



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DE UMA METODOLOGIA DE ATPmetria  
NA MONITORIZAÇÃO DA HIGIENE FABRIL

ANA CARINA FERNANDES FERREIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professor Doutor José António Mestre  
Prates

Professora Doutora Yolanda Maria Vaz

Professora Doutora Marília Catarina Leal  
Fazeres Ferreira

ORIENTADORA

Professora Doutora Marília Catarina Leal  
Fazeres Ferreira

2008

LISBOA





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DE UMA METODOLOGIA DE ATPmetria  
NA MONITORIZAÇÃO DA HIGIENE FABRIL

ANA CARINA FERNANDES FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Professor Doutor José António Mestre  
Prates

Professora Doutora Yolanda Maria Vaz

Professora Doutora Marília Catarina Leal  
Fazeres Ferreira

ORIENTADORA

Professora Doutora Marília Catarina Leal  
Fazeres Ferreira

2008

LISBOA

## Dedicatória

A

todos aqueles que sempre acreditaram em mim...



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Marília Ferreira, todo o empenho, apoio, carinho e atenção que me deu ao longo deste projecto. Existem professores que marcam gerações, mas também existem aqueles que nos marcam para a vida!

Ao Professor António Barreto pelo seu contributo para a realização deste estágio.

À Professora Maria João Fraqueza pelos seus ensinamentos.

À Lena, Zézinha e D. Maria pela forma carinhosa e familiar como me acolheram no laboratório, por todo o que aprendi com elas, o meu muito obrigado!

Na indústria, gostaria de agradecer o carinho com que fui acolhida bem como os ensinamentos transmitidos, ao Dr. Armindo Lourenço, à Dra. Rosário Barata, à Eng. Fátima Fernandes, ao Sr. Rui Oliveira, e ao Eng. Paulo Almeida, e de uma forma especial à Eng. Paula Ferreira, pelo seu carinho e amizade.

Gostaria igualmente de agradecer a todas as pessoas que trabalham na sala de fatiados, em especial à D. Ermelinda, pela sua disponibilidade e ajuda na realização deste projecto.

Ao “Azores Team”, sinónimo do início, meio e fim desta longa caminhada que foi o nosso curso, a vossa amizade permanecerá para sempre, Ana Catarina Bastos, Joanna Franco, Mariana Messias e Patrícia Simões. Ao quase Açoriano Gonçalo Antunes, obrigado pela enorme paciência demonstrada, não é fácil lidar com tanta Açoriana junta!

A todos os meus colegas, de turma e de ano, que comigo se cruzaram ao longo destes seis anos, o meu muito obrigado. Com receio de me esquecer de alguém não citarei nomes!

A todos os meus amigos... sabe bem saber que estão sempre lá!

Aos meus pais, Lúcia e António, um muito obrigado será muito pouco para lhes agradecer tudo o que fizeram por mim! Sem eles as etapas difíceis não tinham sido ultrapassadas e esta longa caminhada não tinha chegado ao fim! Muito Obrigado!

Ao meu irmão, Paulo, companheiro de todas as horas, um importante pilar da minha vida, e à minha cunhada Ana, o meu agradecimento por estarem sempre presentes.

Aos meus avós maternos, Felícia e Henrique, e a toda a minha família, peças muito importantes na minha vida, um obrigado muito especial.

Ao meu namorado, Steven, obrigado pela paciência, apoio, carinho, suporte e acima de tudo amizade. Apesar de longe nunca deixaste de estar presente... Muito Obrigado!

## **Menção de apoio**

Este projecto foi totalmente financiado pela indústria de produtos alimentares onde decorreu.



# Avaliação de uma metodologia de ATPmetria na monitorização da higiene fabril

## Resumo

Nas últimas décadas tem-se assistido a uma grande evolução, quer nos métodos de produção dos alimentos, quer nos controlos necessários para garantir a produção de alimentos seguros.

Tornou-se necessário aplicar métodos mais rápidos do que os da microbiologia clássica de forma a verificar a eficácia dos planos de higienização das indústrias alimentares, no momento exactamente anterior ao início de fabrico, de forma a que as superfícies que contactam directamente com os alimentos possam ser novamente higienizadas, caso seja detectada uma situação não conforme.

De forma a implementar um método expedito que permitisse avaliar a higienização efectuada em equipamentos de uma indústria alimentar, neste estudo compararam-se métodos clássicos de detecção de microrganismos (aeróbios totais a 30 °C e *Enterobacteriaceae*), com métodos ditos rápidos, designadamente detecção de ATP por bioluminescência e detecção de proteína.

O estudo decorreu na sala de fatiados, na lâmina e no tapete de duas das três máquinas presentes. As colheitas para os 3 testes foram realizadas em simultâneo, após higienização, sob as mesmas condições. Registou-se, igualmente, a observação visual das superfícies onde se realizaram as colheitas.

Os resultados dos testes estatísticos McNemar e coeficiente Kappa revelaram respectivamente os valores  $p= 0,022$  e  $kappa= 0,410$  para a comparação entre aeróbios totais e ATP por bioluminescência;  $p= 0,146$  e  $kappa= 0,428$  para a comparação entre aeróbios totais e detecção de proteína;  $p= 0,581$  e  $kappa= 0,398$  para a comparação entre ATP por bioluminescência e detecção de proteína.

Tendo em atenção os resultados estatísticos obtidos, as características desta indústria e os objectivos pretendidos, verificou-se que o teste de proteína não trazia nenhuma mais-valia, pelo que a escolha recaiu sobre o teste de leitura de ATP por bioluminescência, como o mais adequado na monitorização da higiene.

**Palavras-chave:** planos de higienização, microbiologia clássica, detecção ATP por bioluminescência e detecção de proteína



# Evaluation of a methodology based on ATP bioluminescence for food industry hygiene monitoring

## Abstract

In the last decades there were relevant improvements on the methods used in food production, as well as on the necessary controls to make it more safe.

It has become necessary to apply more rapid tests than the ones in use in classical microbiology, to allow the verification of the efficacy of the hygiene plans on food industries just before the beginning of the production, and guarantee the hygiene conditions of surfaces in contact with food, and consequently providing an answer almost at real time.

In the present work, in order to implement a more expedite method that could enable the evaluation of hygiene conditions in food equipments, different classical methods of detection of microorganisms (total viable counts and *Enterobacteriaceae*) and rapid methods, such as ATP bioluminescence and protein detection assay, were compared.

The study was developed in the slided room, on the conveyor belt and on the blades of two slicer machines, using three different testes. The samples were collected simultaneously, after hygiene procedures, under the same conditions. Data on visual observations of the contact surfaces where samples were taken, were also registered.

The results of statistic tests, McNemar and Kappa coefficient showed respectively the value  $p= 0,022$  and  $kappa= 0,410$  for comparison between total viable counts and ATP bioluminescence;  $p= 0,146$  and  $kappa= 0,428$  for comparison total viable counts and protein detection;  $p= 0,581$  and  $kappa= 0,398$  for comparison ATP bioluminescence and protein detection.

Considering the results of the statistic tests, characteristics of the industry, and the proposed aims, we concluded that the protein test assay doesn't show advantages, becoming evident that the ATP bioluminescence is more suitable, for the purpose of hygiene monitoring.

**Key-words:** hygiene procedures, classical microbiology, ATP bioluminescence and protein detection.



# Índice

<b>Dedicatória</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>v</b>
<b>Menção de apoio</b>	<b>v</b>
<b>Resumo</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract</b>	<b>ix</b>
<b>Índice</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de tabelas</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>xiv</b>
<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1. Revisão Bibliográfica</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Higienização/Plano de higienização</b>	<b>3</b>
1.1.1 Programa de higienização	5
1.1.1.1 Tipos de sujidade	5
1.1.1.2 As superfícies	6
1.1.1.3 A água	7
1.1.1.4 Métodos de higienização	7
1.1.1.5 Detergentes e desinfetantes	8
1.1.2 Higiene Pessoal	11
1.1.3 Monitorização de um plano de limpeza	12
<b>1.2 Métodos Microbiológicos Clássicos</b>	<b>12</b>
1.2.1 Determinação de microrganismos aeróbios totais a 30 °C e de <i>Enterobacteriaceae</i>	13
<b>1.3 Teste de detecção de ATP por Bioluminescência</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Métodos de detecção de proteína e de açúcares, fosfatos e hidratos de carbono</b>	<b>21</b>
<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Meios de Cultura</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Preparação da solução de diluição</b>	<b>28</b>
<b>2.3 Esterilização</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Análises microbiológicas</b>	<b>28</b>
2.4.1 Colheita e preparação de amostras	28
2.4.2 Contagem de microrganismos a 30 °C	29
2.4.3 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	29
<b>2.5 Métodos rápidos</b>	<b>29</b>
2.5.1 Colheita de amostras	29
2.5.2 Material utilizado no teste de ATP	29
2.5.3 Leitura do ATP por bioluminescência	30
2.5.4 Material utilizado no teste de detecção de proteína	30
2.5.5 Leitura das zaragoas de PRO-Clean	31
<b>2.6 Análise estatística</b>	<b>31</b>

<b>3. Resultados</b>	<b>33</b>
3.1 Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C	33
3.2 Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i>	35
3.3 Detecção de ATP por bioluminescência	38
3.4 Visualização da detecção de proteína	40
3.5 Registo da observação visual	42
<b>4. Discussão</b>	<b>47</b>
<b>5. Conclusões</b>	<b>57</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>59</b>
<b>Anexos</b>	<b>63</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Reacção de detecção de ATP por bioluminescência. _____	18
<b>Figura 2</b> – Reacção do biureto para detecção de proteína. _____	22
<b>Figura 3</b> – Lâmina de aço inoxidável de uma das máquinas onde se efectuaram as colheitas. _____	27
<b>Figura 4</b> – Tapete de uma das máquinas onde se efectuaram as colheitas. _____	27
<b>Figura 5</b> – Lâmina da fatiadora e placas de delimitação das superfícies de colheita de amostras. _____	27
<b>Figura 6</b> – Tapete transportador com placas, para delimitação das superfícies de colheita de amostras. _____	27
<b>Figura 7</b> – Luminómetro utilizado para a medição de ATP por bioluminescência e respectiva zaragatoa descartável Ultrsnap. _____	30
<b>Figura 8</b> – Luminómetro utilizado para a medição de ATP por bioluminescência, preparado para efectuar medição. _____	30
<b>Figura 9</b> – Zaragatoa PRO-Clean. _____	31
<b>Figura 10</b> – Zaragatoas PRO-Clean, após colheita das amostras de superfícies com diferentes quantidades de proteína. _____	31
<b>Figura 11</b> – Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C na lâmina da máquina 1, nas 11 colheitas. _____	34
<b>Figura 12</b> – Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C no tapete da máquina 1, nas 11 colheitas. _____	34
<b>Figura 13</b> – Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C na lâmina da máquina 3, nas 13 colheitas. _____	35
<b>Figura 14</b> – Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C no tapete da máquina 3, nas 13 colheitas. _____	35
<b>Figura 15</b> – Contagem de Enterobacteriaceae no tapete da máquina 1, nas 11 colheitas. _____	36
<b>Figura 16</b> – Contagem de Enterobacteriaceae na lâmina da máquina 3, nas 13 colheitas. _____	37
<b>Figura 17</b> – Contagem de Enterobacteriaceae no tapete da máquina 3, nas 13 colheitas. _____	37
<b>Figura 18</b> – Medição de ATP por bioluminescência na lâmina da máquina 1, nas 11 colheitas. _____	38
<b>Figura 19</b> – Medição de ATP por bioluminescência no tapete da máquina 1, nas 11 colheitas. _____	39
<b>Figura 20</b> – Medição de ATP por bioluminescência na lâmina da máquina 3, nas 13 colheitas. _____	39
<b>Figura 21</b> – Medição de ATP por bioluminescência no tapete da máquina 3, nas 13 colheitas. _____	40
<b>Figura 22</b> – Resultados, dos testes de visualização de detecção de proteína nos 11, ensaios na lâmina da máquina 1. _____	40
<b>Figura 23</b> – Resultados, dos testes de visualização de detecção de proteína nos 11, ensaios no tapete da máquina 1. _____	41
<b>Figura 24</b> – Resultados, dos testes de visualização de detecção de proteína nos 13 ensaios, na lâmina da máquina 3. _____	41
<b>Figura 25</b> – Resultados, dos testes de visualização de detecção de proteína nos 13 ensaios, no tapete da máquina 3. _____	42
<b>Figura 26</b> – Resultados, dos registos da observação visual à lâmina da máquina 1, nas 11 colheitas realizadas. _____	42
<b>Figura 27</b> – Resultados, dos registos da observação visual ao tapete da máquina 1, nas 11 colheitas realizadas. _____	43
<b>Figura 28</b> – Resultados, dos registos da observação visual à lâmina da máquina 3, nas 13 colheitas realizadas. _____	43
<b>Figura 29</b> – Resultados, dos registos da observação visual ao tapete da máquina 3, nas 13 colheitas realizadas. _____	44
<b>Figura 30</b> – Análise de concordância entre os vários testes, assim como da observação visual. _____	45

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, nas duas máquinas e nos dois locais em estudo.....	33
<b>Tabela 2</b> – Contagens de <i>Enterobacteriaceae</i> , nas duas máquinas e nos dois locais em estudo. ....	36
<b>Tabela 3</b> – Valores de ATP medidos por bioluminescência, nas amostras recolhidas, nas duas máquinas de fatiar e nos dois locais em estudo.. .....	38
<b>Tabela 4</b> – Resumo dos resultados dos testes estatísticos de McNemar e do Coeficiente Kappa .....	46
<b>Tabela 5</b> – Colheitas não concordantes entre si nos 3 testes .....	52

## Lista de abreviaturas

AOAC International – Association of Official Analytical Chemistry International

ATP – Adenosina trifosfato

BCA – Ácido bicinchonínico

BPH – Boas Práticas de Higiene

CDM – Contagem directa ao microscópio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point

NAD<sup>+</sup> – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

ISO – International Organization for Standardization

NASA – National Aeronautics and Space Administration

NP – Norma Portuguesa

PCC – Ponto Crítico de Controlo

PPM – Partes por milhão

RLU – Relative Light Units / Unidades Relativas de Luz

UFC – Unidade Formadora de Colónia

## Introdução

O meu estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária foi realizado na área científica de Segurança Alimentar e teve a duração aproximada de 5 meses, com uma média de 8 horas diárias. Decorreu no Laboratório de Tecnologia dos Produtos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa e numa indústria de transformação de produtos cárneos.

No Laboratório de Tecnologia dos Produtos Animais, acompanhei as diversas actividades do laboratório de microbiologia alimentar. De salientar a participação em análises microbiológicas a zaragoas, para controlo e monitorização de higiene, a produtos alimentares de origem animal (peixe, carne de bovino e suíno, doces variados e molhos) e a águas. As análises eram efectuadas a solicitação do exterior, no regime de prestação de serviços.

Estas análises, efectuadas segundo as técnicas descritas nas Normas específicas portuguesas ou europeias em vigor, incluíram a pesquisa e/ou contagem de alguns microrganismos, nomeadamente microrganismos aeróbios totais a 30 °C, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, esporos de Clostrídeos sulfito redutores, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, fungos (bolores e leveduras) e *Vibrio* spp.

As análises de água, de acordo com o estipulado no Decreto-lei n.º 306/2007, constaram da pesquisa de *Enterococos* e *Escherichia coli* em 100 ml.

Concomitantemente a essas tarefas, estive integrada num estudo solicitado por uma empresa de carnes, no qual se pretendia avaliar as alterações microbiológicas e químicas sofridas pela carne de bovino desde o corte e embalagem até ao consumo final, quando armazenada em atmosfera protectora e colocada nas prateleiras de um supermercado, nas condições usuais de venda aos consumidores.

