaços interdigitais, subungueais, palma e costas das duas mãos e, no caso das fardas, passou-se a zaragatoa lentamente por uma área significativa da farda. Em ambos os casos, mergulhou-se a zaragatoa e reverteu-se a direção entre esfregaços.

Tal como para a verificação da higienização de superfícies, as análises microbiológicas das amostras recolhidas foram feitas em laboratório externo, com métodos específicos desse laboratório. Por fim, os boletins de análise foram recebidos e os valores obtidos foram comparados com os critérios de aceitação estabelecidos na empresa, que se encontram apresentados na Tabela 10:

Tabela 10 - Critérios de aceitação para os parâmetros microbiológicos em amostras às mãos e fardas dos manipuladores.

Parâmetro	Valor paramétrico
Microrganismos a 30°C	$1,0 \times 10^3$ UFC/ml
<i>E. coli</i>	<1 UFC/ml
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	$\leq 1,0 \times 10^1$ UFC/ml

Deste modo, o procedimento tomado na eventualidade de algum dos resultados obtidos se encontrar acima dos critérios de aceitação será descrito na secção 4 da presente dissertação.

4. Resultados e Discussão

4.1. Monitorização da eficácia da higienização de equipamentos e utensílios

As áreas da fábrica são divididas em duas zonas fundamentais: zona de massas e zona de arrefecimento. Na primeira, o produto (ou, neste caso, as matérias-primas) ainda não foi sujeito ao processo de cozedura no forno que, pela conjugação dos fatores temperatura/tempo, constitui uma etapa do processo que contribui para a eliminação/redução de perigos biológicos, sendo por isso considerada uma zona de menor risco. A segunda, corresponde às áreas em que o produto já foi sujeito ao tratamento térmico do forno e está exposto às condições ambientais. Nesta zona, não existirá outro processo (na linha de produção e de cozedura, por parte do cliente que adquirir o produto, visto que os produtos Dan Cake se inserem na categoria de alimentos prontos-a-comer) que elimine uma potencial contaminação microbiológica do produto, até este ser embalado, sendo por isso considerada uma zona de maior risco do que a zona de massas. Por este motivo, os critérios de aceitação para parâmetros microbiológicos têm valores superiores para amostras da zona de massas do que para amostras da zona de arrefecimento/embalagem.

As Tabelas 11 a 15 resumem os resultados que foram obtidos ao longo do estágio, entre novembro de 2019 e maio de 2020, referentes às análises microbiológicas realizadas às superfícies de equipamentos de vários pontos da fábrica, para verificação da eficácia do plano de higienização implementado para cumprimento da frequência do plano de amostragem referido no ponto 3.1. Os resultados que se encontram acima dos critérios de aceitação encontram-se devidamente assinalados.

Tabela 11 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos da zona de massas da fábrica.

Zona	Equipamento	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
			Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Zona de Massas	Vara de bateadeira ^a	05/12/2019	1	1	<1	<1	Equipamentos higienizados no fim de produção
	Bateadeira ^a	05/12/2019	1	<1	<1	<1	
	Panela ^b	05/12/2019	<1	1	<1	<1	
	Tela de transporte n.º1 ^c	05/12/2019	2	4	<1	<1	

^a - Os equipamentos “Vara de bateadeira” e “bateadeira” correspondem a equipamentos onde se faz a junção e amassagem das matérias-primas para formar as massas cruas que vão dar origem aos produtos;

^b - A “Panela” corresponde a um equipamento onde é cozinhada uma matéria-prima para dar origem a um dos produtos da empresa;

^c - as “Telas de transporte” n.ºs 1 a 4 dizem respeito a passadeiras/tapetes lisos onde é feito o trajeto do produto (ainda cru) ao longo das linhas de produção, antes da passagem pelo forno.

Tabela 11 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos da zona de massas da fábrica (2ª parte).

Zona	Equipamento	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
			Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Zona de Massas	Tela de transporte n.º2 _c	15/04/2020	1	<1	<1	<1	Equipamentos higienizados no fim de produção
	Tela de transporte n.º3 _c	15/04/2020	2	<1	<1	<1	
	Tela de transporte n.º4 _c	15/04/2020	2	<1	<1	<1	

^c - as “Telas de transporte” n.ºs 1 a 4 dizem respeito a passadeiras/tapetes lisos onde é feito o trajeto do produto (ainda cru) ao longo das linhas de produção, antes da passagem pelo forno.

Pela observação da Tabela 11, constata-se que todas as análises a superfícies de equipamentos em contacto direto com o produto na Zona de Massas cumpriram os requisitos estabelecidos, não tendo sido obtido nenhum resultado acima dos critérios de aceitação para nenhum dos microrganismos pesquisados.

Observa-se, ainda, que o nível de contaminação do parâmetro “Microrganismos a 30°C” se revela bastante reduzido, uma vez que os resultados obtidos variaram entre <1 UFC/ml e 2 UFC/ml, que se encontram bastante abaixo do limite de aceitação de $1,0 \times 10^3$ UFC/ml. Para o parâmetro “Bolores”, que tem como limite de aceitação $1,0 \times 10^2$ UFC/ml, os resultados obtidos oscilaram entre <1 UFC/ml e 4 UFC/ml. Por fim, para os parâmetros “Leveduras” e “*E. coli*”, com limites de aceitação de $1,0 \times 10^2$ UFC/ml e <1 UFC/ml, respetivamente, todos os resultados obtidos foram inferiores a 1 UFC/ml.

Deste modo, os resultados da Tabela 11 revelam uma elevada eficácia e adequabilidade do plano de higienização implementado pela empresa na zona de massas da fábrica.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos nas análises microbiológicas às superfícies de equipamentos em contacto direto com o produto na zona de arrefecimento e embalagem.

Tabela 12 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos da Zona de arrefecimento e embalagem das linhas de produção na fábrica.

Zona	Equipamento	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
			Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Linhas - Zona de arrefecimento/embalagem	Linha 11 – Tela de transporte n.º1 ^a	21/11/2019	1,2x10 ¹	4	<1	<1	Equipamentos higienizados no fim de produção
	Linha 11 - Tela de transporte n.º2 ^a	21/11/2019	4	5	<1	<1	
	Linha 11 – Bancada de escolha de produto	21/11/2019	1,0x10 ¹	2	<1	<1	
	Linha 9 – Cilindro de arrefecimento ^b	05/12/2020	<1	1	<1	<1	Equipamentos higienizados no fim de produção
	Linha 9 – Funil de distribuição ^c	05/12/2020	2	3	<1	<1	
	Linha 7 – Tela de transporte n.º1 ^a	22/01/2020	1	<1	<1	<1	Linha em mudança de produção
	Linha 7 - Tela de transporte n.º2 ^a	22/01/2020	7,4x10 ¹	<1	<1	<1	Linha em mudança de produção
	Linha 7 - Tela de transporte n.º3 ^a	22/01/2020	<1	<1	<1	<1	Linha em mudança de produção

^a - Os equipamentos denominados “Telas de transporte” dizem respeito a passadeiras/tapetes lisos onde é feito o trajeto do produto já cozinhado ao longo das linhas de produção, após a passagem pelo forno;

^b - O “Cilindro de arrefecimento” da Linha 9 corresponde a um equipamento/estrutura cilíndrica giratória que faz a peneiração de produto indevidamente cozinhado, e é constituído por orifícios que se considera de difícil acesso para as tarefas de higienização;

^c - O “Funil de distribuição” da Linha 9 auxilia no doseamento de quantidades determinadas de produto na embalagem;

Tabela 12 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos da zona de arrefecimento e embalagem das linhas de produção na fábrica (2ª parte).

Zona	Equipamento	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
			Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Linhas - Zona de arrefecimento/embalagem	Linha 1 - Tela de transporte n.º1 ^a	23/01/2020	<1	<1	<1	<1	Equipamentos higienizados no dia das colheitas
	Linha 1 – Ventoinha ^d	23/01/2020	<1	<1	<1	<1	
	Linha 1 – Tela de transporte n.º2 ^a	23/01/2020	<1	<1	<1	<1	
	Linha 4 – Alinhador n.º1 ^e	06/02/2020	<1	1	<1	<1	Equipamentos higienizados dois dias antes das colheitas
	Linha 4 – Alinhador n.º2 ^e	06/02/2020	<1	3	<1	<1	
	Linha 4 - Ventoinha	06/02/2020	1	3	<1	<1	
	Linha 10 – Injetor de recheio n.º1 ^f	06/02/2020	<1	<1	<1	<1	Equipamentos higienizados dois dias antes e colocados em solução desinfetante até à data das colheitas
	Linha 10 – Injetor de recheio n.º2 ^f	06/02/2020	<1	<1	<1	<1	

^d - Os equipamentos “Ventoinha” permitem um arrefecimento mais rápido do produto, não estão em contacto direto com o produto, mas encontram-se acima do nível do produto ao longo da linha, pelo que se considera pertinente a recolha de amostras neste equipamento.

^e - Os “Alinhadores” n.ºs 1 e 2 da Linha 4 fazem o alinhamento do produto antes da etapa de embalagem;

^f - Os “Injetores de recheio” n.ºs 1 e 2 dizem respeito a partes de um equipamento com uma estrutura irregular e com orifícios;

Tabela 12 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos da zona de arrefecimento e embalagem das linhas de produção na fábrica (3ª parte).

Zona	Equipamento	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
			Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Linhas - Zona de arrefecimento/embalagem	Linha 10 – Depósito de recheio ^g	06/02/2020	<1	<1	<1	<1	Equipamento higienizado dois dias antes, fechado e vedado com película aderente até à data das colheitas
	Linha 8 - Desmoldador ^h	21/02/2020	<1	<1	<1	<1	Equipamento higienizado dois dias antes da colheita
	Linha 8 – Separador ^h	21/02/2020	<1	1	<1	<1	Equipamentos higienizados um dia antes das colheitas
	Linha 8 - Alinhador	21/02/2020	<1	<1	<1	<1	
	Linha 10 – Tela de transporte n.º1	15/04/2020	<1	<1	<1	<1	Equipamentos higienizados um dia antes das colheitas
	Linha 10 – Tela de transporte n.º2	15/04/2020	1	<1	<1	<1	

^g - O “Depositador de recheio” é composto por superfícies planas, sendo que os três equipamentos são responsáveis pela injeção de recheio num dos tipos de produto, já após a etapa de cozedura, ou seja, após o último tratamento de letalidade antes da embalagem;

^h - Os equipamentos “Desmoldador” e “Separador” da linha 8 recebem o produto vindo do forno e preparam-no para a etapa de embalagem, sendo compostos de superfícies irregulares.

A Tabela 12 revela que todas as análises a superfícies de equipamentos em contacto direto com o produto na Zona de Arrefecimento apresentam resultados bastante satisfatórios, não tendo sido obtido nenhum resultado acima dos critérios de aceitação para nenhum dos microrganismos pesquisados. Os resultados para o parâmetro “Microrganismos a 30°C” são bastante satisfatórios, uma vez que os resultados obtidos variaram entre <1 UFC/ml e $7,4 \times 10^1$ UFC/ml, estando abaixo do limite de aceitação de $1,0 \times 10^2$ UFC/ml, sendo a maioria dos resultados inferiores a 1 UFC/ml. Para o parâmetro “Bolores”, que tem como limite de aceitação $5,0 \times 10^1$ UFC/ml, os resultados obtidos oscilaram entre <1 UFC/ml e 5 UFC/ml. Para os parâmetros “Leveduras” e “*E. coli*”, com limites de aceitação de $5,0 \times 10^1$ UFC/ml e <1 UFC/ml, respetivamente, todos os resultados obtidos foram inferiores a 1 UFC/ml.

Estes resultados demonstram que o plano de higienização é adequado e eficaz na obtenção de superfícies de equipamentos livres de contaminação microbiológica. Os resultados obtidos em análises à Zona de arrefecimento/embalagem são particularmente de extrema importância, uma vez que revelam uma baixa probabilidade de contaminação do produto por contacto com superfícies de equipamentos a jusante da passagem pelo forno, ou seja, na fase da produção em que o produto já foi sujeito a tratamento térmico, que permite a redução do risco de contaminações microbiológicas, e já não será submetido a novo tratamento de eliminação de perigos biológicos até ao seu consumo.

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos nas análises microbiológicas às superfícies de utensílios utilizados como apoio à produção e que entram em contacto direto matérias-primas ou com produto cozinhado.

Tabela 13 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos/utensílios de apoio à produção, que entram em contacto com matérias-primas ou produto.

Zona	Equipamento/ Utensílio	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
			Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Utensílios de apoio à produção	Pote de dextrose ^a	05/12/2019	1	4	<1	<1	Utensílio higienizado e a secar no suporte
	Vara de pote de dextrose ^a	05/12/2019	Acima do limite de aceitação	<1	Acima do limite de aceitação	<1	Utensílio em solução desinfetante. Repetir amostragem.
	Torneira de pote de dextrose ^a	05/12/2019	Acima do limite de aceitação	<1	Acima do limite de aceitação	<1	Utensílio em solução desinfetante. Repetir amostragem.
	Baldes ^a	05/12/2019	Acima do limite de aceitação	<1	Acima do limite de aceitação	<1	Utensílio desinfetado e a secar. Repetir amostragem.
	Tampos dos baldes ^a	05/12/2019	4,3x10 ¹	<1	<1	<1	Utensílio desinfetado e a secar

^a - Os utensílios Pote de dextrose, Vara de pote de dextrose, Torneira de pote de dextrose, Baldes e Tampos dos baldes são componentes de recipientes utilizados para transportar matérias-primas.

Tabela 13 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos/utensílios de apoio à produção, que entram em contacto com matérias-primas ou produto (2ª parte).