Acompanhei a colheita desses produtos quer no local de corte e embalagem, quer nos supermercados, de acordo com o desenho experimental do estudo. No laboratório, realizaram-se análises microbiológicas, nomeadamente a pesquisa de bactérias ácido lácticas (ISO 15214:1998), *Brochothrix* (ISO 13722:1996), microrganismos aeróbios totais a 30 °C (NP 4405:2002) e *Pseudomonas* spp (ISO 13720:2000).

Na indústria de transformação de produtos cárneos, com três linhas de produção (fatiados, pastas e cozidos), fui integrada no Departamento da Qualidade, acompanhando e participando como estagiária nas tarefas aí desenvolvidas. Entre outras tarefas, acompanhei processos de fabrico nas diferentes linhas, verifiquei menções de rotulagem em embalagens e latas e procedi a colheitas de produtos para análise microbiológica. A amostragem era

aleatória e realizada sobre os produtos produzidos ao longo da semana (em média 6 produtos por semana).

As determinações microbiológicas, incluíram contagens de microrganismos aeróbios a 30 °C (NP 4405:2002), *Enterobacteriaceae* (NP 4137:1991), bactérias ácido lácticas (ISO 15214:1998), *Staphylococcus aureus* (NP 2260:1986), *Escherichia coli* e coliformes (utilizando o meio RAPID`E.coli 2 Agar da Bio-Rad Laboratórios, aprovado pela AOAC international – Association of Official Analytical Chemistry International), além de pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito redutores (NP 2262:1986).

Efectuava-se, ainda, a todas as matérias-primas recebidas na fábrica, a pesquisa de *Staphylococcus aureus*.

Particpei na apreciação das provas de estabilidade (provas de estufa) das conservas alimentares realizadas na indústria (salsichas, pasta de fígado e de carne). De cada ciclo de esterilização eram retiradas, no mínimo, 3 latas, das quais uma era mantida à temperatura ambiente, uma a 35 °C e outra a 55 °C, durante 7 dias.

Após a incubação, eram escolhidas 20 latas aleatoriamente, das mantidas à temperatura ambiente, para realização das determinações ponderais (pesagem do produto e do excipiente quando presente). O resultado das determinações ponderais, de acordo com padrões pré-definidos, determina a aprovação ou reprovação de todo o lote. As restantes latas eram abertas para se verificar a integridade do produto, suas características macroscópicas (cor, textura, superfície e contagem das unidades) e do excipiente, quando presente.

Observei os gráficos de cada esterilização (com menção à temperatura e pressão), tendo especial atenção para os diferentes tipos de gráficos, correspondentes a um tipo de conserva, uma vez que existem programas pré-definidos que têm que ser respeitados para que a esterilização possa ser considerada válida.

Para além disso, procedi a um estudo que tinha em vista a escolha de um método dito rápido para monitorizar e verificar a aplicação dos planos de higiene numa sala de fatiagem de produtos prontos a serem consumidos, uma vez que esta etapa é considerada um PCC (Ponto Crítico de Controlo) no plano HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*). Para o efeito, compararam-se dois métodos expeditos ditos rápidos, a saber, a pesquisa de ATP (Adenosina trifosfato) por bioluminescência e a detecção de proteína, com métodos de microbiologia clássica, onde se fez a avaliação da presença de alguns dos principais indicadores de higiene, nomeadamente microrganismos aeróbios totais a 30 °C e *Enterobacteriaceae*.

O objectivo deste trabalho foi, então, nas condições em presença, escolher o método expedito que mais se adequa à monitorização do PCC considerado.

# 1. Revisão Bibliográfica

## 1.1 Higienização/Plano de higienização

A palavra higiene teve a sua origem na Grécia Antiga. Na mitologia grega, aparece *Asclepius*, filho de *Apollo*, referido como o Deus da medicina e da cura, e sua irmã *Hygeia* ficou conhecida como a Deusa da cura, estando esse poder directamente relacionado com a limpeza (Lelieveld, Mostert & Holah, 2005).

Hipócrates, um dos mais famosos médicos da Grécia Antiga, conseguiu restabelecer a saúde de alguns dos seus pacientes através de dieta apropriada e higiene conveniente (Lelieveld *et al.*, 2005).

Alguns antropologistas defendem que o homem tem uma tendência natural para viver com higiene e num ambiente ordenado, evitando o consumo de alimentos sujos. E em meados do século XIX, na Europa, o médico húngaro Ignác Fülöp Semmelweis (estabeleceu relação entre o decréscimo da febre puerperal e a higienização conveniente das mãos aquando dos cuidados médicos) e o cirurgião Joseph Lister (introduziu a assépsia na cirurgia), introduziram na sociedade moderna, os cuidados higiénicos (Lelieveld *et al.*, 2005).

Desde então, inúmeros investigadores concentraram-se no estudo da higiene, de uma maneira geral e de uma forma específica na higiene alimentar, uma vez que muitos alimentos podem funcionar como veículos transportadores e causadores de doenças. Assim, introduziram-se as Boas Práticas de Higiene (BPH) na manipulação de alimentos ao longo de toda a cadeia alimentar, de forma a garantir a segurança alimentar.

As BPH estão previstas na legislação nacional e internacional, e são muito frequentemente consideradas pré-requisitos num sistema de segurança alimentar baseado nos princípios do HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*), conceito que foi introduzido por Bauman, no ano de 1970, e alterou os conceitos de segurança alimentar até então em vigor (Hawronskyj & Holah, 1997; Metaxopoulos, Kritikos & Drosinos, 2003).

Prevenir a contaminação dos alimentos, é a chave de um sistema de segurança alimentar. A contaminação ocorre, muitas vezes, devido à proliferação indesejável de microrganismos, à deficiente separação dos produtos crus e processados, ao inadequado controlo de temperatura durante o processo de fabrico ou armazenamento, à inadequada higienização ou a contaminação cruzada, especialmente por microrganismos patogénicos ou suas toxinas, em refeições prontas a consumir (Easter, 2003; WHO/FAO, 2003; Legnani, Leoni, Berveglieri, Mirolo & Álvaro, 2004).

O controlo higiénico eficaz é fundamental para evitar as consequências nefastas para a saúde humana e para a economia das doenças e lesões causadas por alimentos e

deterioração de alimentos (WHO/FAO, 2003). Blankenfeld-Enkvist & Brännback (2002), defendem mesmo que os contaminantes microbiológicos nos alimentos são um dos mais importantes problemas no que se refere a custos económicos.

A infecção instala-se quando há ingestão de alimentos contaminados com bactérias patogénicas viáveis, cuja quantidade tem de ser suficiente para ultrapassar a barreira ácida do estômago; passada esta barreira, os microrganismos sobreviventes chegam ao intestino delgado, onde se multiplicam e provocam o aparecimento de sintomas (Soares, 2007).

Todos os intervenientes, incluindo agricultores e criadores, fabricantes e processadores, manipuladores de alimentos e consumidores, têm a responsabilidade de garantir que os alimentos são seguros e adequados ao consumo (WHO/FAO, 2003). Os consumidores esperam dispor de alimentos de alta qualidade, isentos de microrganismos patogénicos e toxinas, pelo que a adequada higienização é indispensável, não podendo ser substituída por nenhuma outra acção (Wildbrett, 2000).

Para garantir a correcta aplicação dos planos de higienização, todas as tarefas devem estar registadas em documentos devidamente arquivados, permitindo posterior consulta, especialmente os desvios e acções correctivas implementadas (Baptista, 2003).

Efectuar de forma adequada o plano de higienização tem uma importância económica elevada. Os custos têm que ver com o tempo despendido e a mão-de-obra, equipamento e consumíveis utilizados e se a higienização não for realizada da forma mais correcta e eficaz, o custo inerente a estas acções poderá ser muito superior ao benefício que delas advêm (Easter, 2003).

A matéria orgânica remanescente, derivada de resíduos de alimentos ou incrustações, pode funcionar como suplemento nutricional que favorece a sobrevivência e a proliferação dos microrganismos, diminuindo a eficácia dos detergentes e desinfectantes (Patel, 1994).

Muitas vezes, na indústria, existem as condições ideais para o desenvolvimento de biofilmes em qualquer superfície. Estes, podem demorar dias ou semanas para iniciar o seu desenvolvimento, que ocorre quando os microrganismos se agregam nas superfícies e segregam uma matriz extracelular protectora, constituída por polissacáridos e glicoproteínas. Remover um biofilme, recorrendo a limpeza e desinfecção, pode revelar-se tarefa impossível, pelo que é extremamente importante, impedir a adesão e reduzir a incidência de agregação de microrganismos, principalmente os patogénicos, a estas superfícies (Jessen & Lammert, 2003; Lelieveld *et al.*, 2005). O *design* higiénico dos equipamentos e o *Layout* da planta, também são aspectos importantes na prevenção e controlo dos biofilmes (Forsythe, 2002).

Um plano de higienização deve especificar as áreas, equipamentos e utensílios a serem limpos, a responsabilidade por tarefas específicas, o método e a frequência da limpeza e as medidas de monitorização. De forma clara e directa deve responder a

perguntas como: o que é limpo, como é limpo, quando é limpo e quem limpa (WHO/FAO, 2003).

A limpeza deve ser feita das áreas menos contaminadas para as mais contaminadas, e a eliminação da sujidade deve ser efectiva, assim como a destruição ou a redução de microrganismos, até níveis considerados aceitáveis e que não coloquem em risco a saúde dos consumidores e a qualidade do produto, nomeadamente os potencialmente patogénicos e os que provocam deterioração dos alimentos (Noronha, n.d.).

Idealmente, o plano de higiene deverá ser pensado logo quando se inicia o desenho e a construção do edifício e a escolha dos equipamentos, uma vez que a sua configuração deve permitir a correcta manutenção, limpeza e desinfectação. A contaminação pelo ar deve ser prevenida ou minimizada e deve verificar-se a existência de protecção efectiva contra a entrada e permanência de pragas. O projecto das instalações deve privilegiar o fluxo de produtos das zonas mais contaminadas para as menos contaminadas, prevenindo desta forma as recontaminações. Todos os documentos inerentes à construção devem ser criteriosamente catalogados, validados e armazenados (Noronha & Baptista 2003; Lelieveld *et al.*, 2005).

Os estabelecimentos fabris devem estar afastados de áreas ambientalmente poluídas e de actividades industriais que constituam risco grave de contaminação, de áreas sujeitas a inundações, salvo se forem tomadas precauções suficientes, de áreas com especial predisposição à infestação por pragas e de áreas em que os resíduos, líquidos ou sólidos, não possam ser eficazmente removidos (WHO/FAO, 2003).

### **1.1.1 Programa de higienização**

Para se realizar um programa de higienização com sucesso, é essencial conhecer a natureza da sujidade que vai ser removida, o tipo de superfícies que vão ser higienizadas, a qualidade da água, os métodos de higienização mais adequados e utilizar agentes de limpeza e desinfectação compatíveis com a indústria alimentar. É igualmente importante escolher o método mais indicado para avaliar e monitorizar a eficácia do processo implementado, o que permitirá não só detectar precocemente um problema mas, acima de tudo, evitar a sua perpetuação.

#### **1.1.1.1 Tipos de sujidade**

Definir o tipo de sujidade é um dos elementos mais importantes quando se pretende implementar um plano de higiene, pois está intimamente relacionado com o método e

detergente mais indicado para a sua remoção (Noronha, n.d.). Assim, quanto à origem, a sujidade pode classificar-se em animal, vegetal e mineral; quanto à sua composição química, em inorgânica, proveniente de resíduos metálicos, alcalinos ou de água dura, e orgânica, resultante sobretudo de resíduos de alimentos (Baptista, 2003).

Numa indústria de carnes, a sujidade orgânica é, sem dúvida, a que maiores problemas causa; os resíduos de gordura, proteínas e hidratos de carbono, resultantes da laboração, necessitam ser correctamente higienizadas para que sejam cumpridos os pré-requisitos estabelecidos no Código de Boas Práticas (Noronha, n.d.).

A gordura, insolúvel em água e em soluções alcalinas e ácidas, é facilmente removida na presença de agentes tensioactivos e com ajuda de temperatura (40 °C a 60°C); as proteínas são pouco solúveis em água, ligeiramente solúveis em solução alcalina, mas a sua remoção é relativamente fácil; os hidratos de carbono, solúveis em água, permitem igualmente uma remoção relativamente fácil (Noronha, n.d.).

#### **1.1.1.2 As superfícies**

A escolha dos materiais utilizados na indústria deve ser cuidada, devendo optar-se pelos materiais duráveis, não porosos, que não apresentem facilmente corrosão, estáveis à temperatura e aos produtos químicos neles utilizados, passíveis de manter e limpar (Noronha & Baptista, 2003; WHO/FAO, 2003).

O melhor material utilizado é, sem dúvida, o aço inoxidável, devido às suas propriedades químicas. É o mais resistente à corrosão, tem superfície suave e impermeável, é fácil de limpar e resistente a altas temperaturas. Contudo, não é totalmente inócuo, porque na sua superfície facilmente se forma uma camada de óxido de cromo, que rapidamente é destruída pelo contacto com o ar. Inadequadamente utilizam-se materiais abrasivos para a remover, danificando irremediavelmente a superfície (Jullien, Bénézech, Carpentier, Le Bret & Faille, 2003).

As superfícies de metal enferrujam devido a detergentes ácidos ou com cloro; os galvanizados previnem esse enferrujamento. Nas superfícies de borracha, deve optar-se pelas não porosas ou esponjosas, e por utilizar detergentes alcalinos que não afectam a sua estrutura, ao contrário do que acontece quando se utilizam solventes orgânicos e ácidos fortes (Noronha, n.d.).

Superfícies de betão podem ser danificadas e fragmentar devido ao contacto com alimentos ácidos e agentes de limpeza. O vidro, quando utilizado, deve ser suave e impermeável e para proceder à sua limpeza deve recorrer-se a detergentes alcalinos suaves ou neutros, que não alteram a sua estrutura (Noronha, n.d.).

A madeira está contra-indicada na indústria alimentar, uma vez que não é possível realizar uma higienização conveniente, porque a sua superfície rugosa facilita a fixação dos

microrganismos, para além do que absorve facilmente humidade, gorduras e óleos (Noronha, n.d.).

### **1.1.1.3 A água**

Quando se pretende por em prática um plano de higienização, um dos factores determinantes a ter em conta é a qualidade na água, que deve ser própria para consumo humano (ausência de odor, sabor, cor e sedimentos estranhos, salubre, limpa, desejavelmente equilibrada na sua composição, livre de microrganismos e não corrosiva), (Noronha, n.d.; Decreto Lei nº 306/2007).

De acordo com o Decreto-Lei nº 306/2007, a água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, por pontos de entrega, por camiões ou navios-cisterna, por reservatórios não ligados à rede de distribuição ou utilizada numa indústria alimentar, deve ser analisada quanto a parâmetros microbiológicos, parâmetros químicos e parâmetros indicadores. É igualmente neste Decreto-Lei que se encontram estabelecidas as frequências mínimas de amostragem e de análise para a realização do controlo de qualidade da água.

O abastecimento, armazenamento e distribuição de água potável, assim como o controlo de temperatura, deve estar disponível, de forma a garantir a segurança e a adequação aos alimentos. A utilização de água não potável está prevista na indústria, desde que se destine exclusivamente a controlo de incêndios, produção de vapor, refrigeração ou acção semelhante que não contacte com os alimentos. Os sistemas de água não potável, devem estar identificados para que não haja refluxo para os sistemas de água potável (WHO/FAO, 2003).

Em alguns locais da indústria, dada a natureza das operações aí realizadas, é igualmente importante controlar a temperatura ambiente, de forma a garantir a segurança dos alimentos. O inadequado controlo desta variável é uma das causas mais comuns das doenças com origem nos alimentos.

### **1.1.1.4 Métodos de higienização**

As práticas de higiene, deverão ser realizadas de forma adequada, para garantir que os microrganismos são removidos e inactivados durante a limpeza e desinfecção (Tompkin, 2004).

A limpeza pode recorrer à utilização combinada de métodos físicos, como o calor, a fricção, o fluxo turbulento, a limpeza a vácuo ou outros métodos que evitem o uso de água, e métodos químicos utilizando detergentes e/ou desinfectantes (WHO/FAO, 2003).

Os métodos e materiais de limpeza utilizados dependem da natureza da indústria (processo de fabrico, tipo de produto, tipo de superfícies) e nível de higiene requerido, podendo ser efectuada apenas uma limpeza ou uma limpeza seguida de desinfecção.

Por vezes, por razões relacionadas com a economia de tempo e energia, há interesse em limpar e desinfetar em simultâneo (sanificação), todavia, em muitos casos, esta operação conjunta levanta reservas, porque a sujidade que envolve os microrganismos reduz a eficácia da desinfecção; para compensar a perda de eficácia provocada pela sujidade, utilizam-se sempre quantidades mais elevadas de sanificador do que seria necessário para uma superfície previamente limpa (Wildbrett, 2000).

O processo de higienização inicia-se com o enxaguamento, para remoção de partículas de sujidade e de alguns microrganismos pouco aderidos, seguindo-se lavagem com a aplicação do detergente, que actua sobre as partículas de sujidade que se encontram aderidas, diminuindo a sua ligação às superfícies; segue-se a fase de enxaguamento, para remoção completa das partículas entretanto libertadas, do detergente aplicado e de alguns microrganismos (Noronha, n.d.; Wildbrett, 2000; Cruz, Cenci & Maia, 2006).

Nos casos em que se realiza desinfecção, aplica-se então o desinfectante que se deixa actuar durante algum tempo; ocorre nesta fase uma redução considerável do número de microrganismos. Segue-se novo enxaguamento para remoção completa do desinfectante, etapa dispensável para alguns desinfectantes (Noronha, n.d.).

A desinfecção, não será efectiva, sempre que algum dos passos anteriores do processo de higienização, não for eficazmente realizado (Lelieveld *et al.*, 2005).

Por fim realiza-se a secagem, cuja principal finalidade é a remoção de água em excesso, eliminando a humidade residual que poderia favorecer o crescimento de microrganismos (Noronha, n.d.). Realiza-se recorrendo a ar seco ou qualquer outro material disponível como, por exemplo, papel descartável, de forma a que a recontaminação seja mínima (Lelieveld *et al.*, 2005).

#### **1.1.1.5 Detergentes e desinfectantes**

Os detergentes utilizados nos processos de limpeza, devem obedecer a alguns requisitos, como a dissolução rápida e completa na água, penetração rápida na sujidade, capacidade de condicionar ou neutralizar a dureza da água, e de manter a sujidade em suspensão, facilidade de enxaguar, biodegradável e não tóxico. Agrupam-se em três classes, detergentes alcalinos, ácidos e enzimáticos (Noronha & Baptista, 2003).

Os detergentes alcalinos possuem pH entre 7 e 14; os altamente alcalinos, são utilizados para a remoção de impurezas incrustadas ou queimadas, os moderadamente alcalinos são eficientes na remoção de gorduras e os alcalinos suaves são vulgarmente utilizados na limpeza manual de áreas ligeiramente sujas.

Os detergentes ácidos, removem os materiais que estão secos ou incrustados nas superfícies e dissolvem os minerais. São especialmente eficazes na remoção de depósitos formados pelos detergentes alcalinos.

Existem detergentes ácidos orgânicos e inorgânicos. Os primeiros não corroem as superfícies, são adequados para limpezas manuais e reduzem a dureza da água. Os inorgânicos são excelentes para remover e controlar depósitos minerais, mas bastante corrosivos para as superfícies (Noronha, n.d.).

Os detergentes enzimáticos constituem uma alternativa aceitável, quando os equipamentos não podem ser expostos a condições excessivamente ácidas ou alcalinas, uma vez que as enzimas actuam de forma específica sobre a sujidade (Baptista, 2003).

Escolhido o detergente mais adequado, de acordo com as características da indústria, é fundamental seguir as recomendações do fabricante sobre concentração, tempo e temperatura de utilização; é, também, importante a remoção prévia das sujidades, por acção mecânica. A alteração de apenas um destes factores pode comprometer irremediavelmente a eficácia do detergente (Langsrud, Sidhu, Heir & Holck, 2003).

A principal função da desinfecção, é reduzir o número de microrganismos viáveis, principalmente os patogénicos, e prevenir o crescimento microbiano durante a produção; é especialmente importante em superfícies húmidas, onde as condições são mais favoráveis à proliferação microbiana (Noronha, n.d.).

Actualmente o mercado disponibiliza três tipos de desinfecção: por calor, por radiação ou química.

A desinfecção por calor, é um bom método, actua sobre todos os microrganismos, não é corrosivo, contudo apresenta como principais limitações a não aplicabilidade em superfícies sensíveis ao calor, bem como o seu elevado custo.

A desinfecção por radiação é mais usada em hospitais e laboratórios; na indústria alimentar os restos de alimentos e outras sujidades, absorvem a radiação e têm um efeito protector dos microrganismos, o que, por si só, já é uma grande desvantagem.

A desinfecção química é, sem dúvida a mais vulgarmente utilizada, contudo, é necessário escolher o desinfectante mais apropriado de acordo com os microrganismos que se pretendem eliminar; os mais utilizados são o cloro e compostos de cloro, compostos de iodo e compostos de amónio quaternário (Noronha, n.d.).

O cloro e compostos de cloro, são bons antibacterianos, contudo ineficientes na presença de alguns produtos orgânicos; as soluções muito concentradas podem ser corrosivas para as ligas de alumínio. Dentro dos compostos de cloro, os mais utilizados são os hipocloritos de cálcio e sódio, cujo uso, nas concentrações adequadas, não alteram as qualidades organolépticas dos produtos (Noronha, n.d.; Jessen & Lammert, 2003).

Os compostos de iodo, podem combinar-se com agentes de limpeza ácidos; as soluções preparadas devem ter concentrações entre 25-50 mg/l de iodo activo e pH inferior

a 4. O seu tempo de actuação é bastante baixo, contudo este composto pode ser corrosivo, o que implica a necessidade de enxaguamento abundante com água limpa. Elimina um largo espectro de bactérias, mas a presença de resíduos alimentares e de sujidade inactiva-o; apresenta cor amarela quando o iodo se mantém activo, e a alteração da cor significa a inactividade do composto.

Os compostos de amónio quaternário têm boa capacidade de higienização, não são tóxicos nem corrosivos, contudo tendem a permanecer nas superfícies, daí a importância de enxaguar cuidadosamente com água limpa. Devem ser usados em concentrações entre 200-1200 mg/l; se a água de lavagem for dura, deve aumentar-se a concentração, mas nunca se pode misturar quaisquer detergentes ou agentes higienizantes aniónicos (Noronha, n.d.).

A escolha do desinfectante deve considerar o tempo de contacto, temperatura, concentração, pH, limpeza prévia e dureza da água, os quais são factores importantes que condicionam a sua eficácia (Cruz *et al.*, 2006).

Ainda é muito comum, na indústria, a realização da limpeza manual, efectuada pelos próprios manipuladores de alimentos. Devido à grande heterogeneidade de resultados que se podem obter, é requerida uma cuidada monitorização. Para auxiliar à limpeza manual pode recorrer-se a mangueiras com pistolas de água, com tamanho adequado ao local a higienizar, de forma a evitar quedas de pressão ou dispersão da sujidade, e a escovas, preferencialmente de nylon, pois têm fibras resistentes, uniformes e não absorvem água (Noronha, n.d.).

O uso de raspadores está condicionado à limpeza de zonas de dimensão reduzida e os mecanismos abrasivos, vulgarmente conhecidos por “palha-de-aço”, estão restritos a zonas que não contactem directamente com os alimentos.

Contudo, podem ainda utilizar-se outros métodos, tais como imersão, alta pressão (recorrendo a bombas de água de alta pressão ou pistolas de vapor), espuma e gel (evita acção mecânica e reduz custos de mão de obra), limpeza de equipamentos em circuitos fechados (implica instalação de equipamentos específicos) e pulverização, recorrendo a nebulizantes e fumigantes ou a sistemas de aspensão (Noronha, n.d.).

O equipamento utilizado na limpeza da área de fabrico deve estar criteriosamente identificado, para não ocorrer troca com o equipamento utilizado em áreas de não produção; deve ser manuseado com cuidado e de acordo com as instruções do fabricante, se for o caso.

Após higienização, devem-se lavar, desinfectar e secar os utensílios e equipamentos e armazená-los em lugar próprio. Os detergentes e desinfectantes devem ser colocados em local fechado, longe dos géneros alimentícios, evitando o risco de contaminação (Noronha, n.d.).

### 1.1.2 Higiene Pessoal

A roupa usada no exterior da fábrica, deve ser diferente da usada no interior da mesma, principalmente nas zonas de processamento de alimentos. Idealmente cada funcionário deve possuir equipamento de protecção individual de cor clara, constituído por touca ou barrete, camisa, camisola ou bata, calças e calçado apropriado. Eventualmente avental, com bolsos abaixo do nível da cintura, de forma que os objectos pessoais aí guardados que possam cair, vão directamente para o pavimento (Baptista & Saraiva, 2003).

As pessoas que entram em contacto directo ou indirecto com os alimentos, devem manter um nível adequado de limpeza pessoal, e comportamentos e modos de operação adequados de forma a não contaminarem os alimentos por contaminação cruzada, quer devido a infecções bacterianas, quer virais. Os operadores envolvidos no processo de limpeza, devem receber formação em higiene pessoal e alimentar, para que sejam prevenidas as contaminações cruzadas dos alimentos, resultantes da disseminação da sua flora corporal, principalmente as que resultam dos microrganismos com uma dose infectante baixa, como seja a *Escherichia coli* O157 (WHO/FAO, 2003; Lelieveld *et al.*, 2005).

As contaminações cruzadas podem ocorrer de forma directa, quando o alimento é directamente contaminado a partir de outro alimento ou superfície com que contacte e ainda através do ar (Legnani *et al.*, 2004). A contaminação indirecta envolve um processo bem mais complexo, em que a contaminação ocorreu em um ou mais locais ao longo da cadeia alimentar, tendo permanecido resíduos nos tecidos (Lelieveld *et al.*, 2005).

As áreas de processamento devem ter acesso restrito ou controlado, podendo ser necessário lavar as mãos ou desinfectá-las antes da entrada nestas áreas. O equipamento de uso pessoal deverá ser o mais apropriado e a sua utilização exclusiva do local de trabalho; deverá apresentar-se limpo e ser trocado com frequência, de forma a reduzir a potencial de contaminação durante o processo laboral.

Os lavatórios para lavagem das mãos devem estar equipados com água quente e fria. As mãos devem ser higienizadas com sabão específico, e a desinfectação realizada com produtos adequados; devem ser secas com toalhas descartáveis. O *Staphylococcus aureus*, constituinte comum da flora cutânea habitual pode continuar presente, mesmo tendo os cuidados citados, pelo que pode ser aconselhável o uso de luvas descartáveis quando se manipulam alimentos (WHO/FAO, 2003).

A lavagem das mãos e da zona dos antebraços exposta, deverá ocorrer obrigatoriamente no início da laboração, após ida à casa de banho, após as refeições, sempre que se manusear alimentos crus ou material contaminado, antes de se colocar ou

mudar de luvas e depois de se contactar com detergentes ou desinfectantes (Baptista & Saraiva, 2003).

### **1.1.3 Monitorização de um plano de limpeza**

Optimizar e monitorizar, o programa de limpeza, reduz custos em material e tempo, minimiza a contaminação ambiental, diminui as perdas por avarias e aumenta o tempo de vida útil dos produtos alimentares. Normalmente, a monitorização avalia a presença de resíduos, recorrendo a inspecção visual e faz a avaliação microbiológica, através do recurso a técnicas de microbiologia clássica ou a métodos mais expeditos, como as placas de contacto.

Por outro lado, pode recorrer-se à utilização de métodos rápidos para monitorização do plano de limpeza, nomeadamente ATPmetria, que mede a quantidade de ATP presente numa determinada superfície, ou zaragatoas específicas que permitem detectar proteína (importante na indústria de carnes) ou lactose (indústrias de lacticínios).

De acordo com Baptista (2003), uma elevada percentagem de intoxicações e infecções alimentares, resulta da contaminação dos equipamentos, o que reforça a noção da importância fundamental da higienização, na indústria alimentar.

## **1.2 Métodos Microbiológicos Clássicos**

De acordo com Prescott, Harley, & Klein (2005), a microbiologia pode ser definida como o estudo de organismos e agentes demasiado pequenos para serem claramente vistos a olho nu.

Mesmo antes de os microrganismos poderem ser visualizados, alguns autores suspeitavam da sua existência e responsabilizavam-nos por doenças. Entre estes encontra-se o filósofo romano Lucretius (98-55 A.C.) e o físico Girolamo Fracastoro (1478-1553), que sugeriram, cada um a seu tempo, que as doenças eram causadas por criaturas vivas invisíveis (Prescott *et al.*, 2005).

Antony van Leeuwenhoek, um microscopista amador, foi o primeiro a observar e descrever microrganismos, publicando os resultados das suas primeiras observações de bactérias e protozoários em 1677 (Ferreira & Sousa, 2000; Prescott *et al.*, 2005).

Contudo, só no século XIX (1857), Louis Pasteur, demonstrou que a fermentação ácido láctica era produzida por microrganismos, iniciando desta forma a era moderna da microbiologia alimentar (Prescott *et al.*, 2005).

A análise microbiológica, designada clássica, tradicional ou convencional, remonta aos anos de 1920-1930, contudo nessa época não existia metodologia específica. Anteriormente a esta data, a única forma de verificar se um local estava ou não correctamente higienizado, seria recorrer à inspecção visual, aliás um método ainda bastante utilizado na indústria alimentar. Isoladamente não é um bom método, porque apenas detecta os detritos maiores (Baptista, 2003), todavia associado com outros pode-se revelar bastante útil, por exemplo, quando combinado com luz ultravioleta, pode detectar detritos de pó ou de óleo em sítios pouco acessíveis.

Actualmente, as técnicas de análise microbiológica baseiam-se na colheita de amostras e respectivo processamento em laboratório, de acordo com métodos descritos em Normas Portuguesas (NP) ou Internacionais (EN, ISO, entre outros).

As amostras podem ser sólidas, líquidas, de ar ou amostras de superfícies, e os métodos, solutos, meios de cultura e diluições utilizados dependem do tipo de material colhido, da estrutura da superfície e da expectativa do tipo e nível de contaminação.

Até aos anos 80, o controlo da eficácia dos planos de higienização numa indústria alimentar era feito com recurso à microbiologia dita clássica (Easter, 2003), recolhendo amostras com zaragatoas estéreis, determinando para o efeito contagens de microrganismos a 30 °C e de *Enterobacteriaceae*, cujas diluições eram semeadas em meios de cultura específicos ou não, conforme os microrganismos avaliados. Geralmente, procuravam-se microrganismos aeróbios mesófilos e microrganismos indicadores de higiene, nomeadamente os de origem fecal.