Zona	Equipamento/ Utensílio	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
			Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Utensílios de apoio à produção	Tabuleiros de produto ^b	05/12/2019	1,0x10 ¹	<1	<1	<1	Utensílios desinfetados
	Carro de matéria-prima ^c	05/12/2019	<1	<1	<1	<1	Utensílio higienizado
	Tubo da máquina de gelo ^d	06/02/2020	<1	<1	<1	<1	Utensílio higienizado no dia da colheita
	Tabuleiros de produto ^b	06/02/2020	4	8	<1	<1	Utensílios higienizados dois dias antes da colheita
	Lâmina da máquina de moagem ^e	06/02/2020	<1	<1	<1	<1	Utensílio higienizado um dia antes da colheita
	Peneiro da máquina de moagem ^e	06/02/2020	1	5	<1	<1	Utensílio com resíduos visíveis de matéria orgânica
	Tubo metálico para ovo ^f	06/02/2020	<1	<1	<1	<1	Utensílios mergulhados em solução desinfetante, e posteriormente enxaguados e secos para efetuar a colheita

^b - Os Tabuleiros de produto são utensílios utilizados numa linha de produção na Dan Cake para transportar e guardar produtos após a passagem pelo forno e antes da etapa de embalagem;

^c - Carro de matéria-prima consiste num recipiente para transporte de gelo ou ovo, com grande área de superfície lisa;

^d - Tubo da máquina de gelo diz respeito a um tubo por onde é recolhido gelo para incorporação em massas;

^e - “Lâmina” e “Peneiro de máquina de moagem” são partes de um equipamento que faz a moagem de excedentes da produção para incorporação em massas;

^f - O Tubo metálico para ovo é um utensílio utilizado na recolha de amostras de ovo diretamente do pote que contém esta matéria-prima.

Tabela 13 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies de equipamentos/utensílios de apoio à produção, que entram em contacto com matérias-primas ou produto (3ª parte).

Zona	Equipamento/ Utensílio	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
			Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Utensílios de apoio à produção	Cortante para contentor ^f	06/02/2020	1	<1	<1	<1	Utensílios mergulhados em solução desinfetante e posteriormente enxaguados e secos para efetuar a colheita
	Torneira para ovo ^f	06/02/2020	<1	<1	<1	<1	
	Carro de matéria-prima ^c	15/04/2020	1	<1	<1	<1	Utensílio higienizado
	Baldes ^a	15/04/2020	Acima do limite de aceitação	<1	Acima do limite de aceitação	<1	Utensílios desinfetados e a secar. Repetir amostragem
	Tampos dos baldes ^a	15/04/2020	Acima do limite de aceitação	<1	2,6x10 ¹	<1	Utensílio desinfetado e a secar. Repetir amostragem
	Vara de pote de dextrose ^a	15/04/2020	<1	<1	<1	<1	Utensílios mergulhados em solução desinfetante
	Torneira de pote de dextrose ^a	15/04/2020	<1	<1	<1	<1	
	Pote de dextrose ^a	15/04/2020	<1	<1	<1	<1	
Pote de aroma ^a	21/04/2020	<1	<1	<1	<1	Utensílio higienizado no dia da colheita	

^a - Os utensílios Pote de dextrose, Vara de pote de dextrose, Torneira de pote de dextrose, Baldes, Tampos dos baldes e Pote de aroma são componentes de recipientes utilizados para transportar matérias-primas;

^f – O Cortante para contentor e Torneira para ovo são utensílios utilizados na recolha de amostras de ovo diretamente do pote que contém esta matéria-prima.

Os resultados apresentados na Tabela 13 indicam que, dos 21 resultados nela apresentados, 16 amostragens tiveram resultados analíticos abaixo dos limites de aceitação para todos os parâmetros, enquanto 5 amostragens de superfícies tiveram resultados acima dos critérios de aceitação para, pelo menos, um parâmetro microbiológico: os utensílios “Vara de pote de dextrose”, “Torneira de pote de dextrose”, “Tampos dos baldes” e, por fim, duas

amostragens para o utensílio “Baldes”, uma a 05/12/2019 e outra a 15/04/2020, cada uma feita em datas para cumprimento do Plano de Amostragem.

Os resultados obtidos para o parâmetro “Microrganismos a 30°C”, à exceção dos 5 resultados acima do critério de aceitação (de $1,0 \times 10^2$ UFC/ml), oscilaram entre <1 UFC/ml e $4,3 \times 10^1$ UFC/ml. Para o parâmetro “Bolores”, que tem como limite de aceitação $5,0 \times 10^1$ UFC/ml, todos os resultados obtidos situaram-se abaixo do limite de aceitação, variando entre <1 UFC/ml e 8 UFC/ml. Para o parâmetro “Leveduras”, com exceção dos 4 resultados acima do critério de aceitação de $5,0 \times 10^1$ UFC/ml, os valores obtidos para as restantes superfícies analisadas variaram entre <1 UFC/ml e $2,6 \times 10^1$ UFC/ml. Por fim, todos os resultados para o parâmetro “*E. coli*” foram inferiores a <1 UFC/ml.

O procedimento a tomar no seguimento dos resultados acima dos critérios de aceitação para, pelo menos, um parâmetro, é a repetição da análise microbiológica completa à superfície em questão, cujos resultados analíticos serão descritos mais à frente. A repetição das amostragens é feita com a maior brevidade possível após receção do boletim analítico do laboratório externo, e o seu objetivo é a verificação da tendência de resultados.

Por último, a Tabela 14 apresenta os resultados obtidos nas análises a mangueiras que compõem o Sistema CIP. Um sistema CIP é um circuito fechado da fábrica composto por tubagens, que pode ser higienizado através da drenagem do produto, seguida da circulação de uma sequência de soluções e lavagens com água que limpam e desinfetam as tubagens do circuito (Adams & Moss, 2000). Este circuito, do qual as mangueiras referidas fazem parte, é utilizado para o transporte de ovos, que vão ser usados como matéria-prima.

Tabela 14 - Resultados obtidos na verificação do estado microbiológico de superfícies interiores de mangueiras usadas no sistema CIP / circuito de ovos.

Zona	Utensílio	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
			Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Sistema CIP	Mangueira Manual ^a	05/12/2019	<1	<1	<1	<1	Colheita após desinfecção e secagem
	Mangueira Linha 4 ^a	05/12/2019	Acima do limite de aceitação	<1	<1	<1	Colheita após desinfecção e secagem. Repetir amostragem
	Mangueira Manual ^a	10/03/2020	<1	<1	<1	<1	Colheita após desinfecção e secagem
	Mangueira Linha 8 ^a	10/03/2020	Acima do limite de aceitação	<1	<1	<1	Colheita após desinfecção e secagem.
	Mangueira do pote ^a	26/03/2020	<1	<1	<1	<1	Utensílio higienizado no dia da colheita

^a – A Mangueira é um utensílio que faz parte do circuito de transporte de ovos, e também do sistema CIP.

É possível observar na Tabela 14 que houve duas amostragens que tiveram resultados analíticos acima dos critérios de aceitação para pelo menos um parâmetro: as mangueiras “Linha 4” e “Linha 8”. Estas mangueiras excederam o limite de aceitação de $1,0 \times 10^2$ UFC/ml para o parâmetro “Microrganismos a 30°C”. No entanto, para o mesmo parâmetro, as restantes mangueiras analisadas obtiveram resultados inferiores a <1 UFC/ml. Quanto aos parâmetros “Bolors”, “Leveduras” e *E. coli*, todas as mangueiras analisadas apresentaram resultados inferiores a <1 UFC/ml.

Na tabela seguinte, apresenta-se os resultados das repetições de amostragens feitas a todas as superfícies acima mencionadas cujas análises microbiológicas excederam os critérios de aceitação da empresa em pelo menos um parâmetro.

Tabela 15 - Comparação dos resultados analíticos das repetições das amostragens de todas as superfícies que obtiveram resultados acima dos critérios de aceitação para pelo menos um parâmetro, com os respetivos resultados da sua primeira amostragem.

Utensílio	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
		Microrganismos a 30°C	Bolors	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Vara de pote de dextrose	05/12/2019	Acima do limite de aceitação	<1	Acima do limite de aceitação	<1	Utensílio em solução desinfetante. Repetir amostragem.
	18/12/2019 Repetição	1	<1	<1	<1	Utensílio em solução desinfetante.
Torneira de pote de dextrose	05/12/2019	Acima do limite de aceitação	<1	Acima do limite de aceitação	<1	Utensílio em solução desinfetante. Repetir amostragem.
	18/12/2019 Repetição	1	<1	<1	<1	Utensílio mergulhado em solução desinfetante.
Mangueira Linha 8	10/03/2020	Acima do limite de aceitação	<1	<1	<1	Colheita após desinfecção e secagem.
	26/03/2020 Repetição	<1	<1	<1	<1	Equipamento higienizado no dia da colheita.
Mangueira Linha 4	05/12/2019	Acima do limite de aceitação	<1	<1	<1	Colheita após desinfecção e secagem. Repetir amostragem
	22/01/2020 Repetição	<1	<1	<1	<1	Equipamento desinfetado no dia da colheita.

Tabela 15 - Comparação dos resultados analíticos das repetições das amostragens de todas as superfícies que obtiveram resultados acima dos critérios de aceitação para pelo menos um parâmetro, com os respetivos resultados da sua primeira amostragem (2ª parte).

Utensílio	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
		Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Baldes	05/12/2019	Acima do limite de aceitação	<1	Acima do limite de aceitação	<1	Utensílio desinfetado e a secar. Repetir amostragem.
	18/12/2019 Repetição	<1	2	<1	<1	Utensílio desinfetado e a secar.
Baldes	15/04/2020	Acima do limite de aceitação	<1	Acima do limite de aceitação	<1	Utensílios desinfetados e a secar. Repetir amostragem
	<i>Resultados da repetição da análise não foram obtidos até à data de término do estágio</i>					
Tampos dos baldes	15/04/2020	Acima do limite de aceitação	<1	2,6x10 ¹	<1	Utensílio desinfetado e a secar. Repetir amostragem
	<i>Resultados da repetição da análise não foram obtidos até à data de término do estágio</i>					

Como é possível observar na Tabela 15, a repetição de cada uma das análises demonstra que os resultados inicialmente obtidos acima dos critérios de aceitação se trataram de uma situação pontual, sendo que os resultados da 1ª contra-análise a todas as superfícies se encontram dentro dos critérios de aceitação, com valores inferiores iguais ou inferiores a 2 UFC/ml para todos os parâmetros. Esta é uma evidência de que os primeiros resultados de cada análise poderão apenas ter sido devidos a uma contaminação pontual na superfície dos utensílios, a erros no procedimento de amostragem, ou ao não-cumprimento rigoroso do modo operativo de higienização estabelecido pela empresa. De facto, na empresa existe rotatividade de postos de trabalho, pelo que os trabalhos de higienização poderão não ser realizados pelos mesmos colaboradores.

Quando surgiu a necessidade de fazer novamente análises ao utensílio “Baldes” no dia 15/04/2020, para cumprimento da frequência estabelecida no plano de amostragem (e não como repetição de análises), houve resultados acima dos limites de aceitação para “Microrganismos a 30°C” e para “Leveduras”.

No mesmo dia desta amostragem foi também recolhida uma amostra ao utensílio “Tampos dos baldes”, cujo resultado analítico ultrapassou o limite de aceitação para “Microrganismos a 30°C”. O procedimento imediato a tomar para estas análises foi, como todas as anteriores,

a sua repetição, após sensibilização dos colaboradores que efetuaram a sua higienização. Porém, as amostragens de repetição foram realizadas nos últimos dias de atividade prática do estágio, pelo que os boletins com os resultados analíticos ainda não se encontravam disponíveis à data de término da escrita da presente dissertação.

Prevê-se que os novos resultados serão satisfatórios, visto que os primeiros resultados acima dos critérios de aceitação poderão ter sido causados, tal como para os outros utensílios, por contaminações pontuais ou pela inadequada aplicação do método de higienização estabelecido, situação que poderá já estar resolvida na higienização que antecede a repetição das colheitas. Outro dos motivos para a forte convicção de que os resultados acima dos critérios não serão problemáticos, é o facto de haver uma tendência de resultados conformes para estes utensílios, de acordo com o histórico da empresa. Não obstante, visto que estes utensílios são usados no transporte de matérias-primas, encontrando-se por isso a montante da fase de tratamento térmico do forno, uma eventual perda de controlo na higienização dos utensílios “Balões” e “Tampas dos balões” teria menor risco para a segurança alimentar do que uma contaminação de utensílios que entram em contacto com o produto após a etapa do forno.

Durante o estágio, surgiu a oportunidade de intervir num plano de ações que estava a ser posto em prática pela empresa ao equipamento “Depositor de açúcar”. Este equipamento situa-se na zona de massas de uma linha de produção na fábrica, e é responsável pela deposição de uma cobertura de açúcar no topo da massa já formada de um dos produtos e, de seguida, pela sucção do açúcar excedente que foi depositado, antes da passagem pelo forno. Meses antes da data de início do estágio, uma análise microbiológica à superfície deste equipamento no dia da sua higienização originou resultados acima dos critérios de aceitação. Posteriormente, foi repetida a análise um dia após a higienização, tendo os resultados sido novamente acima dos critérios de aceitação. O plano de higienização para este equipamento consistia, até à data da primeira repetição de análises, no indicado na Tabela 16:

Tabela 16 - Plano de higienização do equipamento “Depositador de açúcar” anteriormente implementado na empresa, antes das sucessivas análises com resultados acima dos critérios de aceitação.

Local de aplicação	Procedimento (obsoleto)	Frequência	Produtos químicos usados
Depositador de açúcar	1 – Limpar o interior do sistema de deposição e sucção do açúcar com ar comprimido; 2 – Passar um pano embebido na solução de lavagem no exterior do sistema de distribuição de açúcar; 3 – Passar um pano com água limpa, para enxaguar.	Fim de produção	Detergente de uso geral
	1 – Lavar o sistema de deposição de açúcar apenas com água; 2 – Abrir o sistema de sucção de açúcar e lavar o interior do cone metálico com água sob pressão; 3 – Lavar os reservatórios de recolha de resíduos. 4 – Deixar secar.	Semanal	-
	1 – Escovar o sistema de deposição de açúcar com a solução de lavagem e enxaguar; 2 – Desmontar o cone metálico e o tubo de sucção de açúcar, levar para a banca de lavagem, escovar com a solução de lavagem e enxaguar; 3 – Deixar secar.	Quadrimestral	Detergente de uso geral

De seguida, a empresa testou a possibilidade de, após a higienização semanal, fazer uma pulverização da superfície com desinfetante de base alcoólica. No entanto, a segunda repetição de análises originou novamente resultados acima dos critérios de aceitação. De forma semelhante, a empresa testou, posteriormente, a utilização de um detergente/desinfetante alcalino clorado para fazer a lavagem semanal, e a terceira repetição de análises originou também resultados acima dos critérios de aceitação. É importante reforçar que todo este procedimento foi realizado antes da data de início de estágio.