A metodologia microbiológica clássica é, ainda hoje, considerada o “*Gold Standard*”, quando as monitorizações são requeridas em regulamentos nacionais e internacionais, constituindo os métodos oficiais de controlo (Blankenfeld-Enkvist & Brännback, 2002).

### **1.2.1 Determinação de microrganismos aeróbios totais a 30 °C e de *Enterobacteriaceae***

Através da contagem os microrganismos a 30 °C, percebe-se da contaminação presente, na amostra, uma vez que engloba a grande maioria dos microrganismos com importância na indústria, inclusive os potencialmente patogénicos de maior interesse.

Por outro lado, as *Enterobacteriaceae*, incluem um vasto leque de microrganismos, constituído por bacilos Gram negativos, aeróbios-anaeróbios facultativos, fermentadores da glucose, catalase positivos e citocromo-oxidase negativos. Os principais géneros desta família são: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Eschericia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, *Yersinia* e *Klebsiella* (Prescott *et al.*, 2005).

A presença de *Enterobacteriaceae* em alimentos processados fornece uma boa indicação de um tratamento inadequado ou de recontaminação após o processamento. A presença de *Enterobacteriaceae* nas superfícies, equipamentos e mãos dos manipuladores pode aumentar o número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) nos alimentos, se durante o armazenamento, transporte ou distribuição ocorrer um aumento de temperatura (Crowley *et al.*, 2005).

Crowley *et al.* (2005) referem que as *Enterobacteriaceae* e outros microrganismos indicadores de higiene avaliam a qualidade dos alimentos e as condições de higiene durante o processamento. No entanto, os autores ressaltam que não é seguro associar estes microrganismos indicadores a microrganismos patogénicos contaminantes dos alimentos.

De acordo com Tebbutt (2007), a contagem de *Enterobacteriaceae* e de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, providenciam adequada informação para verificar o sistema HACCP.

As técnicas clássicas de colheita e processamento de amostras são amplamente usadas na indústria. Têm a grande vantagem de permitir detectar e quantificar microrganismos específicos, mas apresentam desvantagens, como sejam não detectarem resíduos de produtos resultantes de uma má higienização, ou por outro lado o tempo que medeia entre a realização da análise e a obtenção de resultados, além da necessidade de mão-de-obra especializada para as realizar (Lelieveld *et al.*, 2005). O custo inerente a este método também constitui um factor limitante, tendo em conta que o mesmo se encontra associado ao número de amostras processadas, isto é, ao custo da realização da colheita, transporte para o laboratório, bem como do processamento de análise propriamente dita em laboratório (Tompkin, 2004). Constituem, não obstante, uma ferramenta importante, quando em presença de uma toxinfecção, ou quando se pretende implementar um programa de pesquisa e controlo de um microrganismo potencialmente patogénico específico, por exemplo, *Listeria* em superfícies.

A maioria dos protocolos de colheita de amostras em superfícies baseiam-se na técnica de Manheiner & Yheunez descrita em 1917. Esta técnica utiliza zaragatoas esterilizadas, com uma haste mais ou menos flexível e uma substância fibrosa na extremidade, mergulhada num soluto diluidor isotónico. A colheita da amostra faz-se por esfregação na superfície a testar. Os microrganismos transferidos para a zaragatoa podem ser semeados, num meio de cultura adequado, directamente ou após diluições em soluto apropriado (Lelieveld *et al.*, 2005).

O registo da data de colheita, do processamento, bem como do operador que a realizou, assim como a temperatura a que a amostra é entregue no laboratório, são dados extremamente importantes, principalmente na presença de resultados incomuns ou significativamente diferentes, pois podem auxiliar na interpretação dos mesmos.

Após incubação, a contagem das colónias desenvolvidas nos meios, fornece uma indicação sobre a abundância ou não de contaminação na superfície testada.

A recolha é feita de forma asséptica, recorrendo a um maçarico ou lamparina de álcool. As superfícies testadas podem ter diferentes áreas, e são geralmente delimitadas por placas metálicas ou de outro material esterilizável, com janelas quadrangulares.

Regra geral, a zaragatoa consegue remover os microrganismos da área em estudo, todavia, a sua remoção pode ser dificultada quando se está em presença de detritos incrustados e, particularmente de biofilmes. Nestas situações, as contagens podem ficar diminuídas e os resultados eventualmente falseados.

Geralmente, as zaragatoas para colheita das amostras encontram-se mergulhadas em soluções, neutralizantes, isotónicas e redutoras do *stress* fisiológico, cujo principal objectivo é manter a viabilidade dos microrganismos recolhidos das superfícies. O soluto neutralizante tem a função de neutralizar a presença de resíduos de detergentes ou desinfectantes que permaneçam remanescentes na superfície, mesmo após o enxaguamento. Sem o soluto neutralizante, os resíduos de detergente e de desinfectante poderiam inactivar os microrganismos, fazendo com que artificialmente o seu número fosse reduzido.

Algumas empresas adicionam substâncias surfactantes às soluções contidas nos tubos das zaragatoas, com o objectivo de reduzir a tensão superficial e melhorar a captação de microrganismos, aquando da realização da recolha da amostra. Em alguns casos, a presença de surfactante provoca um aumento do número de colónias, por desagregação de grupos de organismos, aumentando deste modo, falsamente, o número de UFC (Lelieveld *et al.*, 2005).

Idealmente, as zaragatoas deverão ser processadas logo após a recolha da amostra, contudo essa situação nem sempre é possível, especialmente se a colheita é realizada longe do laboratório. Então, as zaragatoas têm que ser transportadas a temperaturas inferiores a 5 °C, mas sem permitir a sua congelação. Esta condição faz com que as diferenças microbiológicas sejam mínimas, quando comparadas com zaragatoas que são processadas logo após a colheita (Lelieveld *et al.*, 2005).

Em qualquer indústria alimentar, é fundamental a resposta rápida das análises efectuadas a determinado produto, equipamento ou superfície, uma vez que a presença de contaminação microbiológica pode implicar a perda de produto ou mesmo um problema de saúde pública, com todos os custos que isso implica.

Já quando se trata de indústria onde existem planos de HACCP implementados, a questão agudiza-se, porque na monitorização de Pontos Críticos de Controlo, de um fluxograma, são muitas vezes necessários resultados quase imediatos, para que possam ser reproduzidas acções correctivas em tempo útil.

As desvantagens apontadas anteriormente à análise microbiológica clássica, particularmente no que se refere ao tempo de resposta são factores muito importantes nestes casos, o que terá a na base, entre outros factores, da procura de um método microbiológico de resultados mais expeditos.

Os principais objectivos dos métodos rápidos são contribuir para aumentar a eficiência dos laboratórios, simplificar o trabalho, aumentar a capacidade analítica e reduzir os custos (Hygiene, n.d.; Easter, 2003), o que permitiu o crescimento acelerado do mercado dos métodos rápidos.

Entre os vários testes propostos, referem-se o teste de detecção de ATP por bioluminescência e o teste de detecção de proteína.

### **1.3 Teste de detecção de ATP por Bioluminescência**

O ATP, importante fonte de energia intracelular, está presente em todos os seres vivos; sendo usado em diversas funções celulares, desempenha um papel importante na troca de energia nos sistemas biológicos, servindo como dador de energia.

Resíduos de produtos alimentares, contêm elevada quantidade de ATP; as células microbianas também contêm ATP; após higienização de equipamentos e superfícies de contacto com produtos alimentares, a quantidade de ATP deverá ser reduzida.

A descrição bioquímica da reacção de bioluminescência foi feita em 1940, e a determinação de ATP usando o sistema luciferina/luciferase foi descrito em 1949 (Hawronskyj & Holah, 1997; Patel, 1994). Contudo, o desenvolvimento e aplicação de métodos baseados na detecção de ATP, teve início nos anos 80, com a empresa Lumac (Easter, 2003); nessa altura, a medição de ATP por bioluminescência, destinava-se à detecção de microrganismos nos alimentos e monitorização da higiene, um indicador rápido do nível de material biológico presente em superfícies e em líquidos, principalmente nos sistemas aeroespaciais da NASA (National Aeronautics and Space Administration).

Estes testes dispensam a sementeira e cultura em meios apropriados e os resultados surgem em segundos ou minutos, contrariamente a horas ou dias como acontece com as metodologias clássicas. Pode considerar-se que representam a verdadeira inspecção ao processo de higienização, porque para além dos microrganismos detectam também resíduos de alimentos, resultantes de uma higienização deficiente.

Estes resíduos, podem potenciar o desenvolvimento de microrganismos presentes se as condições ambientais forem propícias, em termos de tempo e temperatura, além de

poderem ser origem de contaminação cruzada de outros alimentos e nalguns casos, alergias alimentares (Patel, 1994; Lelieveld *et al.*, 2005).

A ATPmetria é um método que detecta baixos níveis de contaminação (Redsven *et al.*, 2007), e por isso pode ser utilizada, em todos os locais onde se processam alimentos, sejam hospitais, restaurantes, supermercados ou indústrias diversas, locais onde a rápida avaliação de contaminação e do nível higiénico das superfícies e água tem elevado interesse, uma vez que contribui para a produção de alimentos seguros, de qualidade e reduz os custos inerentes à deterioração de alimentos.

É uma técnica amplamente utilizada, todavia a interpretação do que se avalia nem sempre é simples. Simm, Andrade, Mendonça, Passos & Chaves (2006) realizaram um estudo de ATPmetria, com substâncias orgânicas vulgarmente detectadas em indústrias alimentares, em superfícies de aço inoxidável, nomeadamente  $\alpha$ -caseína (3,5; 7,0 e 11,0 mg/ml) representando proteínas, sacarose (0,6; 1,2 e 11,0 mg/ml) representando os açúcares e banha de porco (7,0; 14,0 e 21,0 mg/ml) representando as gorduras. Estas concentrações foram determinadas em ensaios práticos, e representam os valores destes compostos, determinados nas referidas superfícies após finalizada a higienização. O mesmo estudo, incluiu também concentrações de *Staphilococcus carnosus* ( $5,4 \times 10^9$  e  $5,4 \times 10^4$  CDM/ml) e *Bacillus subtilis* ( $2,9 \times 10^7$  e  $2,9 \times 10^3$  CDM/ml), bactérias obtidas por contagem directa ao microscópio (CDM).

O estudo mostrou que as soluções contendo substâncias orgânicas isoladas ou associadas entre si ou com esporos de *Bacillus subtilis* forneciam resultados considerados satisfatórios, ainda que ressalvando a importância dos resultados falso negativos, porque a concentração de ATP do espora bacteriano é 10000 vezes menor que a própria bactéria.

Suspensões de *Staphilococcus carnosus* associados às substâncias orgânicas ou isoladamente, forneceram resultados insatisfatórios. Os seus autores concluem que esta técnica pode ser usada para monitorização da higiene, desde que associada com outros métodos como a contagem microbiana.

A bioluminescência é um fenómeno amplamente observado na natureza, ocorrendo nas profundezas dos oceanos, em alguns insectos, bactéria, fungos e numa variedade de outros organismos (Patel, 1994; Liu, Vico & Lindh, 2008).

A bioluminescência, (do grego *bios* “vivo” e do latim *lumen* “luz”) é a luz produzida num sistema biológico, com uma taxa de eficiência de 96% (Rocha, 2007).

O fenómeno de luminescência ocorre (Fig. 1) quando uma molécula excitada pela absorção de energia, proveniente de uma reacção química, retoma ao seu estado inicial com emissão luminosa. Nestas reacções os substratos são de origem biológica, as enzimas luciferases (oxigenases), utilizam o oxigénio molecular para oxidar o substrato (luciferina), traduzindo-se esta reacção pela emissão de um fotão por cada molécula de ATP (Liu *et al.*, 2008).

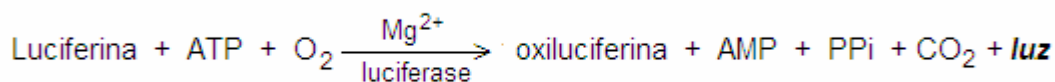


Figura 1 – Reacção de detecção de ATP por bioluminescência (Adaptado de: Liu, Vico & Lindh, 2008).

A medição do ATP por bioluminescência requer usualmente a amostragem de uma área com, aproximadamente, 100 cm<sup>2</sup> (Moore & Griffith, 2002b; Hygiene, n.d.).

A luz emitida tem características muito precisas em termos de cor, intensidade e polarização e a sua quantidade é proporcional ao valor total de ATP na superfície e, por conseguinte, à sua limpeza (Rocha, 2007). A quantidade de ATP no interior das células varia com o tipo de célula, e com a fase da curva de crescimento em que se encontra (células em stress ou na fase estacionária de crescimento contêm menor quantidade de ATP).

O complexo luciferina-luciferase (a luciferase pode ser obtida do pirilampo Americano, *Photinus pyralis*), converte a energia química associada ao ATP em luz, numa reacção em que há proporção molar, ou seja, um fóton de luz é produzido pela hidrólise de uma molécula de ATP. Os reagentes estão formulados de forma que haja emissão de uma luz verde amarelada. A luz emitida é medida em relative light units (RLU) (Hawronskyj & Holah, 1997; Aycicek, Oguz & Karci, 2006).

As leituras obtidas deverão ser comparadas com as leituras padrão, determinando se uma superfície se encontra limpa ou não. Em poucos minutos, esta técnica permite afirmar se a superfície em estudo se encontra ou não apta para entrar em contacto com alimentos.

A formulação química dos reagentes varia com a marca do aparelho, contudo, todos contêm o complexo luciferina-luciferase, iões de magnésio, solução tampão e extractores (para remover o ATP das células vivas). Variam quanto ao prazo de validade, uma vez que o mesmo está relacionado com a sua composição assim como com a temperatura de armazenamento (Lelieveld *et al.*, 2005).

A reacção é catalisada pela enzima luciferase, a qual utiliza a energia contida numa molécula de ATP (rica em energia), conduzindo à descarboxilação oxidativa da luciferina, cujo resultado é a produção de luz, com um pico de ocorrência aos 0,3 segundos (Patel, 1994).

A actuação óptima das enzimas luciferases está condicionada a certas condições: pH 7,75 e temperatura entre 20-22 °C (Hawronskyj & Holah, 1997; Niza Ribeiro, Cerqueira, Santos & Louzã, 2002). Alterações de pH, temperatura, presença de iões metálicos (Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> e Hg<sup>2+</sup>), podem reduzir a luz emitida ou detectada (Patel, 1994).

Algumas indústrias reclamam um teste que se mantenha estável à temperatura ambiente, contudo essa varia consideravelmente em função do clima, o que obrigaria as indústrias produtoras destes aparelhos e das zaragatoas a produzirem diferentes produtos de acordo com a amplitude térmica do país (Lelieveld *et al.*, 2005).

O valor de ATP varia consideravelmente de acordo com o género alimentício em presença. Alguns alimentos frescos, como tomate, apresentam valores elevados, enquanto outros alimentos, especialmente os muito processados, ricos em gordura, óleo ou açúcar, mostram valores de ATP muito baixos (Lelieveld *et al.*, 2005).

Na produção de leite em pó, ou na mistura de farinhas e de açúcares, os procedimentos de limpeza não removem todos os detritos, pelo que, nestes casos, não é possível utilizar a técnica de detecção de ATP por bioluminescência.

Os detergentes usados na limpeza, podem provocar uma diminuição ou aumento dos indícios de ATP. Por este motivo, é desejável, para haver consistência nos resultados, garantir que os agentes de limpeza, são removidos por enxaguamento, antes de o teste ser executado. Contudo, para reduzir ao máximo essa interferência, muitos *kits* comerciais contêm na sua constituição substâncias neutralizantes como a lecitina, *tween* 80 ou a ciclodextrina (Forsythe, 2002; Lelieveld *et al.*, 2005).