Deste modo, durante o estágio, testou-se um novo procedimento de higienização para ser aplicado semanalmente, que consistiu em fazer a lavagem do equipamento com detergente/desinfetante alcalino clorado, seguindo-se uma pulverização com desinfetante de base alcoólica. Os resultados analíticos da amostragem feita ao equipamento no dia 23/01/2020, no dia em que foi feita a higienização, estão expressos na Tabela 17:

Tabela 17 - Resultados analíticos da primeira e segunda amostragem ao equipamento “Depositor de açúcar” feitas em estágio. A primeira amostragem serviu como verificação da eficácia de um novo procedimento de higienização. A segunda amostragem teve como objetivo a validação do novo procedimento e conseqüente alteração do plano de higienização do equipamento.

Equipamento	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)				Observações
		Microrganismos a 30°C	Bolores	Leveduras	<i>E. coli</i>	
Depositor açúcar	23/01/2020	<1	<1	<1	<1	Equipamento higienizado com alcalino clorado e desinfetante de base alcoólica no dia da colheita.
Depositor açúcar	21/02/2020	<1	<1	<1	<1	Equipamento higienizado com alcalino clorado e desinfetante de base alcoólica no dia anterior à colheita.

Como é possível observar na Tabela 17, o novo procedimento de higienização testado parece ser adequado e eficaz, visto que não só os resultados estão dentro dos limites de aceitação para todos os parâmetros, como foram atingidos valores inferiores a 1UFC/ml para cada um dos parâmetros em estudo. O procedimento de higienização testado mostrou reduzir a contaminação microbiológica da superfície, criando assim um ambiente adequado à produção de alimentos.

Para demonstrar que este procedimento de higienização é eficaz e deve ser implementado no plano de higienização, foi necessário fazer a sua validação através de novas análises microbiológicas. Os resultados da validação, também apresentados na Tabela 17, foram novamente bastante satisfatórios e, por isso, o método de higienização semanal foi alterado e continuará a ser implementado. Por fim, fez-se a alteração do plano de higienização e instrução de higiene para este equipamento, para que este seja adotado como regra por todos os colaboradores afetos à higienização da linha de produção onde este equipamento se inclui (Tabela 18), tendo sido criado um registo específico para as tarefas de higiene deste equipamento.

Tabela 18 - Novo plano de higienização implementado na empresa para o equipamento “Depositorador de açúcar”, após validação através de duas análises microbiológicas satisfatórias sucessivas à superfície do equipamento.

Local de aplicação	Procedimento (atualizado)	Frequência	Produtos químicos usados
Depositorador açúcar	1 – Limpar o interior do sistema de deposição e sucção do açúcar com ar comprimido; 2 – Passar um pano embebido na solução de lavagem no exterior do sistema de distribuição de açúcar; 3 – Passar um pano com água limpa, para enxaguar.	Fim de produção	Detergente de uso geral
	1 - Lavar o sistema de deposição de açúcar com alcalino clorado (deixando atuar durante 15 minutos), enxaguar e deixar secar; 2 - Aplicar desinfetante de base alcoólica. 3 - Abrir o sistema de sucção de açúcar e lavar o interior do cone metálico, com água sob pressão; 4 - Lavar os reservatórios de recolha de resíduos com água sob pressão; 5 - Deixar secar.	Semanal	Alcalino clorado; Desinfetante de base alcoólica.
	1 - Escovar o sistema de distribuição de açúcar com solução de lavagem e enxaguar; 2 - Desmontar o cone metálico e o tubo de sucção de açúcar, levar para a banca de lavagem, escovar com a solução de lavagem e enxaguar; 3 - Deixar secar.	Quadrimestral	Detergente de uso geral

Da leitura dos resultados anteriormente referidos, é possível concluir que, à exceção das amostras de 15/04/2020 realizadas aos utensílios “Balões” e “Tampas de baldes” (que ainda aguardam resultados da repetição de análises), para todas as restantes superfícies analisadas (55 amostras) no âmbito da monitorização da eficácia da higienização de equipamentos e utensílios, foi possível obter resultados dentro dos limites de aceitação para todos os parâmetros microbiológicos analisados.

Deste modo, os valores obtidos para o parâmetro “Microrganismos a 30°C” (também denominado “mesófilos aeróbios”) nas análises a superfícies, variaram entre <1 UFC/ml e $7,4 \times 10^1$ UFC/ml, com um valor médio de 3,2 UFC/ml. Este parâmetro constitui um dos melhores indicadores da qualidade microbiológica dos alimentos, fornecendo indicações tanto das condições higiénicas da sua manipulação e armazenamento, como também dos potenciais riscos para a saúde do consumidor (Bofill et al., 2006).

Foram encontrados valores superiores de mesófilos aeróbios em estudos realizados em fábricas de processamento de carne: Eisel et al. (1997) obteve valores de mesófilos aeróbios

entre $1,6 \times 10^2$ UFC/cm² e $5,0 \times 10^3$ UFC/cm² (que correspondem a $1,6 \times 10^2$ e $5,0 \times 10^3$ UFC/ml, respetivamente). Estes valores são muito superiores aos obtidos na fábrica onde foi realizado o estágio. No entanto, este autor, para amostras recolhidas imediatamente após higienização para verificar a eficácia deste programa, obteve valores muito reduzidos de mesófilos, mais concordantes com os obtidos no estágio. Valores superiores de mesófilos aeróbios na indústria de processamento de carne foram também obtidos por Kim & Yim (2017), oscilando entre $4,9 \times 10^1$ UFC/cm² e $7,4 \times 10^3$ UFC/cm² (correspondentes a $4,9 \times 10^1$ e $7,4 \times 10^3$ UFC/ml, respetivamente), e por Cetin et al. (2006), com resultados mais aproximados aos do estágio, obtendo contagens de mesófilos aeróbios entre $1,7 \times 10^2$ UFC/ml e $1,0 \times 10^3$ UFC/ml. A indústria do processamento de carne tem características diferentes da indústria de pastelaria de conservação, como é o caso da Dan Cake, e que podem justificar os valores mais elevados de mesófilos obtidos por estes autores. Além disso, os animais vivos contêm microrganismos no trato intestinal. Estes microrganismos com origem no animal podem, durante o abate, contaminar a sua carne e o ambiente de processamento (Borch & Arinder, 2002). A este facto acresce que a carne é considerada uma importante fonte de proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas do complexo B e minerais. Devido a esta composição rica, e uma vez que pode ficar retida nas superfícies de equipamentos, se estes não forem corretamente higienizados, a carne oferece um ambiente altamente favorável ao crescimento de microrganismos (Barros et al., 2007; Forsythe, 2011).

Gibson et al. (1999) avaliou a eficácia de programas de limpeza e desinfeção em oito fábricas da indústria alimentar, através de amostragem de superfícies por zaragatoa e posterior análise de mesófilos aeróbios. A análise das superfícies antes da limpeza, após procedimentos de limpeza e após procedimentos de limpeza e desinfeção resultou em cargas médias de mesófilos de $1,3 \times 10^5$ UFC/ml, $8,7 \times 10^3$ UFC/ml e $2,5 \times 10^2$ UFC/ml, respetivamente. Este estudo serve como exemplo da evolução da redução de mesófilos ao longo das várias etapas de um processo de higienização numa indústria alimentar, uma vez que no presente estágio apenas foram feitas análises microbiológicas após os procedimentos de higienização, de modo a verificar a sua eficácia. Contudo, o valor de mesófilos aeróbios obtido neste estudo após os processos de limpeza e desinfeção ($2,5 \times 10^2$ UFC/ml), ou seja, em condições semelhantes às amostragens feitas durante o estágio, é maior do que todos os valores obtidos ao longo deste período.

Os valores obtidos no presente estágio para análises a superfícies variaram entre <1 UFC/ml e 8 UFC/ml para o parâmetro “Bolors”, com um valor médio de 0,9 UFC/ml. Quanto ao parâmetro “Leveduras”, todas as análises realizadas obtiveram resultados inferiores a 1 UFC/ml. Estes parâmetros indicam a presença de microrganismos associados à deterioração de alimentos, uma vez que promovem alterações na textura, cheiro, sabor ou aparência dos alimentos, o que faz com que estes fiquem indesejáveis ou inaceitáveis para o consumo humano, apesar de poderem permanecer seguros para comer, se não forem produzidas micotoxinas pelos fungos (Rawat, 2015). Apesar de os bolors e leveduras terem a capacidade de crescer em alimentos com menor a_w do que bactérias, o que poderia ser um risco para os produtos Dan Cake, os resultados obtidos nas análises a equipamentos e

utensílios, ao longo do estágio, para este parâmetro, são bastante reduzidos, pelo que há um menor risco de contaminação dos produtos através destas superfícies (Baptista & Linhares, 2005).

Valores superiores foram obtidos por Lee et al. (2019), que obteve valores de bolores em amostras de superfícies de equipamentos e utensílios entre $2,5 \times 10^2$ UFC/ml e $1,8 \times 10^{10}$ UFC/ml, numa fábrica de processamento de salsichas fermentadas. Para o mesmo autor, os resultados obtidos para o parâmetro “Leveduras” oscilaram entre $1,0 \times 10^2$ UFC/ml e $6,0 \times 10^5$ UFC/ml. Miettinen et al. (2001), num estudo realizado em várias fábricas de processamento de peixe, obteve alguns resultados convergentes com os resultados obtidos no presente estágio, com cerca de 39% das amostras de superfícies de equipamentos e utensílios, com contagens de leveduras entre 0,2 UFC/ml e 1,8 UFC/ml. No entanto, as restantes amostras de equipamentos chegaram a atingir valores de leveduras de 6,8 UFC/ml. Para o mesmo autor, as contagens de bolores nas mesmas superfícies oscilaram entre 0,3 UFC/ml e 1,0 UFC/ml. De forma semelhante, Calasso et al. (2016), em amostras recolhidas a superfícies de uma fábrica da indústria de laticínios, obteve contagens de leveduras inferiores a 1 UFC/ml em 50% das superfícies. Porém o nível de contaminação por leveduras de outras amostras recolhidas atingiu $4,9 \times 10^3$ UFC/ml, tendo o mesmo autor obtido valores de bolores entre <1 UFC/ml e $1,1 \times 10^3$ UFC/ml.

Mettler & Carpentier (1998) apontam leveduras como microrganismos predominantes (sem quantificação) em superfícies de uma fábrica de processamento de produtos de pastelaria (com características semelhantes à Dan Cake), considerada pelos autores como sendo um ambiente seco para a produção de alimentos, justificando-se a presença dominante de leveduras em detrimento de outros microrganismos. Também Carvalho (2017), numa empresa da indústria alimentar de *snacks* prontos-a-comer, detetou leveduras em algumas amostras ambientais recolhidas.

Geralmente, a presença de bactérias tende a dominar na maioria dos ambientes de produção de alimentos, em detrimento de bolores e leveduras (Møretrø & Langsrud, 2017). Uma exceção são os ambientes de produção de alimentos muito secos, como na produção de pastelaria, onde as leveduras foram os microrganismos dominantes para alguns autores (Mettler & Carpentier 1998; Bagge-Ravn et al., 2003; Minervini et al., 2015). Adicionalmente, em ambientes de produção de alimentos onde os microrganismos eucarióticos desempenham um papel ativo no processo de produção (como cervejarias, produção de vinho e produção de certos tipos de queijo), leveduras e bolores podem estar presentes em grande número (Bokulich et al. 2012; Bokulich & Mills, 2013; Stellato et al., 2015; Calasso et al., 2016).

Por fim, em relação ao parâmetro *E. coli*, é importante realçar que esta bactéria não foi detetada em nenhuma das amostras de superfícies de equipamentos anteriormente referidas. *E. coli* é um tradicional indicador de higiene e contaminação fecal em amostras ambientais, sendo um substituto prático para patogénicos entéricos na avaliação da higiene de superfícies em contacto com alimentos (Saad et al., 2013).

Do mesmo modo, no estudo realizado por Eisel et al. (1997), *E. coli* foi raramente encontrada em superfícies da fábrica de processamento de carne onde foi realizado o estudo. Resultados idênticos ao presente estágio foram também obtidos por Inácio (2015), numa indústria de panificação e pastelaria, e por Carvalho (2017). Para estes autores, não foi detetada *E. coli* em nenhuma das amostras de superfícies analisadas. No entanto, Çetin et al. (2006) obteve valores daquela bactéria de <1 UFC/ml até $1,4 \times 10^2$ UFC/ml em superfícies em contacto com alimentos numa fábrica de processamento de carne e, no mesmo estudo, não foi detetada a estirpe patogénica de *E. coli* O157:H7 em nenhuma das amostras de superfícies.

Por fim, as Tabelas 19 e 20 apresentam os resultados analíticos das amostragens feitas a superfícies de equipamentos e instalações para pesquisa dos patogénicos *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, respetivamente.

A pesquisa destes dois patogénicos teve como critério a amostragem de superfícies sem contacto com o produto, em frequências que variaram conforme o risco de cada zona da fábrica. A zona de massas é considerada uma zona de menor risco, uma vez que as matérias-primas ainda não foram sujeitas ao processo de cozedura no forno (uma etapa do processo que contribui para a eliminação/redução de perigos biológicos). Para além disso, as superfícies desta zona são amostradas com menor frequência do que superfícies da zona de arrefecimento/embalagem, que é uma zona considerada de maior risco, uma vez que o produto já foi sujeito ao tratamento térmico do forno e não existirá outro processo que elimine uma contaminação microbiológica do produto que ocorra nessa área, até que o produto seja embalado e consumido.

O subcritério para pesquisa de *Salmonella* spp., foi a amostragem das principais superfícies associadas a ambientes secos, por serem condições favoráveis à sobrevivência desta bactéria (Podolak et al., 2010; Van Doren et al., 2013). No caso de *L. monocytogenes*, o subcritério foi a amostragem das principais superfícies de locais associados a temperaturas baixas (de refrigeração ou de congelamento) e/ou elevada humidade (Ryser & Buchanan, 2013; Vivant et al., 2013). Na empresa, a amostragem deste patogénico é feita sobretudo em ralos de chão, uma vez que a literatura estabeleceu que estes servem como locais fiáveis para amostragem de *L. monocytogenes* (Dzieciol et al., 2016; Stessl et al., 2020; Saini et al., 2012).