De acordo com Costa, Andrade, Brandão, Passos & Soares (2006), o hidróxido de sódio, utilizado na higienização da indústria de lacticínios não interfere com a detecção de ATP por bioluminescência. Esta opinião é contrária à de outros autores que comprovaram a acção inibitória dos sais de sódio sobre a luciferina (Rodionova & Petushkov, 2006).

A repetibilidade e confiança dos instrumentos e dos seus testes podem variar consideravelmente de acordo com os fabricantes, mas regra geral são superiores aos testes realizados recorrendo à microbiologia clássica com recurso ao uso de zaragatoas (Lelieveld *et al.*, 2005).

A sensibilidade dos instrumentos disponíveis, bem como dos seus testes é variável, e tem sido discutido qual o limite de sensibilidade adequado aos testes. A resposta a essa questão prende-se com o facto de cada teste, numa indústria, ter a capacidade de distinguir entre uma superfície eficientemente limpa de uma ineficientemente limpa.

Os testes altamente sensíveis são mais adequados quando, por exemplo, se pesquisam microrganismos potencialmente patogénicos, ou em situações em que é difícil distinguir se uma superfície está efectivamente limpa ou não.

Contudo, alguns estudos referem que a técnica de detecção de ATP por bioluminescência apenas detecta microrganismos quando a sua contagem for superior a  $10^3$  ou  $10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>, enquanto que outros se referem a 100 cm<sup>2</sup> ou à zaragatoa, o que mostra que não há unanimidade de opiniões de autores, e parece ser uma limitação do método, quando comparado com os métodos tradicionais que conseguem detectar <10 UFC/cm<sup>2</sup> (Patel, 1994; Bóer & Beuner, 1999; Moore & Griffith, 2002a; Larson *et al.*, 2003).

A ATPmetria pode ainda ser adaptada num teste para determinação de resíduos de substâncias alergénicas, sendo para tal necessário que detecte entre 0,1 e 5 ppm (partes por milhão) de alergénios em resíduos de alimentos (Lelieveld *et al.*, 2005).

A dimensão dos primeiros luminómetros condicionava-os ao uso exclusivo em laboratório; os seus reagentes eram fornecidos sob a forma de pó liofilizado, em frascos contendo 25 ou 50 testes e após re-hidratação duravam apenas 1 a 2 dias, o que os tornava muito dispendiosos. O seu manuseamento apenas podia ser realizado por um analista especializado (Easter, 2003).

Actualmente, os luminómetros possuem um tamanho reduzido, o que possibilita o seu transporte, facilitando desta forma a sua utilização quer em laboratório quer fora deste, por exemplo na própria área de produção. Adquiriram desta forma uma dupla vantagem – por um lado as amostras podem ser imediatamente lidas, minimizando a possibilidade de alteração dos resultados, por outro lado, os responsáveis pela higienização da fábrica verificam se esta foi realizada de forma eficaz ou não (Easter, 2003).

Alguns luminómetros, mais recentes, podem ser ligados a um computador ou directamente a uma impressora. Os valores das leituras são transferidos para um programa de software apropriado, permitindo a percepção dos locais onde a higienização está a ser bem ou mal realizada (Lelieveld *et al.*, 2005).

Os programas informáticos associados a este tipo de instrumentos, facilitam a identificação das amostras e armazenam informação para posterior análise. Futuramente, pretendem-se luminómetros verdadeiramente portáteis (do tamanho da palma da mão), sem que isso implique uma diminuição da capacidade de realização (performance) dos testes, ou aumento do custo do aparelho (Lelieveld *et al.*, 2005).

Os dispositivos de amostragem e respectivos reagentes, bem como as embalagens têm igualmente evoluído; os reagentes encontram-se em compartimentos separados nas zaragatoas de colheita, facilitando a realização da técnica e diminuindo os custos. Para activar os reagentes segura-se com firmeza o tubo contendo a zaragatoa e usa-se o polegar e o indicador para quebrar a válvula. Agita-se levemente durante 5 a 10 segundos e o dispositivo está pronto para ser colocado no luminómetro e realizada a leitura, até 1 minuto após a sua activação.

A extremidade da zaragatoa de colheita encontra-se acima do nível de leitura, para eliminar interferências, aquando da leitura no luminómetro.

A empresa fornecedora dos luminómetros e respectivas zaragatoas faculta valores recomendados em RLU para cada superfície, determinados com base em métodos clássicos de microbiologia, relacionando-os com as leituras de ATP. Contudo, quem realiza os testes também pode estabelecer os seus limites com base na média e desvio padrão dos resultados da sua amostragem. Assim, um resultado está inserido na categoria conforme, quando o seu valor é menor ou igual à média dos resultados; na categoria cautela, quando é

superior à média mas inferior ou igual à média adicionada ao desvio padrão; na categoria não conforme quando o valor é superior à média adicionada ao desvio padrão (Higiene, n.d.). Quando se estabelecerem limites utilizando estas ferramentas, é fundamental analisar os resultados e, se necessário, recalculá-los, pelo menos uma vez por ano, ou sempre que o programa de higiene ou alguns dos seus procedimentos seja alterado, de forma a otimizar os resultados e obter uma melhoria contínua dos padrões.

Os dispositivos de amostragem, quando armazenados refrigerados entre 2 °C e 8 °C têm uma validade de cerca de 12 meses, mas se estiverem armazenados entre 8 °C e 25 °C duram apenas 6 semanas. Os dispositivos de amostragem devem manter-se à temperatura ambiente durante 2-5 minutos antes da utilização (Easter, 2003; Higiene, n.d.).

As principais vantagens de ATPmetria são a rapidez, o baixo nível de detecção, inclusão de todos os tipos de microrganismos activos, fácil interpretação dos resultados, automatização e análise local; a principal desvantagem é a não indicação da presença de microrganismos potencialmente patogénicos nas superfícies (Hawronskyj & Holah, 1997; Rocha, 2007).

O teste ideal deveria detectar microrganismos e resíduos alimentares com sensibilidade suficiente, a sua eficácia deveria ser semelhante quando realizado sobre superfícies secas ou húmidas, deveria ter boa repetibilidade e reprodutibilidade, deveria ser fácil de manusear, pouco dispendioso, rápido, resistente e deveria possibilitar o armazenamento dos dados (Lelieveld *et al.*, 2005).

Larson *et al.* (2003) estabeleceram uma correlação significativa entre contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C e os valores provenientes das leituras de ATP, em superfícies de diversos locais existentes em casas particulares.

Os testes alternativos ditos rápidos, deverão ser encarados como um complemento à microbiologia clássica, num sistema integrado de controlo da qualidade, especialmente quando se pretende estabelecer a relação entre a contaminação microbiana e risco de doença infectante (Larson *et al.*, 2003; Aycicek *et al.*, 2006).

#### **1.4 Métodos de detecção de proteína, fosfatos e hidratos de carbono**

Além do desenvolvimento e aplicação do teste de detecção de ATP por bioluminescência, como meio de monitorizar a limpeza, foram desenvolvidos outros testes para detectar componentes de resíduos alimentares e avaliar a eficácia da higiene.

Com o teste de detecção de proteína pretendia-se desenvolver um teste independente de instrumentos, cromogénio, barato, simples e funcional, extensível a

resíduos químicos, incluindo proteínas, açúcares redutores,  $\text{NAD}^+$  (nicotinamida adenina dinucleótido) e fosfatos, individualmente ou combinados.

De acordo com os seus fabricantes, são apropriados para grandes e pequenas indústrias de géneros alimentícios, assim como restaurantes e mercados, entre outros (Easter, 2003).

Os testes conduzem, usualmente, à produção de uma cor única ou de uma sequência de cores. Após um tempo determinado, entre 1 a 10 minutos, a alteração visual da cor pode ser avaliada qualitativamente. A subjectividade do teste aumenta consideravelmente quando é utilizado em superfícies moderadamente sujas; a subjectividade diminui em superfícies muito limpas ou muito sujas (Lelieveld *et al.*, 2005).

Alguns testes têm o formato de zaragatoas, outros apresentam-se sob a forma de tiras de plástico ou almofadas de material absorvente impregnado com os reagentes apropriados.

De acordo com Griffith, Cooper, Gilmore, Davies & Lewis (2000), testes independentes do uso de instrumentos e economicamente acessíveis podem ser utilizados em estabelecimentos de produção de alimentos, muitas vezes criticados pela baixa sensibilidade para a monitorização de higiene.

Em ensaios alternativos ao uso do ATP, os métodos que detectam proteína possuem grande potencial, quando se trata de resíduos de alimentos resultantes, por exemplo, de carne de aves, bovinos ou suínos ou de produtos lácteos, devido ao seu elevado conteúdo em proteína. De notar, no entanto que, em testes realizados a alguns alimentos não proteicos, se verificou a redução dos componentes da reacção do biureto, e consequente mudança de cor, o que representa afinal, também, ausência de limpeza (Lelieveld *et al.*, 2005).

A maior parte dos testes que se baseiam na detecção de proteína, utilizam a reacção do Biureto (Fig. 2).

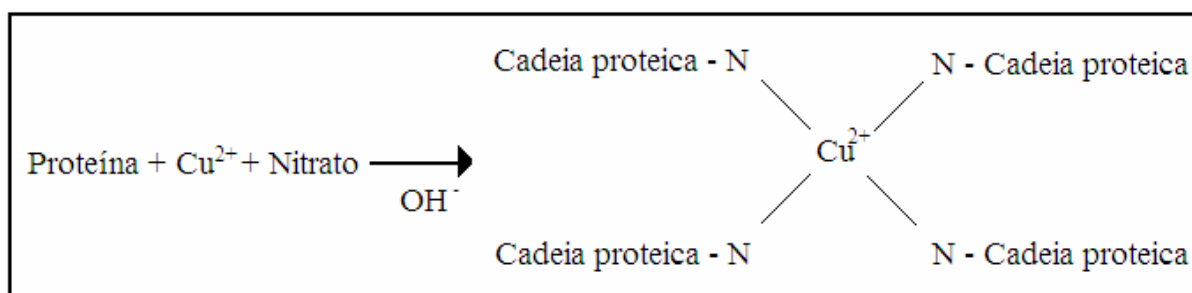


Figura 2 – Reacção do biureto para detecção de proteína (Adaptado de: Forsythe, 2002 ).

Assim, sob condições alcalinas, as ligações peptídicas das proteínas formam um complexo com o Cobre II ( $\text{Cu}^{2+}$ ) do reagente biureto.

Esta reacção, adicionada de ácido bicinchonínico (bicinchoninic acid – BCA), produz uma intensa cor roxa. Neste teste, a palavra de ordem usada deverá ser “if it’s green it’s

clean” – “se está verde, está limpo”. A cor verde significa limpo, os resultados mais pretendidos; cor cinzenta indica resultado medíocre, deve voltar-se a enxaguar ou a higienizar ou a repetir o teste; cor roxa é sinónimo de resultado negativo, tem que se voltar a higienizar (Lelieveld *et al.*, 2005).

Desinfectantes em concentrações normais não causam interferência ou falsos positivos; em alguns casos elevadas concentrações de produtos alcalinos podem originar resultados falso-negativos, enquanto que desinfectantes à base de peróxidos podem causar uma reacção de mudança de cor com resultado falso positivo (Hygiena, n.d.).

É boa prática aguardar um período de tempo adequado após a limpeza, antes de se realizar a análise à superfície. É importante, em qualquer programa de colheita de amostras, estabelecer um procedimento de amostragem consistente e fácil de reproduzir.

Para assegurar melhores resultados, a colheita deverá ser feita após a limpeza com o detergente ou após enxaguamento, mas antes da desinfecção final. A presença de resíduos na superfície após a limpeza com detergente reduz a eficácia do desinfectante, por este motivo a realização do teste nesta fase previne desperdícios de tempo e de produtos químicos.

O teste não foi concebido como ferramenta de detecção microbiológica, mas se existirem mais de  $10^7$  UFC a coloração do teste altera-se como quando na presença de proteína (Hygiena, n.d.).

O armazenamento a temperatura entre 2 e 25 °C permite uma validade de 12 meses. Entre 26 e 35 °C, a sua validade é significativamente reduzida para 2 semanas. Em situação alguma se deve congelar os testes (Hygiena, n.d.).

As zaragatoas devem ser mantidas à temperatura ambiente uns minutos antes da sua utilização, o que aumenta a rapidez da reacção e aumenta a sensibilidade. A título de exemplo, quando as zaragatoas estão à temperatura ambiente (15 – 25 °C) têm capacidade de detectar 500 µg/100 µl, enquanto as mantidas a temperaturas superiores (37 °C), nas mesmas condições, apenas conseguem detectar 100 µg/100 µl (Hygiena, n.d.).

Sendo um teste semi-quantitativo, dá uma ideia aproximada da concentração de proteína presente. Quando a cor obtida é verde, a concentração varia entre 0-30 µg/100 µl de proteína; cinzento corresponde a uma concentração de proteína entre 50-80 µg/100 µl e roxo corresponde a uma concentração superior a 100 µg/100 µl proteína (Hygiena, n.d.).

Trata-se de uma técnica mais rápida do que as de microbiologia tradicional, mais barata que a bioluminescência por ATP, mas, dependendo do tipo de alimento analisado, ao mesmo tempo, menos sensível do que esta (Forsythe, 2002; Lelieveld *et al.*, 2005).

A intensidade da cor e a rapidez da sua produção funcionam como indicadores do nível de sujidade, se bem que os resultados são usualmente fornecidos em termos de limpo ou não limpo.

Curiosamente, a técnica de detecção de proteínas serviu de base, segundo Lipscomb, Pinchin, Collin, Harris & Keevil (2006), para o desenvolvimento de uma nova técnica de epifluorescência utilizando um corante fluorescente, designada comercialmente por SYPRO Ruby. Detecta proteínas e príons, especialmente em instrumentos cirúrgicos, os quais, segundo os mesmos autores, são muitas vezes responsáveis por infecções nosocomiais, muitas das quais com desfecho fatal.

O NAD<sup>+</sup> e compostos semelhantes são resíduos químicos, extensamente distribuídos no material biológico, incluindo nos alimentos e nos microrganismos. Desta forma, o nível de NAD<sup>+</sup> em superfícies, fornece informação relativa à sujidade orgânica. É detectado numa reacção química que conduz uma reacção visível, com cores que alteram gradualmente de amarelo a roxo numa escala de 0 – 6, em 5 minutos (Lelieveld *et al.*, 2005).

Nos *kits* de detecção de resíduos químicos, a ausência de reacção positiva não implica, necessariamente, ausência de microrganismos. Estes testes podem ser mais ou menos sensíveis, e é importante testá-los e ter em conta o tipo de alimento produzido.

Outros testes baseados em zaragatoas, podem ser usados para detectar glucose ou lactose, este último com efeito prático na indústria dos lacticínios. Os resultados são obtidos em 60 segundos. Devido à coloração resultante da reacção, os resultados devem ser lidos, “if it turns green it isn’t clean” – “se se torna verde não está limpo”, o que pode causar alguma confusão com os resultados dos testes da proteína.

Na maior parte dos casos, é um teste menos sensível do que o teste do ATP, mas considerado para alguns resíduos de alimentos como razoável, e rápido para um teste não baseado em instrumentos (Lelieveld *et al.*, 2005).

Outra opção é um teste de fitas, contendo enzimas que detectam fosfatos e hidratos de carbono. Por acção da capilaridade as fitas “absorvem” resíduos de alimentos de superfícies molhadas com os reagentes do teste. Quando as tiras do teste já estão suficientemente molhadas adquirem tom cinzento-escuro; em presença de resíduos de alimentos, a sua cor altera-se para roxo em 120 segundos. As vantagens deste teste, quando comparado com testes recorrendo a zaragatoas, prende-se com a sua simplicidade, baixo custo de produção e transporte. Pode também ser utilizado para monitorização da higiene das mãos (Lelieveld *et al.*, 2005).

Estes testes são menos sensíveis do que o de leitura ATP por bioluminescência, mas facultam um teste simples e semi-quantitativo, para avaliação de higiene fabril.

Estes métodos não têm necessariamente que substituir os tradicionais, utilizando meios de cultura. Têm, antes, que ser vistos como uma informação adicional ao programa de segurança alimentar, adquirida num curto espaço de tempo, facilitando desta forma uma acção correctiva imediata, optimizando o processo e reduzindo os custos associados a alimentos alterados.

## 2. Materiais e Métodos

O objectivo deste estudo foi tentar obter algum tipo de relação entre os resultados obtidos pelas contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C e de *Enterobacteriaceae* e os resultados obtidos através de detecção de ATP por bioluminescência e de detecção de proteína, tendo em vista, adoptar um dos métodos ditos rápidos, na verificação da eficácia do plano de higienização implementado.

O estudo foi realizado numa sala de acesso restrito, mantida a 12 °C, onde se fatiam produtos transformados à base de carne, prontos a consumir, acondicionados em atmosfera protectora, nomeadamente presunto, fiambre, toucinho fumado, paio, mortadela e fiambre de frango.

Utilizaram-se no estudo duas das três fatiadoras existentes na sala. Na fatiadora número 1, fatiam-se, maioritariamente, produtos de marca própria, pelo que durante o dia se verifica pouca alternância de produtos. Na fatiadora número 3, fatiam-se produtos de diferentes marcas, logo, ao longo do dia, fatiam-se uma grande heterogeneidade de produtos.

Foram efectuadas 48 recolhas para cada tipo de análise, divididas entre as 2 máquinas de fatiar; em cada máquina colhiam-se amostras na lâmina (local 1) e no tapete - tela transportadora (local 2). Desta forma, na máquina 1 colheram-se 11 amostras de cada local e na máquina 3, 13 amostras, igualmente de cada local.

Em cada máquina trabalha um grupo de 4 a 5 pessoas, constante, salvo raras excepções, responsável pelas operações de fabrico e limpeza. Cada funcionário usa equipamento de protecção individual, constituído por calças e túnica brancas, botas de borracha branca, touca, luvas, máscaras, aventais e manguitos descartáveis, colocados apenas no momento de entrada na sala de fatiados. O acesso a esta sala está condicionado por uma desinfectação das mãos, por meio de um sensor automático, que ao mesmo tempo abre automaticamente a porta.

Os ensaios realizados nas máquinas 1 e 3, ocorreram durante a higienização intermédia, ou seja, entre o fim de fatiagem de um produto e o início da de outro, excepto um caso, em ambas as máquinas que ocorreu no início da laboração, ou seja, a higienização foi realizada no dia anterior.

Na máquina 1, 5 ensaios após terminar a fatiagem do presunto e antes de iniciada a do fiambre; 2 quando terminou a fatiagem do fiambre e se iniciou a da mortadela; outros 2 na passagem de toucinho fumado a fiambre; 1 de paio para fiambre e 1 no início da laboração, ou seja, a higienização tinha sido realizada no dia anterior.

Na máquina 3, 3 amostras foram recolhidas na mudança da fatiagem do presunto para fiambre; 2 de fiambre de frango para fiambre; 2 de chourição para fiambre; 1 de paio

para fiambre; 1 de fiambre para paio; 1 de paio para presunto; 1 de fiambre para presunto; 1 de presunto para paio; 1 no início da laboração, ou seja, a higienização tinha sido realizada no dia anterior.

Ao estabelecer um programa de colheitas de amostras, deve determinar-se quem, como e quando as amostras são colhidas, de acordo com o tipo de fabrico. Neste estudo, as amostras foram colhidas de forma asséptica, após higienização da respectiva máquina de acordo com o plano implementado (Anexos I, II e III). Todas as colheitas foram realizadas pela mesma pessoa, de forma a diminuir interferências resultantes da colheita, opinião apoiada por Niza Ribeiro, Cerqueira, Santos & Louzã (2002), que referem que os operadores são uma importante fonte de variação, que pode ser controlada através de programas específicos.

Neste contexto, colheram-se amostras destinadas a análises microbiológicas clássicas, à detecção de ATP por bioluminescência e à detecção de proteína (teste PRO-Clean); em simultâneo, realizou-se inspecção visual dos locais de colheitas.

As amostras foram recolhidas na lâmina da fatiadora, montada na respectiva máquina, (Fig. 3 e 5) pronta a iniciar a laboração e no tapete transportador (Fig. 4 e 6) que conduz os produtos já fatiados até às “*cuvettes*” de plástico que serviram de embalagem.

A escolha dos locais baseou-se na análise dos resultados de controlos realizados anteriormente e apenas aos planos de higienização implementados na indústria. Nesses controlos, nos quais se tinham utilizado placas de contacto, os resultados mostravam que as lâminas, maioritariamente, fornecem valores conformes, contrariamente ao tapete, cujos resultados eram, quase sempre, não conformes. Escolheram-se, então, duas máquinas com volume e variedade de trabalho diferentes e dois locais, um pouco problemático e outro muito problemático, de acordo com os resultados previamente obtidos das placas de contacto.

Esta escolha vai de encontro à opinião de Tompkin (2004), que considera que a escolha dos sítios de amostragem deverá basear-se em experiência prévia; contudo, em alimentos prontos a consumir, deverá ser realizada no local imediatamente anterior à embalagem e a montante deste.

Os valores de ATP, apresentados em RLU, foram medidos num luminómetro com elevada sensibilidade (até 1 femtomole ATP) e boa reprodutibilidade 8 – 18 % (tendo em conta este tipo de teste), leve e de dimensões reduzidas (260 gramas e 17 x 7 x 3 cm) o que facilita o seu transporte e manuseamento.

Os resultados são obtidos após 45 segundos; antes de cada leitura foi realizada sempre a auto-calibração para evitar qualquer interferência decorrente da sua não realização, no que se dispensam 15 segundos dos 45 segundos anteriormente contabilizados. As leituras foram realizadas na própria sala de fatiados.

O teste PRO-Clean detecta resíduos de proteínas, contudo também permite a detecção de outras substâncias redutoras tais como açúcares, taninos e ácido ascórbico.

Em meio alcalino, dá-se a redução do ião  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ , alterando desta forma a tonalidade inicial da amostra (verde), alternando entre cinzento e roxo em função da quantidade de proteína ou outras substâncias redutoras, presentes.

A leitura dos resultados deve ocorrer até 10 minutos do início da reacção (reacção do biureto), excepto nos casos em que a cor altere para roxo de forma imediata.

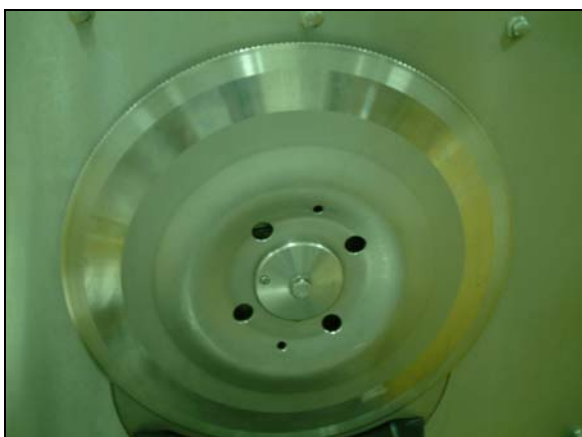


Figura 3 – Lâmina de aço inoxidável de uma das máquinas onde se efectuaram as colheitas (local 1).



Figura 4 – Tapete (tela transportadora de plástico) de uma das máquinas onde se efectuaram as colheitas (local 2).

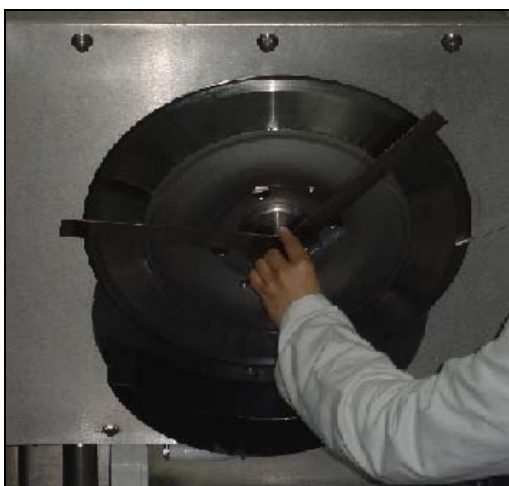


Figura 5 – Lâmina da fatiadora e placas de delimitação das superfícies de colheita de amostras.

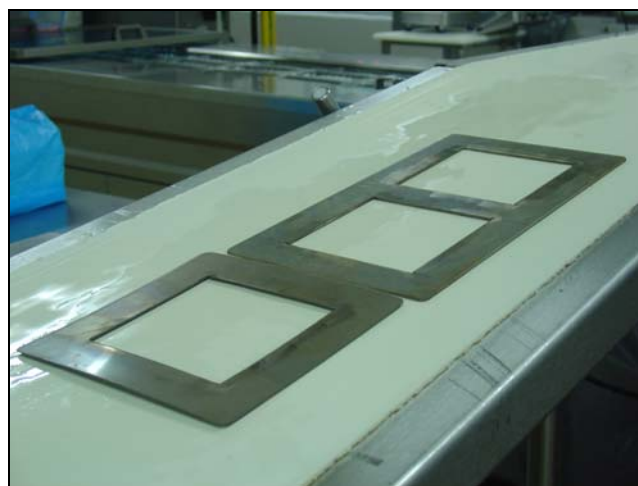


Figura 6 – Tapete transportador com placas, para delimitação das superfícies de colheita de amostras.

## **2.1 Meios de Cultura**

Os meios de cultura utilizados neste estudo foram das marcas Merck – Merck KgaA, Darmstadt, Germany (TGE-Agar – Tryptone Glucose Extract Agar) e da marca Oxoid – Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, England, (VRBGA – Violet Red Bile Glucose Agar), respectivamente para contagem de microrganismos a 30 °C e de *Enterobacteriaceae*.

A descrição e composição por litro de cada um dos, meios encontra-se referida em anexo (Anexos IV e V).

## **2.2 Preparação da solução de diluição**

Na análise microbiológica, usou-se como solução de diluição a Triptona Sal (Merck – Merck KgaA, Darmstadt, Germany), preparada a partir de 1 g de triptona e 8,5 g de NaCl, perfazendo com 1 litro de água destilada.

## **2.3 Esterilização**

Os meios de cultura e a solução de diluição foram esterilizados em autoclave a uma temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

Os tubos de ensaio, as pipetas de vidro e as placas delimitadoras de superfície foram esterilizados em estufa eléctrica à temperatura de 180 °C durante 2 horas.

## **2.4 Análises microbiológicas**

### **2.4.1 Colheita e preparação de amostras**

A colheita e preparação de amostras foram realizadas segundo a técnica descrita nas NP 1828 (1981) e NP 1829 (1982).

Da suspensão inicial obtida pela colheita asséptica, com auxílio de uma zaragatoa de transporte com soluto diluidor, numa superfície com área de 100 cm<sup>2</sup>, realizaram-se as diluições consideradas suficientes conforme a técnica descrita na Norma Portuguesa 3005 (1985), e utilizando como solução de diluição a Triptona Sal.

Utilizou-se uma placa delimitadora facilmente esterilizável, com uma área de colheita de 100 cm<sup>2</sup>.

## **2.4.2 Contagem de microrganismos a 30 °C**

Análises efectuadas segundo a técnica descrita na Norma Portuguesa 4405 (2002), pela qual se realiza a sementeira em placa e por incorporação de 1 ml de amostra, e cerca de 15 ml de meio TGE. Incubação das placas semeadas durante 72 h a 30 °C, em aerobiose. Os resultados obtidos referem-se ao número de colónias contadas em cada placa de Petri de duas diluições sucessivas, que contenham entre 15 e 150 colónias, e expressam-se em unidades formadoras de colónias por centímetro quadrado (UFC/cm<sup>2</sup>), tendo em conta o factor de diluição.

## **2.4.3 Contagem de *Enterobacteriaceae***

As determinações foram efectuadas segundo a técnica descrita na Norma Portuguesa NP 4137 (1991). Realizou-se a sementeira em profundidade e em duplicado, aplicando a técnica da dupla camada (primeiro colocou-se cerca de 15 cm<sup>2</sup> do meio apropriado sobre o inóculo e após solidificação, não ultrapassando 15 minutos, colocou-se uma nova camada fina do mesmo meio). Após solidificação incubaram-se as placas a 37 °C durante 24 horas.

A contagem realiza-se, sempre que possível, em duas placas que contenham entre 15 e 150 colónias, e expressa-se em unidades formadoras de colónias por centímetro quadrado (UFC/cm<sup>2</sup>), tendo em conta o factor de diluição.

## **2.5 Métodos rápidos**

### **2.5.1 Colheita de amostras**

Efectuadas de forma asséptica, tendo especial cuidado para não tocar com a zaragatoa em qualquer outro local que não o a analisar. Assim, a colheita da amostra foi realizada numa superfície de aproximadamente 100 cm<sup>2</sup>, de acordo com as indicações do fabricante.

### **2.5.2 Material utilizado no teste de ATP**

Luminómetro SystemSURE II e zaragatoas descartáveis Ultrsnap para SystemSURE II (Fig. 7), da marca Hygiena (Hertfordshire, United Kingdom).



Figura 7 – Luminómetro utilizado para a medição de ATP por bioluminescência e respectiva zaragatoa descartável Ultrasnap.



Figura 8 – Luminómetro utilizado para a medição de ATP por bioluminescência, preparado para efectuar medição.

### 2.5.3 Leitura do ATP por bioluminescência

As zaragatoas da amostragem devem ser mantidas à temperatura ambiente 2 a 5 minutos antes do seu uso.

Após colheita da amostra, a zaragatoa pode esperar até 4 h, antes da activação do dispositivo. Após a activação, agita-se levemente, durante 5-10 segundos e a leitura deve ser feita, dentro de 60 segundos (Fig. 8).

### 2.5.4 Material utilizado no teste de detecção de proteína

Zaragatoas descartáveis PRO-Clean (Fig. 9) da marca Hygiena (Hertfordshire, United Kingdom), baseadas no método BCA, para detecção de proteínas.



Figura 9 – Zaragatoa PRO-Clean.



Figura 10 – Zaragatoas PRO-Clean, após colheita das amostras de superfícies com diferentes quantidades de proteína.

### 2.5.5 Leitura das zaragatoas de PRO-Clean

Este teste, baseado no método BCA, varia em função da temperatura e do tempo de reacção, por isso é importante deixá-lo atingir a temperatura ambiente (15-25 °C) antes da sua utilização. Quanto maior a quantidade de proteína existente, mais rápida será a mudança de cor e a cor roxa mais intensa (Fig. 10).

Não é necessário continuar a cronometrar se a superfície está muito suja e a cor muda quase automaticamente para roxo. A mudança de cor deve ser registada dentro de 10 minutos, após os quais qualquer alteração não deve ser considerada.

### 2.6 Análise estatística

O tratamento estatístico descritivo dos resultados foi efectuado com o auxílio do programa SPSS 11.5 para Windows, para o efeito determinou-se os valores de um teste não paramétrico o teste de McNemar e do valor do coeficiente Kappa.