A empresa em que se realizou o estágio nunca foi associada a qualquer tipo de surto de doenças de origem alimentar, e todos os produtos com humidade superior a 15% são alvo regular de análises microbiológicas para deteção de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.. No entanto, a sua pesquisa nas superfícies da empresa é importante, uma vez que a literatura mostra que estas bactérias são microrganismos patogénicos transmitidos por alimentos que contaminam tipicamente alimentos prontos-a-comer, através do ambiente de processamento ou de outras etapas após tratamento de letalidade, sendo desta forma responsáveis por vários surtos de doenças transmitidas por alimentos (Benoit et al., 2016; Ferreira et al., 2014).

A Tabela 19 revela que em nenhuma amostra recolhida foi detetada *Salmonella* spp., indicando a ausência de contaminação por um dos principais patogénicos envolvidos em doenças de origem alimentar, responsável pelo maior número de casos de doenças na

população da União Europeia no ano de 2018 (11 581 casos reportados), e pelo segundo maior número de mortes (8 mortes) (EFSA & ECDC, 2019).

Tabela 19 - Resultados analíticos obtidos das pesquisas a *Salmonella* spp. feitas nas instalações da empresa.

Zona	Equipamento/Amostra	Data de recolha	Resultado
Linhas - Zona Arrefecimento/Embalagem	Linha 1 – Estrutura metálica ao lado de tela de transporte	21/11/2019	Não Detetada
	Linha 1 – Bancada de apoio	21/11/2019	Não Detetada
	Linha 10 – Exterior de máquina de embalagem	21/11/2019	Não Detetada
	Linha 10 - Bancada de apoio a máquina de embalar	21/11/2019	Não Detetada
	Linha 3 - Ventoinhas	11/03/2020	Não Detetada
	Linha 3 – Paredes exteriores de forno	11/03/2020	Não Detetada
	Linha 11 – Lona de cobertura de tela de transporte	11/03/2020	Não Detetada
	Linha 11 - Exterior de máquina de embalagem	11/03/2020	Não Detetada
Refeitório	Cadeiras	11/03/2020	Não Detetada
Balneário	Banco	11/03/2020	Não Detetada
	Parede	11/03/2020	Não Detetada

Os resultados apresentados na Tabela 19 devem-se à adoção e cumprimento de Boas Práticas por todos os colaboradores, nomeadamente na manutenção de condições de higiene e limpeza e Higiene Pessoal.

Sabe-se que a carne de animais de consumo, o leite e os ovos são os principais veículos de transmissão de *Salmonella* (ASAE, 2020). De acordo com informação recolhida na literatura, Cotton & White (1992) não detetaram *Salmonella* spp. em nenhuma amostra ambiental em fábricas de produtos lácteos, corroborando os resultados obtidos no presente estágio. *Salmonella* spp. foi detetada por Gabis et al. (1989) em 3 de 245 amostras ambientais (1.2% das totais) recolhidas em fábricas de laticínios secos, e em apenas uma amostra ambiental numa fábrica de laticínios (0.2% das amostras totais recolhidas) por Beno et al. (2016). Piras et al. (2019) detetou *Salmonella* spp. em 6,6% de amostras ambientais de superfícies em contato com carne e em 5% de superfícies sem contato com carne, em instalações de processamento de enchidos.

Por fim, a Tabela 20 apresenta os resultados analíticos das amostragens feitas a superfícies de equipamentos e instalações para pesquisa do patogénico *L. monocytogenes*.

Tabela 20 - Resultados analíticos obtidos das pesquisas a *L. monocytogenes* feitas nas instalações da empresa.

Zona	Equipamento/Amostra	Data de recolha	Resultado
Linhas - Zona Arrefecimento/ Embalagem	Linha 10 - Ralo	05/12/2019	Não Detetada
	Linha 1 - Ralo	05/12/2019	Não Detetada
	Linha 9 - Ralo	15/04/2020	Não Detetada
	Linha 3 - Ralo	15/04/2020	Não Detetada

A Tabela 20, mostra que em nenhuma amostra recolhida foi detetada *L. monocytogenes*. Os resultados desta tabela indicam, assim, a ausência de contaminação pelo patógeno transmitido por alimentos responsável pelo maior número de mortes na União Europeia (21 mortes), e, ao mesmo tempo, com a maior taxa de mortalidade, com 13,2 mortes por cada 100 casos de infeção (EFSA & ECDC, 2019). Estes resultados devem-se, tal como referido anteriormente, à adoção e cumprimento de Boas Práticas por todos os colaboradores e à eficaz e correta implementação dos procedimentos de higienização das instalações e equipamentos.

Os resultados obtidos no presente estágio são distintos dos resultados encontrados na literatura para outros autores. Leong et al. (2014) obteve uma prevalência de 4,4% casos positivos de *L. monocytogenes* num total de 1574 amostras ambientais de instalações de processamento de alimentos de vários setores. Neste estudo, 30 das 48 instalações de processamento analisadas tiveram, pelo menos, uma amostra positiva de *L. monocytogenes*. No entanto, a maioria das instalações de processamento apresentou uma baixa prevalência de *L. monocytogenes*, entre 0% a 5%. O valor de prevalência obtido deve-se a alguns *outliers* que tiveram taxas de prevalência muito altas, e todos correspondentes a fábricas de processamento de laticínios.

L. monocytogenes está principalmente associada ao consumo de leite cru, ou laticínios produzidos com leite cru, peixe fumado e alguns enchidos (ASAE, 2020). Deste modo, para Beno et al. (2016), a prevalência desta bactéria patogénica em 4430 amostras ambientais recolhidas numa fábrica de processamento de queijo foi de 1.35%. De forma semelhante, vários outros investigadores relataram a presença de *L. monocytogenes* em ambientes de instalações de processamento de laticínios por todo o mundo (Almeida et al., 2013; Ho et al., 2007; Kabuki et al., 2004; Leong et al., 2014; Pritchard et al., 1995), tendo sido obtidas prevalências de 2.7% (Ho et al., 2007) até 25.6% de todas as amostras ambientais recolhidas (Almeida et al., 2013). Uma fonte potencial de contaminação do ambiente de processamento de alimentos por *L. monocytogenes* em instalações de produção de queijo artesanal pode ser o ambiente agropecuário externo às instalações, bem como o próprio leite cru, visto que Schoder et al. (2011) e Fox et al. (2009) relataram ocorrências de *L. monocytogenes* no ambiente de exploração de animais produtores de leite em 0,9% a 15,4% e 19% das superfícies amostradas, respetivamente. Para produtores de queijos à escala industrial, onde

a criação de animais não está localizada no mesmo complexo de edifícios, Almeida et al. (2013) observou uma prevalência quase nula de *L. monocytogenes* em amostras ambientais. Williams et al. (2011) relatou a ocorrência de *L. monocytogenes* em pequenas instalações de produção de carne pronta-a-comer, com variações de 1,7 a 10,8% das amostras ambientais recolhidas. De um total de 2242 amostras de ambientes de processamento de alimentos, Muhterem-Uyar et al. (2015) detetaram *L. monocytogenes* em 32% e 8,8% das amostras de ambientes de processamento de carne e laticínios, respetivamente, corroborando outros investigadores que detetaram maior prevalência de *L. monocytogenes* em fábricas de carne (18,8-50,5% das amostras recolhidas) em comparação com a maioria das fábricas de laticínios (0,5–7,2% do total de amostras) (Chiarini et al., 2009; Kovacevic et al., 2012; Martin et al., 2011; Prencipe et al., 2012). A explicação pode residir na alta possibilidade de contaminação cruzada de *L. monocytogenes* das carcaças de carne para as salas de corte e embalagem, devido ao *design* não-higiénico de equipamentos de sangramento, corte e evisceração (Chiarini et al., 2009, Martin et al., 2011).

Conclui-se que, apesar dos elevados valores de prevalência obtidos nos estudos recolhidos da literatura, muito diferentes dos valores obtidos no presente estágio (de 0% de prevalência para amostragens de *Salmonella* spp. e 0% para *L. monocytogenes*), a maioria dos estudos tem em comum estar associados a fábricas de processamento dos principais alimentos com maior presença destes dois patogénicos: a indústria da carne e de produtos lácteos. Não foram encontrados estudos para fábricas de processamento de alimentos prontos-a-comer semelhantes aos produtos de pastelaria de conservação da empresa em que foi realizado o estágio, ou seja, alimentos com baixa a_w e sujeitos a altas temperaturas de forno. Sublinha-se novamente que estas características dos produtos da empresa são limitantes para a sobrevivência e crescimento de bactérias, e por isso são o principal motivo para uma baixa prevalência destes dois patogénicos nas superfícies da empresa.

É possível afirmar que os procedimentos de higienização de equipamentos e utensílios que estavam implementados na empresa antes do estágio, assim como o novo procedimento de higienização para o equipamento “Depositador de açúcar”, adotado e validado durante o período de estágio, são eficazes e estão bem implementados, assim como o nível de contaminação destas superfícies é baixo. Deste modo, está assegurada a correta implementação do pré-requisito “higiene das instalações, equipamentos e utensílios”, um dos pré-requisitos mais relevantes e que serve como base para o funcionamento do Sistema HACCP/Plano de Segurança Alimentar da Dan Cake. De acordo com a literatura, os pontos críticos de controlo do Sistema HACCP ficam mais perceptíveis, e por isso mais facilmente podem ser controlados (WHO, 2011).

4.2. Monitorização da higiene pessoal dos colaboradores

As tabelas seguintes apresentam os resultados obtidos ao longo do estágio, entre dezembro de 2019 e maio de 2020, referentes às análises microbiológicas realizadas às mãos e fardas dos colaboradores, para verificação da eficácia dos métodos utilizados na sua higienização.

Na verificação da higienização de mãos, a recolha de amostras com zaragatoa foi feita depois da lavagem e/ou desinfeção das mãos, de modo a perceber a eficácia destes procedimentos na higienização das mãos dos colaboradores.

Tabela 21 - Resultados analíticos obtidos na verificação da eficácia de higienização das mãos de colaboradores da empresa.

Local	Nome da amostra	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)			Procedimento de higienização
			Microrganismos a 30°C	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	
Zona de Pesagens	Mãos Pesagens	15/04/2020	1	<1	<1	Lavagem e desinfeção antes da colheita
Zona de Massas	Mãos Massas 1	05/12/2019	1,1x10 ¹	<1	<1	Lavagem antes da colheita
	Mãos Massas 2	15/04/2020	3	<1	<1	Lavagem e desinfeção antes da colheita
	Mãos Massas 3	21/04/2020	<1	<1	<1	Lavagem e desinfeção antes da colheita
Zona de Recheios	Mãos Recheios	26/03/2020	1	<1	<1	Lavagem antes da colheita
Técnicos de Manutenção	Mãos Manutenção	15/04/2020	1	<1	<1	Lavagem e desinfeção antes da colheita
Técnicos de Qualidade/ I&D*	Mãos Q/I&D	15/04/2020	1	<1	<1	Lavagem e desinfeção antes da colheita

*I&D – Investigação e Desenvolvimento

Tabela 21 - Resultados analíticos obtidos na verificação da eficácia de higienização das mãos de colaboradores da empresa (2ª parte).

Local	Nome da amostra	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)			Procedimento de higienização
			Microrganismos a 30°C	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	
Zona de Arrefecimento/Embalagem	Mãos Embalagem 1	10/03/2020	<1	<1	<1	Desinfecção antes da colheita
	Mãos Embalagem 2	10/03/2020	<1	<1	<1	Desinfecção antes da colheita
	Mãos Embalagem 3	05/12/2019	2	<1	<1	Desinfecção antes da colheita
	Mãos Embalagem 4	05/12/2019	1	<1	<1	Desinfecção antes da colheita
	Mãos Embalagem 5	05/12/2019	<1	<1	<1	Desinfecção antes da colheita
	Mãos Embalagem 6	15/04/2020	<1	<1	<1	Lavagem e desinfecção antes da colheita
	Mãos Embalagem 7	15/04/2020	9	<1	<1	Lavagem e desinfecção antes da colheita

Como é possível comprovar na Tabela 21, verifica-se que os resultados das análises a mãos foram bastante satisfatórios, uma vez que não se obtiveram resultados acima dos critérios de aceitação para nenhum dos parâmetros microbiológicos analisados: “Microrganismos a 30°C” (com limite de aceitação de $1,0 \times 10^3$ UFC/ml); “*E. coli*” (<1 UFC/ml) e “*Staphylococcus coagulase positiva*” ($\leq 1,0 \times 10^1$ UFC/ml). Estes resultados refletem o cumprimento das Boas Práticas de Higiene Pessoal implementadas e divulgadas na empresa. Os resultados comprovam que os procedimentos de higienização das mãos são eficazes e o nível de eficácia é semelhante entre as três combinações de higienização possíveis: apenas lavagem das mãos com sabão antibacteriano; apenas utilização de desinfetante de base alcoólica; e lavagem das mãos seguida de utilização de desinfetante. Caso fossem obtidos resultados acima dos critérios de aceitação para, pelo menos, um parâmetro nas amostras analisadas, o procedimento a tomar seria a repetição da amostragem por zaragatoa ao

colaborador e a realização de nova análise microbiológica, de modo a verificar a tendência de resultados.

Estudos demonstram que o uso exclusivo de desinfetantes pode ser tão eficaz como lavar as mãos em algumas circunstâncias, mas o seu uso não é apropriado quando as mãos estão visivelmente sujas, visto que a sujidade diminui a eficácia do desinfetante (Simonne, 2005). Os produtos utilizados para a lavagem das mãos, devido às suas propriedades detergentes, têm a capacidade de remover sujidade e várias substâncias orgânicas das mãos e, no caso particular de sabão antibacteriano, este contém agentes antissépticos com uma elevada capacidade de reduzir a flora microbiana da pele (Boyce & Pittet, 2002). Deste modo, o método preferencial para a higienização das mãos na empresa será a lavagem com sabonete líquido bactericida, e de seguida, como complemento, pode ser utilizado desinfetante. Os resultados demonstram que é suficiente a lavagem das mãos, pelo que a utilização posterior de desinfetante pode continuar a ser opcional e não obrigatória. Na empresa é utilizado um sabonete bactericida e, como desinfetante, é utilizada uma solução antisséptica de 70% de álcool (propan-1-ol e álcool isopropílico).

As análises feitas às mãos resultaram em valores de “Microorganismos a 30°C” muito baixos, situados entre as <1 UFC/ml e as $1,1 \times 10^1$ UFC/ml. As principais causas para eficácia do procedimento de higienização poderão ser a eficácia dos produtos usados, a sua correta aplicação por toda a superfície das mãos, o cumprimento do tempo mínimo necessário para a atuação dos produtos e a correta secagem com as toalhas de papel descartável. A obtenção de valores altos de contaminação por bactérias mesófilas aeróbias seria um indicador do potencial dos manipuladores como transmissores de microrganismos patogénicos, visto que a maioria destes organismos tem capacidade de crescimento nessa faixa de temperatura (Frasier & Whesthoff, 1993). Na eventualidade de serem obtidos valores acima dos limites de aceitação em amostras a mãos de colaboradores pertencentes à zona de massas, ou a qualquer outro colaborador que entre em contacto com as matérias-primas e alimentos numa etapa do processamento anterior à cozedura no forno, não seria um risco para a segurança alimentar do consumidor, uma vez que o tratamento térmico aplicado pelo forno reduz o risco biológico dos produtos. Se fossem obtidos valores acima do limite de aceitação, em manipuladores da zona de arrefecimento/embalagem ou qualquer outro colaborador que entre em contacto direto com o produto entre a saída deste do forno e a sua embalagem, poderia ser introduzida uma contaminação microbiológica no produto que não seria eliminada até ao seu consumo. Contudo, a transmissão ao consumidor de doenças de origem alimentar encontra-se prevenida devido ao facto de os produtos Dan Cake terem características e composição que impedem o crescimento da maioria dos microrganismos patogénicos, com a_w muito baixas e ingredientes antimicrobianos. Para além disso, é assegurada a análise microbiológica dos produtos acabados.

Castro (2008) obteve valores convergentes com os valores obtidos no estágio num estudo da eficácia de procedimentos de higienização em manipuladores de alimentos numa fábrica de processamento de carnes, obtendo contagens de microrganismos mesófilos aeróbios entre 1,8 UFC/ml e $2,4 \times 10^1$ UFC/ml, após higienização das mãos com sabonete bactericida à base de gluconato de clorexidina. Já Litz et al. (2007), após os manipuladores procederem à

higienização das mãos com o mesmo tipo de sabão, atingiu valores superiores de mesófilos aeróbios, com variação entre $<1,0$ UFC/ml e $1,7 \times 10^3$ UFC/ml. Para o mesmo autor, valores ainda superiores de mesófilos aeróbios foram obtidos após lavagem das mãos com sabonete triclosan (entre $5,2 \times 10^1$ UFC/ml e $6,2 \times 10^3$ UFC/ml), e após lavagem com sabão iodóforo (entre $1,8 \times 10^1$ UFC/ml e $3,25 \times 10^3$ UFC/ml). Este autor considera como níveis seguros contagens inferiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/ml de microrganismos aeróbios a 30°C , valor igual ao critério de aceitação adotado na empresa. Contudo, é importante realçar que a empresa tem este critério definido para resultados de amostragens com zaragatoa das duas mãos dos colaboradores, enquanto todos os estudos citados fizeram a recolha de amostras apenas a uma das mãos, ou seja, a superfície das mãos amostrada nestes estudos é metade da superfície estudada no presente trabalho.

O autor Pereira (2011) testou dois métodos de higienização: lavagem de mãos com sabão antibacteriano triclosano (A) e lavagem de mãos com o mesmo sabão seguida de desinfecção com antisséptico de base alcoólica (B). Para o método A, obteve valores de mesófilos aeróbios entre $2,0 \times 10^1$ UFC/ml e $9,3 \times 10^4$ UFC/ml. No caso do método B, como seria esperado, o intervalo de valores foi menor, entre $1,0 \times 10^1$ UFC/ml e $3,8 \times 10^3$ UFC/ml. Neste estudo foi possível perceber a melhoria na qualidade microbiológica das mãos de manipuladores ao utilizar desinfetante após lavagem de mãos. No entanto, para os dois métodos atingiu-se valores máximos muito superiores ao máximo obtido ao longo do estágio ($1,1 \times 10^1$ UFC/ml). Como referido anteriormente, os resultados obtidos ao longo deste período mostram que as mãos dos colaboradores já apresentam valores de mesófilos aeróbios muito baixos após lavagem com sabão bactericida.

No que diz respeito ao parâmetro “*E. coli*”, o parâmetro representante da flora transitória das mãos, todas as zaragatoas de mãos que foram objeto de análise microbiológica revelaram valores dentro dos critérios de aceitação, tendo sido inferiores a 1 UFC/ml. Resultados idênticos foram obtidos por Pereira (2011) e Inácio (2015), numa indústria de panificação e pastelaria, e por Carvalho (2017). Os três autores não detetaram *E. coli* em análises microbiológicas para avaliação da eficácia da higienização de manipuladores de alimentos. Já Lambrechts et al. (2014) detetou *E. coli* em 1 de 240 amostras de manipuladores da indústria alimentar.

As bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva representam as bactérias *S. aureus* e *S. intermedius*. Todas as outras espécies do género *Staphylococcus* são coagulase negativa (Foster, 1996). Não foram obtidas contagens deste microrganismo patogénico, representante da flora residente das mãos, nas zaragatoas feitas a mãos de colaboradores. Estes resultados são concordantes com os resultados obtidos por Carvalho (2019) e Lambrechts et al. (2014), uma vez que também não detetaram *Staphylococcus aureus* nas mãos de manipuladores após higienização. No entanto, Pereira (2011) obteve valores entre 1 UFC/ml e $2,2 \times 10^1$ UFC/ml após higienização com sabão antibacteriano seguida de desinfecção, e não detetou a mesma bactéria em nenhuma amostra quando foi apenas usado o sabão antibacteriano. A explicação para o sucedido poderá estar relacionada com o facto de a fricção das mãos com desinfetante

de base alcoólica fazer com estas bactérias residentes venham à superfície em manipuladores portadores ou que apresentem danos na pele (Pereira, 2011).

Concluiu-se que os resultados obtidos refletem a eficácia dos produtos existentes na empresa para a higienização das mãos, assim como os procedimentos implementados na criação de condições de higiene nas mãos dos colaboradores que poderão entrar em contacto com os alimentos. Também as ações de sensibilização e de divulgação das regras de conduta e Boas Práticas de Higiene Pessoal levadas a cabo pela empresa, particularmente, a afixação de ajudas visuais com instruções sobre “quando” e “como” lavar as mãos, tiveram um papel fundamental na obtenção de resultados conformes. É importante realçar que uma possível explicação para as baixas contagens de microrganismos na maioria dos resultados obtidos a partir do mês de março, poderá dever-se a uma maior consciencialização dos colaboradores quanto à eficácia das Boas Práticas de higiene pessoal na prevenção da contaminação por SARS-CoV-2. O agravamento da situação pandémica da doença COVID-19 poderá ter servido como mote para os colaboradores aumentarem a frequência e qualidade da lavagem e desinfeção das mãos, mantendo níveis de microrganismos muito baixos.

Por fim, a Tabela 22 apresenta os resultados obtidos no presente estágio para as análises microbiológicas às fardas de trabalho de vários colaboradores da fábrica, de modo a verificar não só a eficácia do procedimento de lavagem, como o estado higiénico em que são mantidas as fardas durante o período de trabalho.

Tabela 22 - Resultados analíticos obtidos na verificação da eficácia de higienização das fardas de colaboradores da empresa.

Local	Código	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)			Observações
			Microrganismos a 30°C	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	
Zona de Massas	Farda Massas 1	05/12/2019	1,5x10 ¹	<1	<1	1º dia de utilização
	Farda Massas 2	15/04/2020	3,4x10 ¹	<1	<1	1º dia de utilização
	Farda Massas 3	21/04/2020	6	<1	<1	2º dia de utilização
Técnicos de Manutenção	Farda Manutenção	15/04/2020	4	<1	<1	1º dia de utilização
Técnicos de Qualidade/I&D	Farda Q/I&D	15/04/2020	<1	<1	<1	1º dia de utilização

Tabela 22 - Resultados analíticos obtidos na verificação da eficácia de higienização das fardas de colaboradores da empresa (2ª parte).

Local	Código	Data de recolha	Resultados (UFC/ml)			Observações
			Microrganismos a 30°C	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	
Zona de Arrefecimento/ Embalagem	Farda Embalagem 1	05/12/2019	7	<1	<1	1º dia de utilização
	Farda Embalagem 2	05/12/2019	3	<1	<1	3º dia de utilização
	Farda Embalagem 3	05/12/2019	1	<1	<1	1º dia de utilização
	Farda Embalagem 4	10/03/2020	1	<1	<1	2º dia de utilização
	Farda Embalagem 5	10/03/2020	5	<1	<1	1º dia de utilização
	Farda Embalagem 6	15/04/2020	<1	<1	<1	1º dia de utilização
	Farda Embalagem 7	15/04/2020	<1	<1	<1	1º dia de utilização
Zona de Pesagens	Farda Pesagens	15/04/2020	2	<1	<1	1º dia de utilização
Zona de Recheios	Farda Recheios	26/03/2020	2	<1	<1	1º dia de utilização

A Tabela 22 revela que os resultados obtidos na verificação do estado higiénico das fardas dos colaboradores são bastante satisfatórios, tendo sido conseguidos resultados abaixo dos critérios de aceitação estabelecidos na empresa para os três parâmetros microbiológicos no total das 14 amostras: “Microrganismos a 30°C” (com limite de aceitação de $1,0 \times 10^3$ UFC/ml); “*E. coli*” (<1 UFC/ml) e “*Staphylococcus coagulase positiva*” ($\leq 1,0 \times 10^1$ UFC/ml). Os valores obtidos para o parâmetro “Microrganismos a 30°C” são muito reduzidos, situando-se entre as <1 UFC/ml e as $3,4 \times 10^1$ UFC/ml. Valores semelhantes de mesófilos aeróbios foram obtidos por Alves et al. (2016), num estudo de avaliação microbiológica da superfície de fardas após higienização, utilizadas num matadouro, com resultados que oscilaram entre 0 UFC/ml e 8 UFC/ml, num total de 25 fardas analisadas. Para este autor,

apenas 1 amostra (4%) apresentou contagens de mesófilos. Mafra et al. (2010) estudou o nível de contaminação de fardas utilizadas por colaboradores em fábricas de abate e processamento de carne, antes e após o procedimento de higienização em lavandarias na própria fábrica, através de amostragem da superfície de fardas por zaragatoa. Os valores de mesófilos obtidos por este autor, antes da higienização das fardas, variaram entre $1,54 \times 10^2$ UFC/ml e $1,82 \times 10^4$ UFC/ml. Após a higienização das fardas, os valores de mesófilos aeróbios oscilaram entre 8 UFC/ml e $4,2 \times 10^1$ UFC/ml, resultados que são convergentes com o nível de contaminação microbiológico das fardas analisadas no presente estágio.

Para o parâmetro “*E. coli*”, parâmetro indicador de contaminação fecal e da possível presença de patogênicos entéricos, todas as zaragatoas de fardas que foram objeto de análise microbiológica revelaram valores dentro dos critérios de aceitação, tendo sido inferiores a 1 UFC/ml. Valores semelhantes foram obtidos no estudo referido anteriormente de Mafra et al. (2010), em fardas de colaboradores de fábricas de abate e processamento de carne, não tendo sido detetada *E. coli* nas fardas analisadas após o processo de lavagem. No entanto, este autor detetou níveis de contaminação de *E. coli* entre 4 UFC/ml e $8,75 \times 10^2$ UFC/ml em fardas antes da higienização. Os valores elevados obtidos por este autor nas análises a fardas antes da sua lavagem é uma referência do estado higiênico que as fardas de trabalho podem atingir durante o processamento de alimentos na indústria alimentar. No entanto, os valores elevados obtidos podem estar relacionados com o facto de a indústria de processamento de carne, por características já referidas anteriormente: o animal vivo transporta microrganismos no trato intestinal que podem, durante o abate, contaminar o ambiente de processamento, para além de que a carne tem uma composição rica em nutrientes, que oferece um ambiente favorável ao crescimento de microrganismos (Barros et al., 2007; Borch & Arinder, 2002; Forsythe, 2011).

Resultados idênticos aos do presente estágio foram também obtidos por Carvalho (2017), que não detetou, *E. coli* em nenhuma das amostras de superfícies de fardas de colaboradores analisadas.

Por fim, para o parâmetro *Staphylococcus* coagulase positiva, em todas as amostras de fardas analisadas não foi detetada esta bactéria patogénica, pelo que todos os resultados se encontram dentro do limite de aceitação ($1,0 \times 10^1$ UFC/ml). Os mesmos resultados foram também obtidos por Carvalho (2017), não tendo sido detetada *S. aureus* nas 18 amostras de superfícies de fardas de colaboradores analisadas. No estudo referido anteriormente de Mafra et al. (2010), a contaminação por *S. aureus* quantificada nas fardas de colaboradores após o processo de lavagem variou entre 0 UFC/ml e $8,33 \times 10^1$ UFC/ml. No entanto, este autor detetou níveis de contaminação de *S. aureus* entre $6,7 \times 10^1$ UFC/ml e $1,79 \times 10^3$ UFC/ml em fardas antes da higienização.

Uma vez que as fardas são lavadas pelos próprios colaboradores, não é possível garantir que as regras de lavagem de fardas sejam respeitadas. Contudo, os resultados comprovam a eficácia do procedimento de lavagem adotado, pelo que até ao momento não é necessária

uma lavanderia nas instalações fabris ou a contratação de empresas externas para esse propósito. Fica também comprovado que os colaboradores mantêm a farda em bom estado de conservação e condições de higiene, inclusive ao segundo e terceiro dia após lavagem. Estes resultados, juntamente com os resultados satisfatórios obtidos na avaliação da eficácia dos procedimentos de higienização das mãos dos colaboradores da empresa, permitem afirmar que o pré-requisito “higiene pessoal” está corretamente implementado, sendo um dos pré-requisitos mais relevantes e que serve como base para o funcionamento do Sistema HACCP/Plano de Segurança Alimentar da Dan Cake. O cumprimento e a correta implementação deste pré-requisito servem de sustento à implementação e funcionamento de um sistema HACCP (Baptista, 2003).

5. Atividades realizadas no âmbito da prevenção da transmissão do SARS-CoV-2 na empresa

No decorrer do presente estágio, a evolução da pandemia da doença COVID-19, o aumento exponencial do número de infectados por todo o mundo e a crescente preocupação da população em adotar medidas de prevenção da transmissão do vírus SARS-CoV-2, levou a empresa a direcionar e multiplicar os seus esforços na elaboração de um Plano de Contingência com medidas a adotar na empresa, de modo a garantir a continuidade da cadeia de produção de alimentos salvaguardando a saúde dos colaboradores, que são fundamentais e indispensáveis para a empresa.