### 3. Resultados

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas, nos testes de detecção de ATP por bioluminescência, de detecção de proteína e na observação visual de superfícies, realizadas nas 48 amostras, estão plasmadas nos anexos VI, VII, VIII e IX.

#### 3.1 Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C

Das análises realizadas em 48 amostras, obtiveram-se como valores médios de contagens de microrganismos a 30 °C após 72 horas de incubação, expressos em Unidades Formadoras de Colônias por centímetro quadrado (UFC/cm<sup>2</sup>), os valores apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Contagens de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, nas duas máquinas e nos dois locais em estudo. Resultados referentes à análise de 48 amostras, expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

	Microrganismos aeróbios totais 30 °C	
	Média	Desvio Padrão
Máquina 1* Local 1	4,64	6,27
Máquina 1* Local 2	55,73	108,35
Máquina 3** Local 1	17,92	24,37
Máquina 3** Local 2	41,08	46,57

\*n = 11, \*\*n = 13

Os valores da lâmina da máquina 1 (local 1) foram os que tiveram uma amplitude de variação mais baixa, entre 0 UFC/cm<sup>2</sup> e 2,0 x 10 UFC/cm<sup>2</sup> (Fig. 11). O valor que mais se repetiu neste local foi 0 UFC/cm<sup>2</sup>.

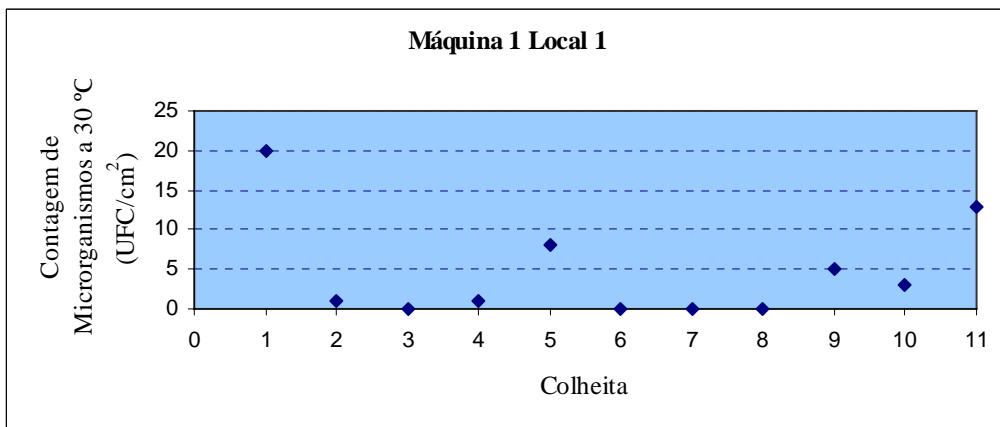


Figura 11 – Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C na lâmina (local 1) da máquina 1, nas 11 colheitas. Resultados expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

Os valores do tapete (local 2) da máquina 1 foram os que tiveram maior amplitude de variação, entre 0 UFC/cm<sup>2</sup> e 3,6 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> (Fig. 12). O valor que mais se repetiu neste local foi 0 UFC/cm<sup>2</sup>.

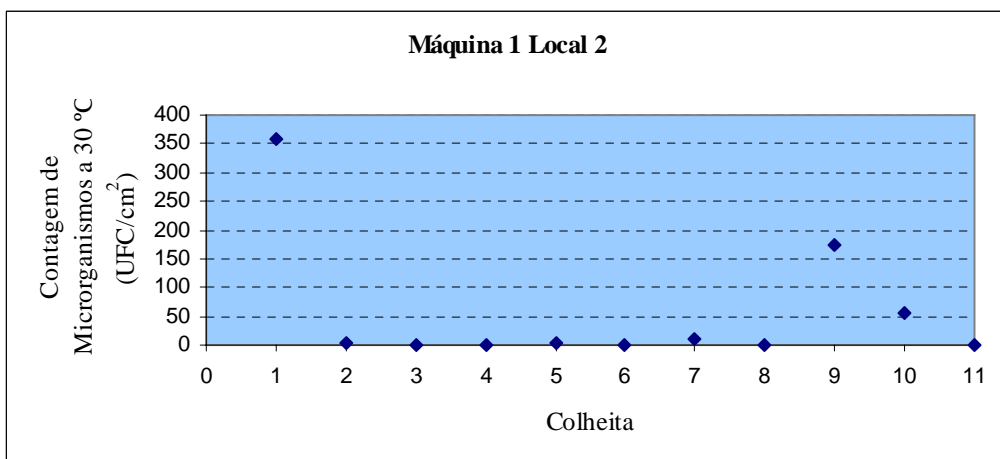


Figura 12 – Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C no tapete (local 2) da máquina 1, nas 11 colheitas. Resultados expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

Os valores da lâmina (local 1) da máquina 3, variaram no intervalo entre 0 UFC/cm<sup>2</sup> e 7,6 x 10 UFC/cm<sup>2</sup> (Fig. 13). O valor que mais se repetiu neste local foi 0 UFC/cm<sup>2</sup>.

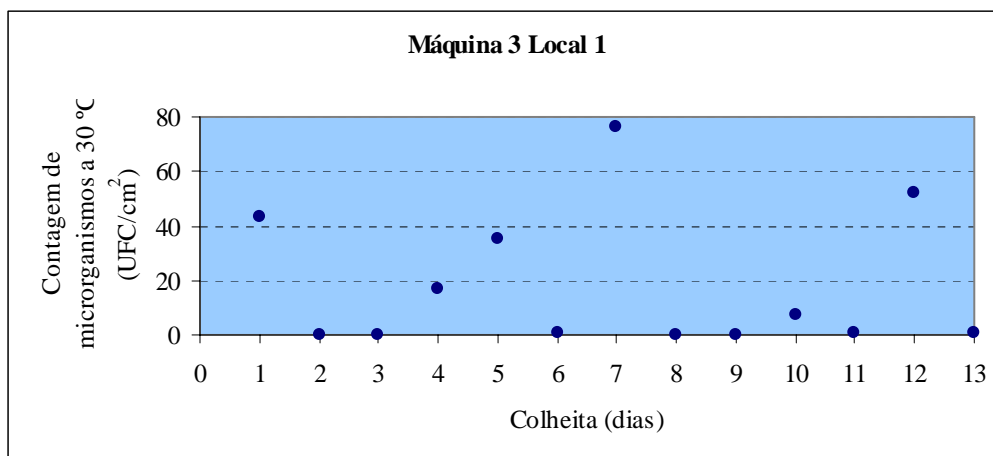


Figura 13 – Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C na lâmina (local 1) da máquina 3, nas 13 colheitas. Resultados expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

Os valores do tapete (local 2) da máquina 3, variaram entre um mínimo de 0 UFC/cm<sup>2</sup> e um máximo de  $1,5 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup> (Fig. 14). O valor que mais se repetiu neste local foi 4,0 UFC/cm<sup>2</sup>.

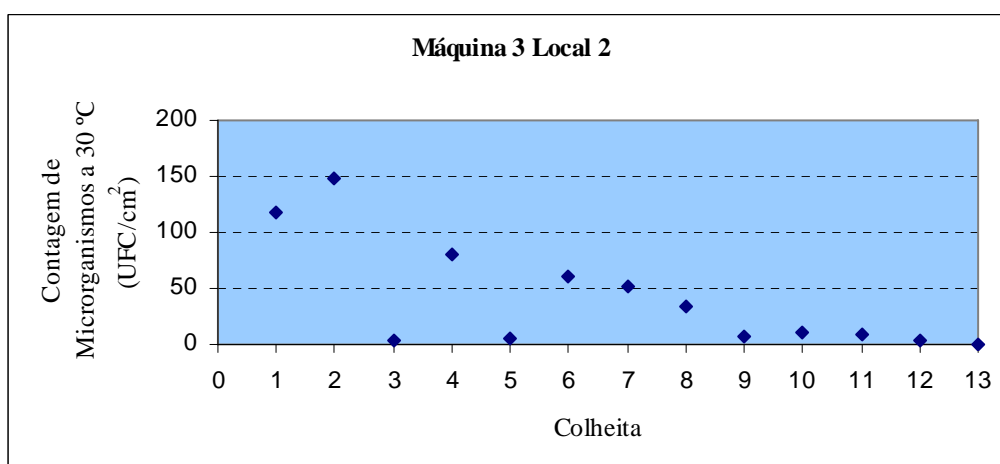


Figura 14 – Contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C no tapete (local 2) da máquina 3, nas 13 colheitas. Resultados expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

### 3.2 Contagem de *Enterobacteriaceae*

Das análises realizadas em 48 amostras, obtiveram-se como valores médios de contagens de *Enterobacteriaceae*, após 24 horas de incubação, expressos em Unidades Formadoras de Colônias por centímetro quadrado (UFC/cm<sup>2</sup>), os valores apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Contagens de *Enterobacteriaceae*, nas duas máquinas e nos dois locais em estudo. Resultados referentes à análise de 48 amostras, expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

	<i>Enterobacteriaceae</i>	
	Média	Desvio Padrão
Máquina 1* Local 1	0,00	0,00
Máquina 1* Local 2	4,00	12,65
Máquina 3** Local 1	6,69	22,90
Máquina 3** Local 2	16,00	52,30

\*n = 11, \*\*n = 13

Na lâmina (local 1) da máquina 1 não se verificaram contagens de *Enterobacteriaceae*, nos 11 ensaios realizados.

No tapete (local 2) da máquina 1, os valores variaram entre 0 UFC/cm<sup>2</sup> e 4,4 x 10 UFC/cm<sup>2</sup> (Fig. 15). Contudo, em 10 dos 11 ensaios realizados a contagem obtida foi de 0 UFC/cm<sup>2</sup>.

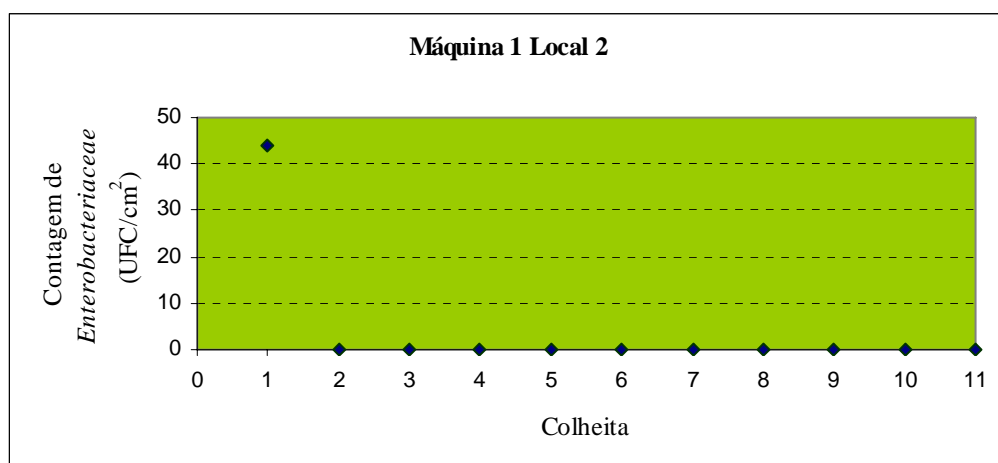


Figura 15 – Contagem de *Enterobacteriaceae* no tapete (local 2) da máquina 1, nas 11 colheitas. Resultados expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

Na lâmina (local 1) da máquina 3, os valores variaram entre 0 UFC/cm<sup>2</sup> e 8,6 x 10 UFC/cm<sup>2</sup> (Fig.16). Contudo, em 11 dos 13 ensaios realizados a contagem obtida foi de 0 UFC/cm<sup>2</sup>.

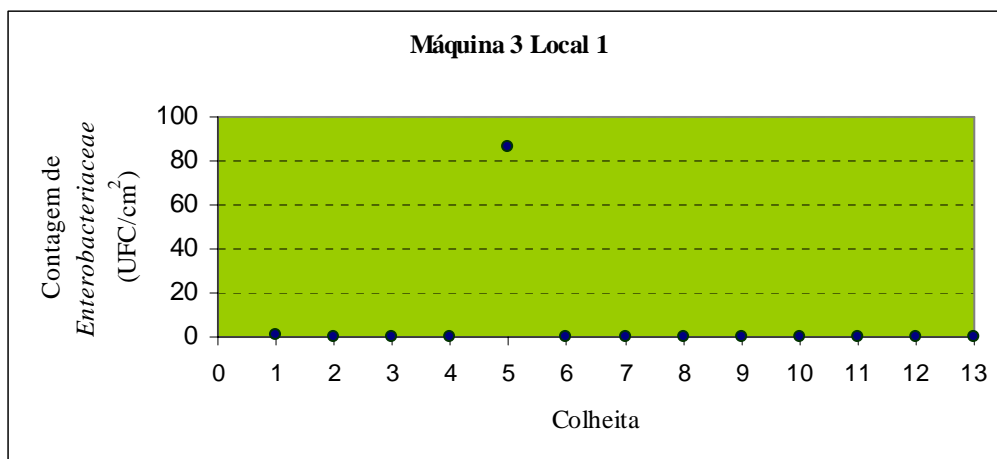


Figura 16 – Contagem de *Enterobacteriaceae* na lâmina (local 1) da máquina 3, nas 13 colheitas. Resultados expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

No tapete (local 2) da máquina 3, ocorreu a maior heterogeneidade de valores, de *Enterobacteriaceae*. Os resultados obtidos variaram dentro do intervalo de 0 UFC/cm<sup>2</sup> a 2,0 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> (Fig. 17). Em 9 dos 13 ensaios realizados não se obtiveram contagens (0 UFC/cm<sup>2</sup>).

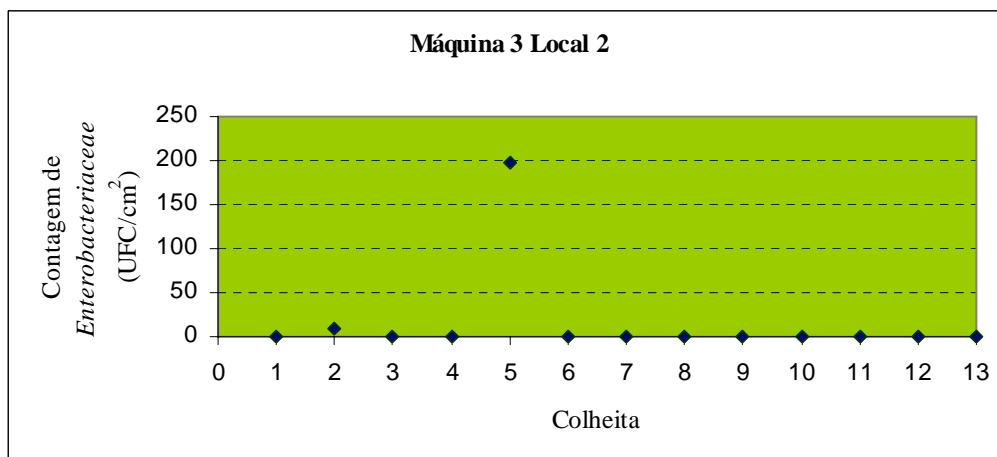


Figura 17 – Contagem de *Enterobacteriaceae* no tapete (local 2) da máquina 3, nas 13 colheitas. Resultados expressos em UFC/cm<sup>2</sup>.

### 3.3 Detecção de ATP por bioluminescência

Nas amostras colhidas do local 1 (lâmina) e do local 2 (tapete) das duas máquinas de fatiar, para medição do ATP presente, utilizando a bioluminescência, obtiveram-se as seguintes leituras, em média (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de ATP medidos por bioluminescência, nas amostras recolhidas, nas duas máquinas de fatiar e nos dois locais em estudo. Valores expressos em RLU.