Deste modo, surgiu a oportunidade de realizar algumas atividades, paralelamente ao tema de estágio, com o objetivo de auxiliar a empresa na gestão da transmissão do novo coronavírus nas instalações fabris. Uma vez que o tema de estágio se foca em atividades no âmbito das Boas Práticas de Higiene e de pré-requisitos do Sistema de Segurança Alimentar da empresa, e visto que as atividades realizadas no âmbito da pandemia podem ser encaradas como um reforço das Boas Práticas de Higiene, com foco na higiene pessoal e de superfícies, considerou-se pertinente incluir na presente dissertação um resumo do que foi feito no estágio para esse efeito, assim como uma breve monografia sobre o tema, presente no ponto 2.5 da presente dissertação.


Uma das tarefas solicitadas foi a elaboração de um cartaz (ajuda visual) com recomendações aos colaboradores quanto à higienização das mãos. A ajuda visual elaborada encontra-se exemplificada na Figura 9:

DAN CAKE


ATENÇÃO: CORONAVÍRUS

Para prevenção e controlo da transmissão do Coronavírus (COVID-19), deve lavar as mãos com água e sabão durante peelo menos 20 segundos. Posteriormente, utilize desinfetante para as mãos. Faça-o com mais frequência do que faria num caso normal. Para isso, existe, por toda a fábrica:


1. Lavatórios para lavagem das mãos




2. Dispensadores de desinfetante




Cumpra o seguinte procedimento:




1- Esfregue as palmas das mãos uma na outra.




2- Palma direita sobre o dorso esquerdo com os dedos entrelaçados e vice-versa.




3- Palma com palma com os dedos entrelaçados.



4- Parte de trás dos dedos nas palmas opostas com os dedos



5- Esfregue o polegar esquerdo em sentido rotativo, entrelaçado na palma direita e vice-versa.



6- Esfregue rotativamente para trás e para a frente os dedos da mão direita na palma da mão esquerda e vice-versa.

Figura 9 - Ajuda visual elaborada no âmbito da prevenção da transmissão do vírus SARS-CoV-2, para reforçar as medidas higienização das mãos dos colaboradores.

Esta ajuda visual foi elaborada com base em informações recolhidas na literatura e o procedimento para higienização das mãos tem por base recomendações da OMS. Depois da elaboração desta ajuda visual, procedeu-se à sua afixação por vários locais da fábrica, nomeadamente junto a todos os lavatórios e dispensadores de desinfetante.

Posteriormente, foi solicitada uma ajuda visual para alertar os colaboradores para apenas se servirem dos bebedouros da fábrica para enchimento de garrafas. Esta ajuda visual encontra-se exemplificada na Figura 10:

DAN CAKE **ATENÇÃO: NOVO CORONAVÍRUS (COVID-19)**

De modo a reduzir a contaminação por **novo coronavírus**, ao servir-se dos bebedouros, **não deve utilizar a torneira mais pequena (1)**. Apenas poderá utilizar a **torneira maior (2) EXCLUSIVAMENTE PARA ENCHIMENTO DE GARRAFAS**.

1 **DESATIVADO:
NÃO UTILIZAR**

2 **UTILIZAR SÓ PARA
ENCHIMENTO DE
GARRAFAS**

Figura 10 - Ajuda visual, elaborada no âmbito da prevenção da transmissão do vírus SARS-CoV-2, para recomendação da utilização dos bebedouros exclusivamente para enchimento de garrafas com água.

Posteriormente, outra das tarefas solicitadas foi a sugestão de novas medidas quanto à lavagem das fardas por parte dos colaboradores, para atualização do regulamento interno. No seguimento de uma pesquisa bibliográfica, sugeriu-se a adição das seguintes medidas às já implementadas: “As fardas devem ser lavadas, se possível, diariamente. Recomenda-se o uso de máquina de lavar roupa, com detergente para lavagem de roupa e água a uma temperatura de 90°C durante, pelo menos, 30 minutos. Caso esta temperatura não seja possível, deve usar-se a configuração com a água o mais quente possível. No final, deve ser feita a secagem total das fardas, preferencialmente com recurso a luz solar.”

6. Outras atividades desenvolvidas no estágio

Durante o estágio realizado na empresa Dan Cake, surgiu a possibilidade de realizar algumas tarefas não relacionadas diretamente com o tema de estágio, mas que contribuíram para o auxílio de outros colaboradores da empresa.

No contexto da Segurança Alimentar, e paralelamente às colheitas de amostras descritas anteriormente no âmbito do tema de estágio, acompanhou-se a realização de colheitas de amostras de água e ar em vários pontos da fábrica, para posterior análise microbiológica. De seguida, foi feita a atualização do histórico de resultados da empresa, adicionando os resultados obtidos das análises microbiológicas referidas.

No início de cada mês, fez-se o levantamento das tarefas de higiene, afetas à equipa de produção, que estavam em falta do mês anterior, com o objetivo de estas serem regularizadas assim que possível.

Fez-se também o acompanhamento de inspeções visuais às linhas de produção e outros locais, no âmbito do programa de pré-requisitos. Estas inspeções consistiam em verificar nos vários locais da fábrica o cumprimento uma *checklist* de Boas Práticas de Higiene e de Fabrico. Adicionalmente, elaboraram-se ajudas visuais, para colocação por toda a fábrica, a incentivar o cumprimento das Boas Práticas pelos colaboradores. A Figura 11 apresenta uma ajuda visual elaborada durante o estágio para elucidação dos colaboradores de “quando” devem higienizar as mãos:



Figura 11 - Ajuda visual, elaborada no âmbito do pré-requisito higiene pessoal, com indicação das situações em que deve ser feita a higienização das mãos.

De seguida, a Figura 12 apresenta outra ajuda visual elaborada no âmbito das boas práticas de higiene pessoal, com indicações de “como” lavar as mãos:



Figura 12 - Ajuda visual, elaborada no âmbito do pré-requisito higiene pessoal, com indicação do procedimento adequado para a lavagem eficaz das mãos.

Ainda no âmbito dos pré-requisitos do Sistema de Segurança Alimentar, mais concretamente do pré-requisito “gestão de vidros, plásticos e acrílicos”, procedeu-se à atualização de cadastros de objetos presentes na fábrica que tenham na sua composição vidro, acrílico, plástico rígido ou metal. Estes materiais podem cair/quebrar e, conseqüentemente, contaminar os produtos. Assim, a correta identificação, localização e quantificação de todos os objetos com estas características presentes nas áreas de produção é fundamental para garantir a segurança dos produtos fabricados.

Quanto ao pré-requisito “Controlo de Pragas”, fez-se o acompanhamento de visitas da empresa externa responsável pelo serviço de prevenção, deteção e controlo de pragas no interior e exterior das instalações.

No âmbito de Investigação & Desenvolvimento, foram elaboradas etiquetas para os produtos da empresa através de um programa informático próprio para o efeito, e surgiu a oportunidade em participar na validação do *design* das artes finais de embalagens.

As tarefas descritas contribuíram positivamente para a realização do estágio, uma vez que permitiram a integração em várias áreas da empresa e, conseqüentemente, levaram à interação com todos os colaboradores afetos a cada área.

7. Conclusão

O presente trabalho teve como objetivo a verificação e monitorização da eficácia da implementação dos pré-requisitos “higiene de instalações, equipamentos e utensílios” e “higiene pessoal”. Para tal, fizeram-se amostragens, por zaragatoa, de superfícies de equipamentos, utensílios, mãos e fardas de colaboradores, para posteriores análises microbiológicas para determinação da carga microbiana contida nestas superfícies.

Relativamente ao pré-requisito “higiene de instalações, equipamentos e utensílios”, os resultados das análises microbiológicas às superfícies em contacto com alimentos foram bastante satisfatórios, uma vez que a maioria dos resultados obtidos não excederam pelo menos um dos critérios de aceitação estabelecidos na empresa para parâmetros microbiológicos, demonstrando a eficácia dos procedimentos de higienização de equipamentos e utensílios. Das sete amostras com resultados acima dos critérios de aceitação para pelo menos um parâmetro, foi possível repetir a amostragem e análise a cinco amostras, tendo sido obtidos resultados dentro dos limites de aceitação. Para as restantes duas amostras, não foi possível obter os resultados da repetição da análise dentro do período de estágio. Contudo, prevê-se que tenham sido alvo de contaminações pontuais, e que o seu plano de higienização seja adequado, visto que há uma tendência de resultados conformes para estes utensílios, de acordo com o histórico da empresa. Em todas estas amostras, é importante realçar que não foi detetada *E. coli*, um microrganismo associado a higiene deficiente e contaminação fecal. Nas análises microbiológicas a superfícies sem contacto com produto, não foram detetadas as bactérias patogénicas *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em nenhum local da fábrica, o que revela que a empresa estará aparentemente controlada no que toca a contaminação por estes patogénicos envolvidos em doenças de origem alimentar.

Em relação ao pré-requisito “higiene pessoal”, todos os resultados obtidos nas análises realizadas às mãos dos colaboradores foram conformes, com baixa contaminação por microrganismos mesófilos aeróbios e ausência total de microrganismos representantes da flora microbiana residente (*S. aureus*) e transitória (*E. coli*) da pele, independentemente do método de higienização utilizado. Deste modo, verifica-se que o método de lavagem e desinfecção de mãos utilizado na fábrica é eficaz, e a utilização do sabão antibacteriano é suficiente para reduzir o risco de contaminação dos produtos por parte dos colaboradores. Quanto às fardas dos colaboradores, verifica-se que o procedimento implementado para a sua lavagem por parte dos mesmos é eficaz, e esta é mantida em condições adequadas de higiene, tendo sido obtidos resultados dentro dos critérios de aceitação para todas as amostras, em todos os parâmetros microbiológicos analisados.

Deste modo, é possível concluir que as Boas Práticas de higiene pessoal, de instalações, equipamentos e utensílios estão corretamente implementadas e divulgadas na empresa. Apesar dos resultados obtidos acima dos critérios de aceitação, estes não apresentam um risco para a segurança alimentar, visto que correspondem a amostragens em locais da fábrica antes da etapa de tratamento térmico do forno, que constitui uma forma de controlo de perigos biológicos. Além disso, os produtos produzidos pela Dan Cake têm baixa a_w e humidade, o que os torna microbiologicamente estáveis na eventualidade de serem alvo de

contaminação. O cumprimento e a correta implementação destes pré-requisitos, ao controlar os perigos associados a áreas da empresa (serviços, pessoal, instalações e equipamentos), servem de sustento à implementação e funcionamento do sistema HACCP/Plano de Segurança Alimentar da Dan Cake, sendo necessária a implementação dos PPR antes da aplicação dos procedimentos baseados no HACCP.

Durante o período de estágio, o despoletar da situação de pandémica de COVID-19 levou a empresa a dirigir o seu foco na prevenção da transmissão do novo coronavírus, através da implementação de um plano de contingência e de medidas com ênfase na segurança dos colaboradores e na segurança alimentar. Deste modo, uma parte significativa do tempo de estágio focou-se na realização de algumas atividades neste âmbito.

No cômputo geral, considera-se que os objetivos pretendidos para o estágio foram alcançados, uma vez que este permitiu consolidar e pôr em prática o conhecimento científico obtido, e compreender o funcionamento de um sistema de Segurança Alimentar baseado na metodologia HACCP, assim como de um Programa de pré-requisitos, no caso prático real de uma empresa da indústria alimentar. Para além disso, o estágio proporcionou ainda a oportunidade de integração nos trabalhos de uma empresa. Por outro lado, espera-se ter contribuído de forma positiva para o funcionamento da empresa, e que o estágio tenha sido útil a todos os colaboradores.

8. Referências Bibliográficas

- Abt, E., Rodricks, J. V., Levy, J. I., Zeise, L., & Burke, T. A. (2010). Science and decisions: Advancing risk assessment. *Risk Analysis: An Official Publication of the Society for Risk Analysis*, 30(7), 1028–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2010.01426.x>
- Adams, M.R., & Moss, M.O. (2000). *Food Microbiology*. 2nd edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Alfhili, M., & Lee, M.-H. (2019). Triclosan: An Update on Biochemical and Molecular Mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–28. <https://doi.org/10.1155/2019/1607304>
- Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., Hogg, T., & Teixeira, P. (2013). Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.006>
- Alves, G. M. C., Silva, D. A., Castro, E. R., & Belo, M. A. A. (2016). Eficiência do programa de higienização de uniformes em frigorífico. *Higiene Alimentar*, 30(262), 85-88.
- Araújo, M. (1997). *Segurança Alimentar – Os perigos para a saúde através dos alimentos*. Lisboa: Meribérica/Liber.
- Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2006). The Epidemiologic and Clinical Importance of Norovirus Infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 35(2), 275–290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gtc.2006.03.001>
- Ayçiçek, H., Aydoğan, H., Küçükaraaslan, A., Baysallar, M., & Başustaoğlu, A. C. (2004). Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control*, 15(4), 253–259. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00064-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00064-1)
- Ayçiçek, H., Cakiroglu, S., & Stevenson, T. (2005). Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16, 531–534. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.04.005>
- Ayukekbong, J., Lindh, M., Nenonen, N., Tah, F., Nkuo-Akenji, T., & Bergström, T. (2011). Enteric viruses in healthy children in Cameroon: Viral load and genotyping of norovirus strains. *Journal of Medical Virology*, 83(12), 2135–2142. <https://doi.org/10.1002/jmv.22243>
- Bae, J., & Schwab, K. J. (2008). Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 477–484. <https://doi.org/10.1128/AEM.02095-06>
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C., & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 239–250. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00067-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00067-9)
- Baptista, P., & Antunes, C. (2005). *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração – Volume II – Avançado*. Guimarães: Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, S.A.
- Baptista, P., & Linhares, M. (2005). *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração - Volume I - Iniciação*. Guimarães: Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, S.A.

- Baptista, P., & Venâncio, A. (2003). *Os Perigos para a Segurança Alimentar no processamento de Alimentos*. Guimarães: Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, S.A.
- Baptista, P., (2003). *Higienização de Equipamentos e Instalações na Indústria AgroAlimentar*. Guimarães: Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, S.A.
- Baptista, P., Pinheiro, G., & Alves, P. (2003). *Sistemas de gestão de segurança alimentar*. Guimarães: Forvisão – Consultoria em Formação Integrada, S.A.
- Barros, M. A., Nero, L. A., Monteiro, A. A., & Beloti, V. (2007). Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. *Food Science and Technology*, 27(4), 856-862. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400028>
- Bartram, J., & Balance, R. (1996). *Water Quality Monitoring: A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes*. London: Chapman & Hall.
- Beno, S. M., Stasiewicz, M. J., Andrus, A. D., Ralyea, R. D., Kent, D. J., Martin, N. H., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2016). Development and Validation of Pathogen Environmental Monitoring Programs for Small Cheese Processing Facilities. *Journal of Food Protection*, 79(12), 2095–2106. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-241>
- Bokulich, N. A., & Mills, D. A. (2013). Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5214-5223. <https://doi.org/10.1128/AEM.00934-13>
- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W., & Mills, D. A. (2012). Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PloS One*, 7(4), e35507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035507>
- Borch, E., & Arinder, P. (2002). Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Science*, 62(3), 381–390. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00125-0](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00125-0)
- Boyce, J., & Pittet, D. (2002). Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 23(S12), S3-S40. <https://doi.org/10.1086/503164>
- CAC. (2003) CAC/RCP 1-1969, Código de Práticas Internacionais Recomendadas. Princípios Gerais de Higiene Alimentar.
- CAC. (2006) *Codex Alimentarius Commission Procedural Manual*. 16th edition. Joint FAO/WHO Food Standards Programme.
- Calasso, M., Ercolini, D., Mancini, L., Stellato, G., Minervini, F., Cagno, R.D., Angelis, M.G., & Gobbetti, M. (2016). Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food Microbiology*, 54, 115-126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.008>
- Campos, A. K. C., Cardonha, Â. M. S., Pinheiro, L. B. G., Ferreira, N. R., de Azevedo, P. R. M., & Stamford, T. L. M. (2009). Assessment of personal hygiene and practices of food handlers in municipal public schools of Natal, Brazil, *Food Control*, 20(9), 807–810. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.010>

- Cannon, J. L., Papafragkou, E., Park, G. W., Osborne, J., Jaykus, L. A., & Vinjé, J. (2006). Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: A comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2761–2765. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.11.2761>
- Carvalho, T. P. (2017). *Validação de procedimentos de higienização numa indústria alimentar* (Master's thesis, Instituto Superior Técnico). Retrieved from <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/cursos/mebiol/dissertacao/283828618790017>
- Casanova, L., Rutala, W. A., Weber, D. J., & Sobsey, M. D. (2009). Survival of surrogate coronaviruses in water. *Water Research*, 43(7), 1893–1898. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.02.002>
- Castro, S. A. (2008). *Boas Práticas de Higiene: Um Pilar para a Produção de Alimentos Seguros* (Master's thesis, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária). Retrieved from <http://hdl.handle.net/10400.5/866>
- CE. (2016) Commission Notice on the implementation of food safety management systems covering prerequisite programs (PRPs) and procedures based on the HACCP principles, including the facilitation/flexibility of the implementation in certain food businesses. (2016/C 278/01) *Official Journal of the European Union*.
- Çetin, Ö., Kahraman, T., & Büyükcinal, S. K. (2006). Microbiological evaluation of food contact surfaces at red meat processing plants in Istanbul, Turkey. *Italian Journal of Animal Science*, 5(3), 277–283. <https://doi.org/10.4081/ijas.2006.277>
- Chan, K. H., Peiris, J. S., Lam, S. Y., Poon, L. L., Yuen, K. Y., & Seto, W. H. (2011). The Effects of Temperature and Relative Humidity on the Viability of the SARS Coronavirus. *Advances in Virology*, 2011, 734690. <https://doi.org/10.1155/2011/734690>
- Chaves, R. D., Martinez, R. C. R., Rezende, A. C. B., Rocha, M. D., Oteiza, J. M., & de Souza Sant'Ana, A. (2016). Chapter 8 - Salmonella and Listeria monocytogenes in ready-to-eat leafy vegetables. In P. Kotzekidou (Ed.), *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (pp. 123–149). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00008-X>
- Chiarini, E., Tyler, K., Farber, J. M., Pagotto, F., & Destro, M. T. (2009). Listeria monocytogenes in two different poultry facilities: Manual and automatic evisceration. *Poultry Science*, 88(4), 791–797. <https://doi.org/https://doi.org/10.3382/ps.2008-00396>
- Choi, S. (2013). Design and Implementation of the Prevention System of Molds Growth Using Wireless Sensor Networks. *International Journal of Distributed Sensor Networks*, 9.
- Costantini, V., Morantz, E. K., Browne, H., Ettayebi, K., Zeng, X. L., Atmar, R. L., Estes, M. K., & Vinjé, J. (2018). Human Norovirus Replication in Human Intestinal Enteroids as Model to Evaluate Virus Inactivation. *Emerging Infectious Diseases*, 24(8), 1453–1464. <https://doi.org/10.3201/eid2408.180126>
- Cotton, L. N., & White, C. H. (1992). Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, and Salmonella in Dairy Plant Environments. *Journal of Dairy Science*, 75(1), 51–57. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77737-6](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77737-6)
- Dan Cake. (2019a). Manual HACCP/HARPC/Plano de Segurança Alimentar. Coimbra.
- Dan Cake. (2019b). Manual da Qualidade e Segurança Alimentar. Coimbra.
- Dzienciol, M., Schornsteiner, E., Muhterem-Uyar, M., Stessl, B., Wagner, M., & Schmitz-Esser, S. (2016). Bacterial diversity of floor drain biofilms and drain waters in a Listeria

- monocytogenes contaminated food processing environment. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.004>
- EFSA & ECDC. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14, 4634–4865.
- EFSA & ECDC. (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17(12), 5926-6202. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Eisel, W. G., Linton, R. H., & Muriana, P. M. (1997). A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. *Food Microbiology*, 14(3), 273–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0094>
- Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R., Karandikar, U., Tenge, V. R., Neill, F. H., Blutt, S. E., Zeng, X. L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A. R., Burrin, D., Graham, D. Y., Ramani, S., Atmar, R. L., & Estes, M. K. (2016). Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6306), 1387–1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5211>
- Eyers, L., George, I., Schuler, L., Stenuit, B., Agathos, S., & El Fantroussi, S. (2004). Environmental genomics: exploring the unmined richness of microbes to degrade xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 123-130. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1703-6>
- FAO. (2003). *Trade reforms and food security: Conceptualizing the linkages, commodities and trade division* [PDF]. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-y4671e.pdf>
- FAO. (2020). *Food Safety in the time of COVID-19* [PDF]. Rome, Italy: FAO. Retrieved from <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca8623en/>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150–170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- Fiorentino, F. A. M., Corrêa, M. A., & Salgado, H. R. N. (2013). Development and validation of a microbiological assay for determination of chlorhexidine digluconate in aqueous solution. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2), 351-358. <https://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502013000200017>
- Flaherty, D. K. (2012). Chapter 15 - Immediate Allergic Reactions. In D.K. Flaherty (Ed.), *Immunology for Pharmacy*. pp. 118–126. Saint Louis: Mosby. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06947-2.10015-X>
- Forsythe, S. J. (2011). *The Microbiology of safe food*. New Jersey, USA: John Wiley & Sons.
- Forsythe, S. J., & Hayes, P. R. (1998). *Food Hygiene, Microbiology, and HACCP*. Gaithersburg, USA: Aspen Publishers.
- Foster, T. (1996). Chapter 12 - Staphylococcus. In: S.S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston, Texas, USA: University of Texas Medical Branch at Galveston. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>
- Fox, E., O'Mahony, T., Clancy, M., Dempsey, R., O'Brien, M., & Jordan, K. (2009). *Listeria monocytogenes* in the Irish dairy farm environment. *Journal of Food Protection*, 72(7), 1450–1456. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.7.1450>
- Frasier, W. C., & Whesthoff, D. C. (1993). *Microbiología de los alimentos*. 4th ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia.

- FSS. (2020). *COVID-19 – Guidance for food business operators and their employees* [PDF]. Retrieved from [https://www.foodstandards.gov.scot/downloads/COVID-19 - FSS Guidelines for Food Business Operators and their Employees.pdf](https://www.foodstandards.gov.scot/downloads/COVID-19_-_FSS_Guidelines_for_Food_Business_Operators_and_their_Employees.pdf)
- Fu, L., Valentino, H. R., & Wang, Y. (2016). Chapter 3 - Bacterial Contamination in Food Production. In J. Barros-Velázquez (Ed.), *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 35–43). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00003-6>
- Gabis, D. A., Flowers, R. S., Evanson, D., & Faust, R. E. (1989). A Survey of 18 Dry Dairy Product Processing Plant Environments for Salmonella, Listeria and Yersinia. *Journal of Food Protection*, 52(2), 122–124. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.2.122>
- Galanakis, C. M. (2020). The Food Systems in the Era of the Coronavirus (COVID-19) Pandemic Crisis. *Foods*, 9, 523-533.
- Genigeorgis C. A. (1989). Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International journal of food microbiology*, 9(4), 327–360. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90100-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90100-1)
- Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E., & Holah, J. T. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87(1), 41–48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00790.x>
- Gundy, P. M., Gerba, C. P., & Pepper, I. L. (2009). Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater. *Food and Environmental Virology*, 1(1), 10. <https://doi.org/10.1007/s12560-008-9001-6>
- Hart, J. R. (2011). *Ethylenediaminetetraacetic Acid and Related Chelating Agents*. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Ed.). doi:[10.1002/14356007.a10_095.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.a10_095.pub2)
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., Devleeschauwer, B., & World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. (2015). World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS medicine*, 12(12), e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
- Henriques, B. J. M. (2014). *Relação entre a higienização de manipuladores e superfícies e a contaminação do produto final em pequenas indústrias alimentares* (Master's thesis, Universidade de Aveiro). Retrieved from <http://hdl.handle.net/10773/14200>
- Ho, A. J., Lappi, V. R., & Wiedmann, M. (2007). Longitudinal monitoring of Listeria monocytogenes contamination patterns in a farmstead dairy processing facility. *Journal of Dairy Science*, 90(5), 2517–2524. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-392>
- Hobbs, B. C., & Roberts, D. (1998). *Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos*. São Paulo, Brasil: Livraria Varela.
- Horm, K. M., & D'Souza, D. H. (2011). Survival of human norovirus surrogates in milk, orange, and pomegranate juice, and juice blends at refrigeration (4 °C). *Food Microbiology*, 28(5), 1054–1061. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.012>
- Inácio, C. C. (2015). *Verificação e validação do procedimento de higienização da unidade alimentar CSM Iberia SA: Implementação da ferramenta 5S* (Master's thesis, Universidade do Minho). Retrieved from <http://hdl.handle.net/1822/47522>

- Ismail, R., Aviat, F., Michel, V., Le Bayon, I., Gay-Perret, P., Kutnik, M., & Fédérighi, M. (2013). Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(11), 6169–6183. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116169>
- Joseph, N., Bhat, S., Mahapatra, S., Singh, A., Jain, S., Unissa, A., & Janardhanan, N. (2018). Bacteriological Assessment of Bottled Drinking Water Available at Major Transit Places in Mangalore City of South India. *Journal of Environmental and Public health*, 2018, 7472097. <https://doi.org/10.1155/2018/7472097>
- Kabuki, D. Y., Kuaye, A. Y., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2004). Molecular Subtyping and Tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-Style Fresh-Cheese Processing Plants. *Journal of Dairy Science*, 87(9), 2803–2812. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73408-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73408-6)
- Kampf, G., & Kramer, A. (2004). Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 863–893. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.863-893.2004>
- Keener, L. (2001). *Chemical and physical hazards: The "other" food safety risks*. Food Testing & Analysis. Retrieved from <http://foodsafetyprofessionals.com/keenerhazards.pdf>
- Kim, A. N., Park, S. Y., Bae, S. C., Oh, M. H., & Ha, S. D. (2014). Survival of norovirus surrogate on various food-contact surfaces. *Food and Environmental Virology*, 6(3), 182–188. <https://doi.org/10.1007/s12560-014-9154-4>
- Kim, J.-H., & Yim, D.-G. (2017). Microbial levels for food contact and environmental surfaces in meat processing plants and retail shops. *Food Science and Biotechnology*, 26(1), 299–302. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0040-3>
- Koopmans, M., & Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International journal of food microbiology*, 90(1), 23–41. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00169-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00169-7)
- Kovačević, J., McIntyre, L. F., Henderson, S. B., & Kosatsky, T. (2012). Occurrence and distribution of listeria species in facilities producing ready-to-eat foods in British Columbia, Canada. *Journal of Food Protection*, 75(2), 216–224. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-300>
- Lacasse, D. (1995). *Introdução à Microbiologia Alimentar*. Lisboa: Ciência e Técnica – Instituto Piaget.
- Lambert, R. J., & Johnston, M. D. (2000). Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 907–913. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01060.x>
- Lambrechts, A. A., Human, I. S., Doughari, J. H., & Lues, J. F. R. (2014). Bacterial contamination of the hands of food handlers as indicator of hand washing efficacy in some convenient food industries in South Africa. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 30(4), 755–758.
- Law, S., Leung, A. W., & Xu, C. (2020). Severe acute respiratory syndrome (SARS) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): From causes to preventions in Hong Kong. *International Journal of Infectious Diseases*, 94, 156–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.059>

- Lee, S. J., Si, J., Yun, H. S., & Ko, G. (2015). Effect of temperature and relative humidity on the survival of foodborne viruses during food storage. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(6), 2075–2081. <https://doi.org/10.1128/AEM.04093-14>
- Lee, S. Y., Lee, D. Y., Kim, O. Y., & Hur, S. J. (2019). Analysis for change in microbial contents in five mixed Kimchi starter culture and commercial lactic acid bacterial-fermented sausages and biological hazard in manufacturing facilities. *Food Science and Biotechnology*, 28(3), 787–794. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0510-2>
- Leong, D., Alvarez-Ordóñez, A., & Jordan, K. (2014). Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Frontiers in Microbiology*, 5, 436. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00436>
- Li, D., Zhao, M. Y., & Hsern, M. T. T. (2020). What makes a foodborne virus: comparison between coronaviruses with human noroviruses. *Current Opinion in Food Science*, 42, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.04.011>
- Litz, V. M., Rodrigues, L. B., Santos, L. R., & Pilotto, F. (2007). Anti-sepsia de mãos na indústria de carnes: Avaliação da clorhexidina, triclosan e iodóforo na redução da contaminação microbiana em manipuladores. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35(3), 321-326. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16123>
- Louie, W., & Reuschlein, D. (2005). Cleaning and Disinfection in the Bottled Water Industry. In D. Senior & N. Dege (Eds.), *Technology of Bottled Water* (pp. 223-267). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Ma, D., Wu, T., Zhang, J., Lin, M., Mai, W., Tan, S., ... Cai, X. (2013). Supramolecular Hydrogels Sustained Release Triclosan with Controlled Antibacterial Activity and Limited Cytotoxicity. *Science of Advanced Materials*, 5, 1400–1409. <https://doi.org/10.1166/sam.2013.1602>
- Mafra, S. C. T., Silva, V., Conceição, G., Freitas, J., Mafra, C., & Fontes, M. (2010). Análise microbiológica do ambiente e dos uniformes de trabalhadores de lavanderia de indústria de produtos de origem animal. *Revista Produção Online*, 10(2), 424-449. <https://doi.org/10.14488/1676-1901.v10i2.503>
- Mali, S., Hajare, A., Karade, R., Salunkhe, S., Nadaf, S., Honmane, S., & Bhatia, N. (2014). Expulsion by ionic complexation: Benchmark therapy for atherosclerosis. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 2, 1–5. <https://doi.org/10.30750/ijpbr.2.1.17>
- Marriott N. G., Schilling M. W., & Gravani, R. B. (2018). *Principles of Food Sanitation*. 6th edition. New York: Springer.
- Martin, B., Garriga, M., & Aymerich, T. (2011). Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at small-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 74(5), 812–815. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-437>
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9880479>
- McMeekin, T. A. (2003). *Detecting pathogens in food*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.

- McMurry, L. M., Oethinger, M., & Levy, S. B. (1998). Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*. England. <https://doi.org/10.1038/28970>
- Mettler, E., & Carpentier, B. (1998). Variations over Time of Microbial Load and Physicochemical Properties of Floor Materials after Cleaning in Food Industry Premises. *Journal of Food Protection*, 61(1), 57–65. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.1.57>
- Miettinen, H., Aarnisalo, K., Salo, S., & Sjöberg, A. M. (2001). Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. *Journal of Food Protection*, 64(5), 635–639. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.5.635>
- Millezi, A. F., Tonial, T. M., Zanella, J. P., Moschen, E. E., Ávila, C. A., Kaiser, V. L., Hoffmeister, S. (2007). Avaliação e qualidade microbiológica das mãos de manipuladores e do agente sanificante na indústria de alimentos. *Revista Analytica*, 28, 74-79.
- Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Celano, G., & Gobbetti, M. (2015). House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. *Food Microbiology*, 52, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.009>
- Møretrø, T., & Langsrud, S. (2017). Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022–1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
- Mourya, D. T., Yadav, P. D., Majumdar, T. D., Chauhan, D. S., & Katoch, V. M. (2014). Establishment of Biosafety Level-3 (BSL-3) laboratory: important criteria to consider while designing, constructing, commissioning & operating the facility in Indian setting. *The Indian Journal of Medical Research*, 140(2), 171–183.
- Muhterem-Uyar, M., Dalmasso, M., Bolocan, A. S., Hernandez, M., Kapetanakou, A. E., Kuchta, T., ... Wagner, M. (2015). Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, 51, 94–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.042>
- Notermans, S., Hindle, V., & Kampelmacher, E. H. (1976). Comparison of cotton swab versus alginate swab sampling method in the bacteriological examination of broiler chickens. *The Journal of Hygiene*, 77(2), 205–210. <https://doi.org/10.1017/s0022172400024633>
- Pardo, J. E., de Figueirêdo, V. R., Alvarez-Ortí, M., Zied, D. C., Peñaranda, J. A., Dias, E. S., & Pardo-Giménez, A. (2013). Application of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) to the Cultivation Line of Mushroom and Other Cultivated Edible Fungi. *Indian Journal of Microbiology*, 53(3), 359–369. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0365-4>
- Pereira, P. J. B. A. (2010). *Referenciais de Segurança Alimentar: Estudo comparativo* (Master's thesis, Instituto Superior de Engenharia do Porto). Retrieved from <http://hdl.handle.net/10400.22/2782>
- Pereira, V. L. P. V. (2011). *Avaliação da eficiência da higienização das mãos em manipuladores de alimentos* (Master's thesis, Universidade do Algarve). Retrieved from <http://hdl.handle.net/10400.1/4921>
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., Garcia, R., & Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 131-144. [10.1016/j.tifs.2007.08.003](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.08.003)

- Piras, F., Spanu, C., Mocci, A. M., Demontis, M., Santis, E. P. L. De, & Scarano, C. (2019). Occurrence and traceability of *Salmonella* spp. in five Sardinian fermented sausage facilities. *Italian Journal of Food Safety*, 8(1), 8011. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.8011>
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G., & Elliott, P. H. (2010). Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection*, 73(10), 1919–1936. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.10.1919>
- Potes, M. E. (2007). Segurança alimentar em produtos tradicionais. *Revista de Ciências Agrárias*, 30(1), 439-447. Retrieved from http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2007000100046&lng=pt&tlng=pt
- Prencipe, V. A., Rizzi, V., Acciari, V., Iannetti, L., Giovannini, A., Serraino, A., ... Caporale, V. (2012). *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control*, 25(1), 150–158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.018>
- Pritchard, T. J., Flanders, K. J., & Donnelly, C. W. (1995). Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 375–384. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00130-x](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00130-x)
- Rabenau, H. F., Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Preiser, W., & Doerr, H. W. (2005). Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Medical Microbiology and Immunology*, 194(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00430-004-0219-0>
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47–56.
- Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002. Jornal Oficial das Comunidades Europeias n.º L 31 de 1 de Fevereiro de 2002. Bruxelas, Bélgica
- Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. Jornal Oficial das Comunidades Europeias n.º L 139. Bruxelas, Bélgica.
- Richards, R. M., & Cavill, R. H. (1979). Electron-microscope study of the effect of chlorhexidine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios*, 26(104), 85–93.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, 38, 525–552. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.091216>
- Robertson, A., Tirado, M. C., Lobstein, T., Jermini, M., Knai, C., Jensen, J., ... James, W. (2004). Food and Health in Europe: A New Basis for Action. *WHO Regional Publications European Series*, 96, 1–385.
- Rost, T. L. (2006). *Plant biology*. Southbank, Vic., Australia: Thomson/Brooks/Cole.
- Russell, A. D., & Day, M. J. (1993). Antibacterial activity of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection*, 25(4), 229–238. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0195-6701\(93\)90109-D](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0195-6701(93)90109-D)
- Russell, A. D., & Path, F. R. C. (1986). Chlorhexidine: Antibacterial action and bacterial resistance. *Infection*, 14(5), 212–215. <https://doi.org/10.1007/BF01644264>

- Ryser, E. T., & Buchanan, R.L. (2013). *Listeria monocytogenes*. In: M. P. Doyle & R. L. Buchanan (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (pp. 503-545). Washington, DC: ASM Press.
- Saad, M., See, T., Abdullah, M., & Norazmir, M. N. (2013). Use of Rapid Microbial Kits for Regular Monitoring of Food-Contact Surfaces towards Hygiene Practices. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 105, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2013.11.029>
- Safavieh, M., Nahar, S., Zourob, M., & Ahmed, M. U. (2015). 15 - Microfluidic biosensors for high throughput screening of pathogens in food. In A. K. Bhunia, M. S. Kim, & C. R. Taitt (Eds.), *High Throughput Screening for Food Safety Assessment* (pp. 327–357). Woodhead Publishing. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-801-6.00015-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-801-6.00015-0)
- Saini, J., Marsden, J., & Crozier-Dodson, B. (2012). Evaluation of Potential for Translocation of *Listeria monocytogenes* from Floor Drains to Food Contact Surfaces in the Surrounding Environment Using *Listeria innocua* as a Surrogate. *Advances in Microbiology*, 2, 565–570. <https://doi.org/10.4236/aim.2012.24073>
- Schoder, D., Melzner, D., Schmalwieser, A., Zangana, A., Winter, P., & Wagner, M. (2011). Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. *Journal of Food Protection*, 74(6), 919–924. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-534>
- Seitz, S. R., Leon, J. S., Schwab, K. J., Lyon, G. M., Dowd, M., McDaniels, M., ... Moe, C. L. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6884–6888. <https://doi.org/10.1128/AEM.05806-11>
- Simonne, A. (2005). Hand Hygiene and Hand Sanitizers. *EDIS*, (5). Retrieved from <https://journals.flvc.org/edis/article/view/114836>
- Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7893–7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>
- Stessl, B., Szakmary-Brändle, K., Vorberg, U., Schoder, D., & Wagner, M. (2020). Temporal analysis of the *Listeria monocytogenes* population structure in floor drains during reconstruction and expansion of a meat processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, 314, 108360. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108360](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108360)
- Takahashi, H., Ohuchi, A., Miya, S., Izawa, Y., & Kimura, B. (2011). Effect of Food Residues on Norovirus Survival on Stainless Steel Surfaces. *PloS One*, 6, e21951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021951>
- Tartler, N., & Fortuna, J. (2012). Qualidade microbiológica de mãos e luvas e avaliação higiênicosanitária dos manipuladores de alimentos em uma praça de alimentação em Teixeira de Freitas-BA. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 9(2), 104–108. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.087>.
- Thow, A. M., Jones, A., Schneider, C. H., & Labonté, R. (2019). Global Governance of Front-of-Pack Nutrition Labelling: A Qualitative Analysis. *Nutrients*, 11(2), 268. <https://doi.org/10.3390/nu11020268>
- USDA. (2012). *Introduction to the microbiology of food processing* [PDF]. Washington: United States Department of Agriculture. Retrieved from https://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/SPN_Guidebook_Microbiology.pdf

- van den Berg, C., & Bruin, S. (1981). Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects. In L. B. Rockland, & G. F. Stewart (Eds.), *Water activity: Influences on food quality* (pp. 2-61). New York: Academic Press.
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., & Munster, V. J. (2013). Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen sur les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 18(38), 20590. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.38.20590>
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., Karesh, W. B., & Munster, V. J. (2014). Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus in milk. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1263–1264. <https://doi.org/10.3201/eid2007.140500>
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., ... Munster, V. J. (2020). Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *The New England Journal of Medicine*, 382(16), 1564–1567. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2004973>
- Van Doren, J. M., Neil, K. P., Parish, M., Gieraltowski, L., Gould, L. H., & Gombas, K. L. (2013). Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973-2010. *Food Microbiology*, 36(2), 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.04.014>
- Vivant, A.-L., Garmyn, D., & Piveteau, P. (2013). *Listeria monocytogenes*, a down-to-earth pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 87. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00087>
- Walker, C. M., & Ko, G. (2007). Effect of ultraviolet germicidal irradiation on viral aerosols. *Environmental Science & Technology*, 41(15), 5460–5465. <https://doi.org/10.1021/es070056u>
- Wang, X.-W., Li, J.-S., Jin, M., Zhen, B., Kong, Q.-X., Song, N., ... Li, J.-W. (2005). Study on the resistance of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Journal of Virological Methods*, 126(1–2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.005>
- WHO & FAO. (2006a). Food safety risk analysis: A guide for national food safety authorities. *FAO Food and Nutrition Paper 2006*, 87, 1–102.
- WHO & FAO. (2006b). *Understanding The Codex Alimentarius*. Rome: WHO & FAO.
- WHO. (2008a). *Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control*. Geneva: WHO.
- WHO. (2008b). *Viruses in food: scientific advice to support risk management activities: meeting report*. Rome, Italy: FAO.
- WHO. (2009). *Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food*. Geneva: WHO.
- WHO. (2011). Annex 2 - WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products: Main principles. *WHO Technical Report Series*, (961), 77-136.
- WHO. (2020b). *COVID-19 and food safety: Guidance for food businesses: Interim guidance* [PDF]. Retrieved from https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331705/WHO-2019-nCoVFood_Safety-2020.1-eng.pdf
- WHO. (2020b). *Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* [PDF]. Retrieved from <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf>

WHO. (2020c). Home care for patients with COVID-19 presenting with mild symptoms and management of their contacts. Retrieved from [https://www.who.int/publications-detail/home-care-for-patients-with-suspected-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-presenting-with-mild-symptoms-and-management-of-contacts](https://www.who.int/publications-detail/home-care-for-patients-with-suspected-novel-coronavirus-(ncov)-infection-presenting-with-mild-symptoms-and-management-of-contacts)

WHO. (2020e). *Water, sanitation, hygiene, and waste management for the COVID-19 virus: Interim guidance*. Geneva: WHO.

Williams, S. K., Roof, S., Boyle, E. A., Burson, D., Thippareddi, H., Geornaras, I., ... Nightingale, K. (2011). Molecular ecology of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in small and very small ready-to-eat meat processing plants. *Journal of Food Protection*, 74(1), 63–77. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-097>

Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., ... Huang, X. (2020). Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology*, 5(5), 434-435. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30083-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30083-2)

Yamamoto, Y., Ugai, K., & Takahashi, Y. (2005). Efficiency of hand drying for removing bacteria from washed hands: comparison of paper towel drying with warm air drying. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 26(3), 316–320. <https://doi.org/10.1086/502546>

Yepiz-Gomez, M., Gerba, C., & Bright, K. (2013). Survival of Respiratory Viruses on Fresh Produce. *Food and Environmental Virology*, 5, 150–156. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9114-4>

Sites consultados

ASAE. (2020). Autoridade para a Segurança Alimentar e Económica. Retrieved from <http://www.asae.gov.pt>

CDC. (2020a). How Coronavirus Spreads. Retrieved from https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fprepare%2Ftransmission.html

CDC. (2020b). Meat and Poultry Processing Workers and Employers: Interim Guidance from CDC and the Occupational Safety and Health Administration (OSHA). Retrieved from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/organizations/meat-poultry-processing-workers-employers.html>

EFSA. (2020). Coronavirus: No Evidence that Food is a Source or Transmission Route. Retrieved from <https://www.efsa.europa.eu/en/news/coronavirus-no-evidence-food-source-or-transmission-route>

FDA. (2020). Food Safety and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Retrieved from <https://www.fda.gov/food/food-safety-during-emergencies/food-safety-and-coronavirus-disease-2019-covid-19>

WHO. (2020d). Q&A on infection prevention and control for health care workers caring for patients with suspected or confirmed 2019-nCoV. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/qa-on-infection-prevention-and-control-for-healthcare-workers-caring-for-patients-with-suspected-orconfirmed-2019-ncov>