	Medição de ATP	
	Média	Desvio Padrão
Máquina 1* Local 1	15,09	16,95
Máquina 1* Local 2	18,45	21,05
Máquina 3** Local 1	16,85	18,65
Máquina 3** Local 2	14,54	20,78

\*n = 11, \*\*n = 13

Dos 4 locais em estudo, a lâmina (local 1) da máquina 1, apresenta o menor intervalo de variação dos valores de ATP, entre 1 RLU e 51 RLU (Fig. 18). O valor que se repete mais vezes é o 3 RLU.

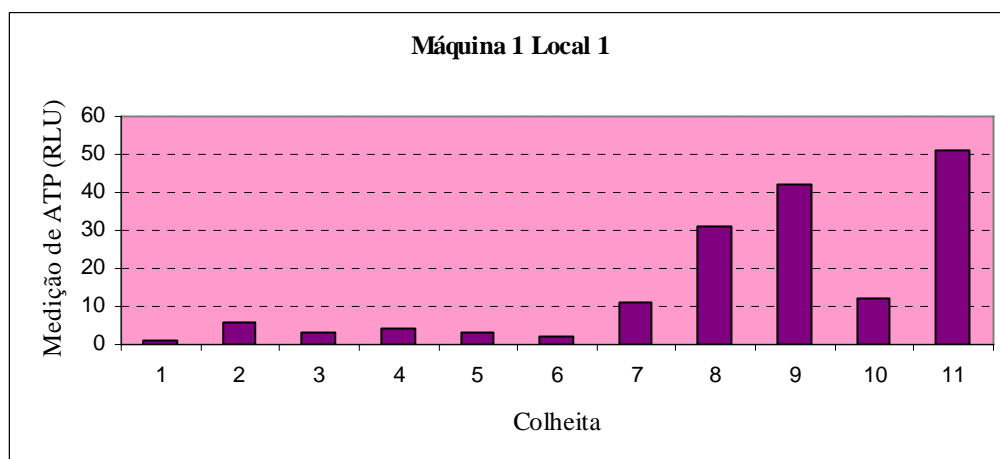


Figura 18 – Medição de ATP por bioluminescência na lâmina (local 1) da máquina 1, nas 11 colheitas. Resultados expressos em RLU.

Pelo contrário, no tapete (local 2) da máquina 1, dos 4 locais em estudo, verificou-se a maior amplitude de variação de resultados (Fig. 19). Varia entre 1 RLU e 80 RLU. O valor que se repete mais vezes é 5 RLU.

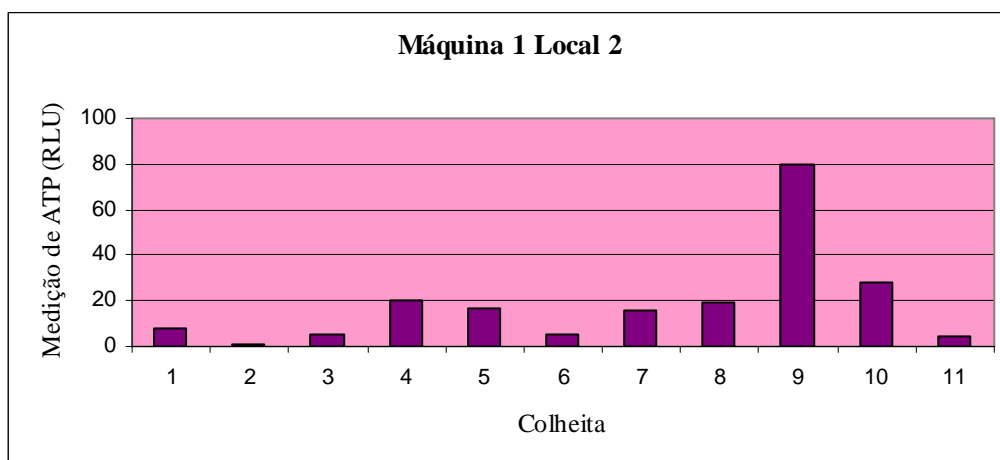


Figura 19 – Medição de ATP por bioluminescência no tapete (local 2) da máquina 1, nas 11 colheitas. Resultados expressos em RLU.

Na lâmina da máquina 3 (local 1) obteve-se um valor máximo de 77 RLU e mínimo de 3 RLU (Fig. 20), contudo, o valor que se repete mais vezes é 16 RLU.

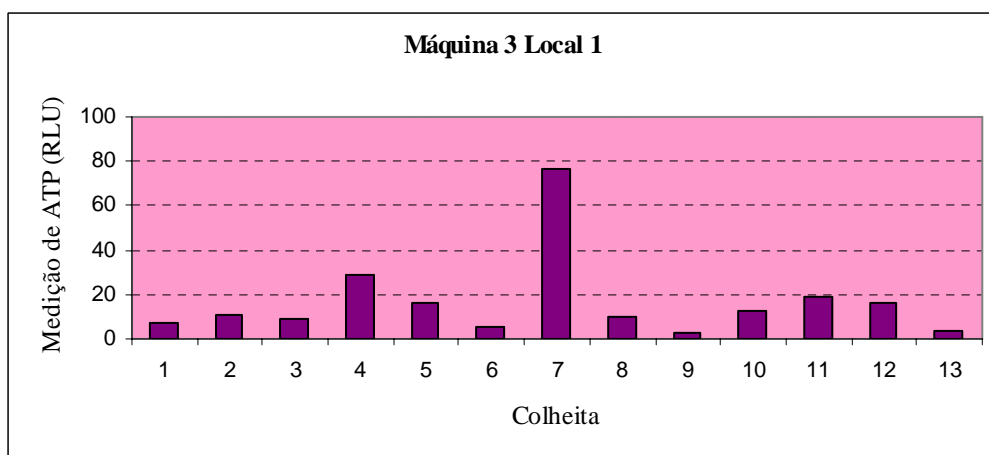


Figura 20 – Medição de ATP por bioluminescência na lâmina (local 1) da máquina 3, nas 13 colheitas. Resultados expressos em RLU.

No tapete (local 2) da máquina 3 os valores oscilaram entre 2 RLU e 79 RLU (Fig. 21); o valor que se repete com maior frequência é 3 RLU.

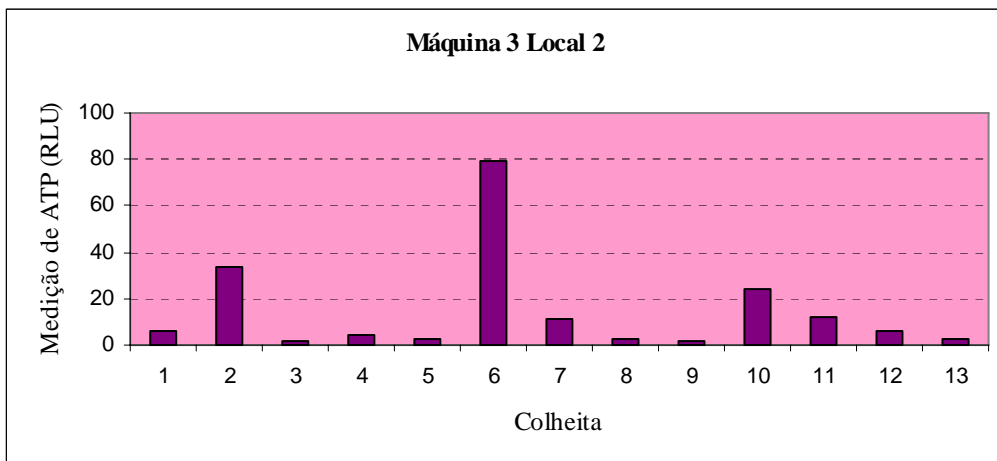


Figura 21 – Medição de ATP por bioluminescência no tapete (local 2) da máquina 3, nas 13 colheitas. Resultados expressos em RLU.

### 3.4 Visualização da detecção de proteína

Na máquina 1, foram realizados 11 ensaios, na maioria dos quais se obteve a cor verde, como resultado. Na lâmina, obteve-se a cor verde em 6 ensaios, a cor cinzenta em 3 e a cor roxa em 2 (Fig. 22).

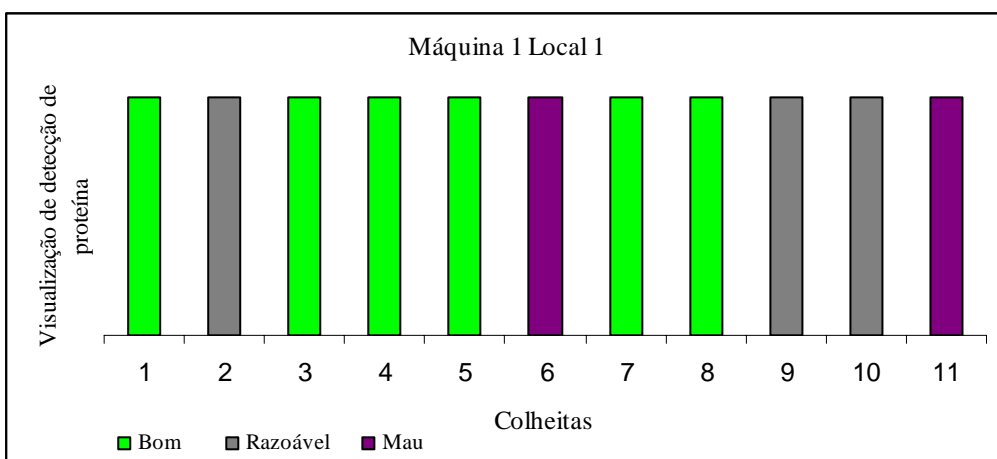


Figura 22 – Resultados, dos testes de visualização de detecção de proteína nos 11, ensaios na lâmina (local 1) da máquina 1.

Por outro lado, no tapete, obteve-se a cor verde em 8 ensaios, cor cinzenta em 3 e 0 com cor roxa (Fig. 23).

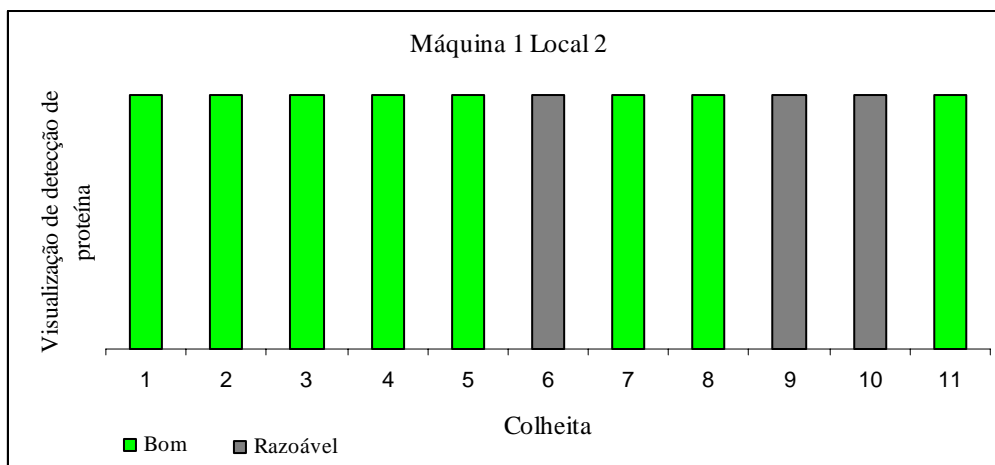


Figura 23 – Resultados, dos testes de visualização de detecção de proteína nos 11, ensaios no tapete (local 2) da máquina 1.

Na lâmina (local 1) da máquina 3, foram realizados 13 ensaios, dos quais 5 revelaram cor verde, 5 cor cinzenta e 3 cor roxa, ao fim de 10 minutos (Fig. 24).

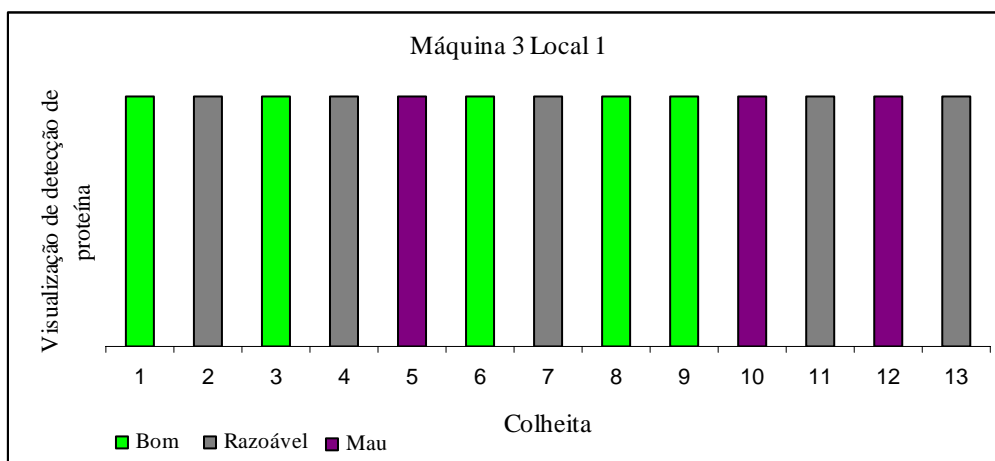


Figura 24 – Resultados, dos testes de visualização de detecção de proteína nos 13 ensaios, na lâmina (local 1) da máquina 3.

No tapete (local 2) da mesma máquina (a número 3), os valores obtidos foram maioritariamente de cor verde, com 8 locais, 3 com cor cinzenta e 2 com cor roxa (Fig. 25).

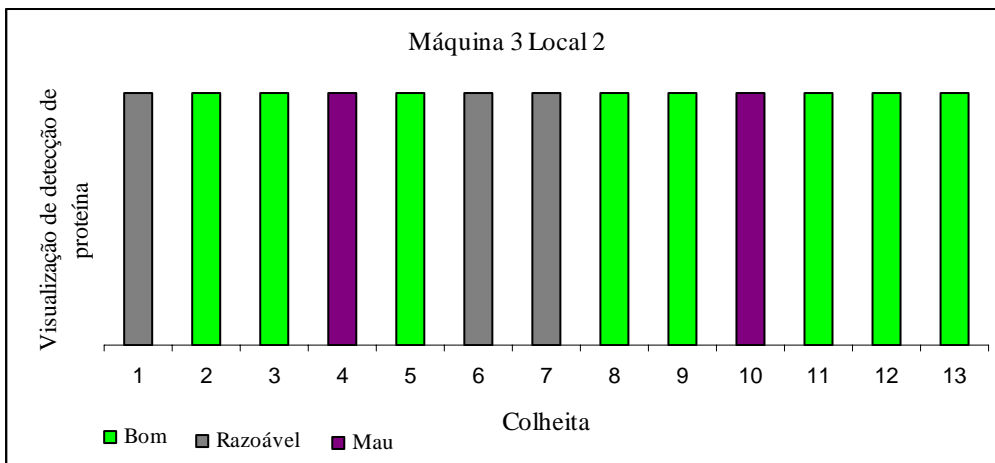


Figura 25 – Resultados, dos testes de visualização de detecção de proteína nos 13 ensaios, no tapete (local 2) da máquina 3.

### 3.5 Registo da observação visual

No momento da colheita das amostras para os ensaios descritos, fez-se uma observação visual e respectivo registo do estado de limpeza. Tentando dar alguma objectividade a uma análise subjectiva, a observação foi feita sempre pela mesma pessoa, em condições, quando possíveis, uniformes.

Na lâmina (local 1) da máquina 1, registaram-se 6 observações em locais que se consideraram limpos, 3 considerados com limpeza intermédia e 2 considerados sujos (Fig. 26).

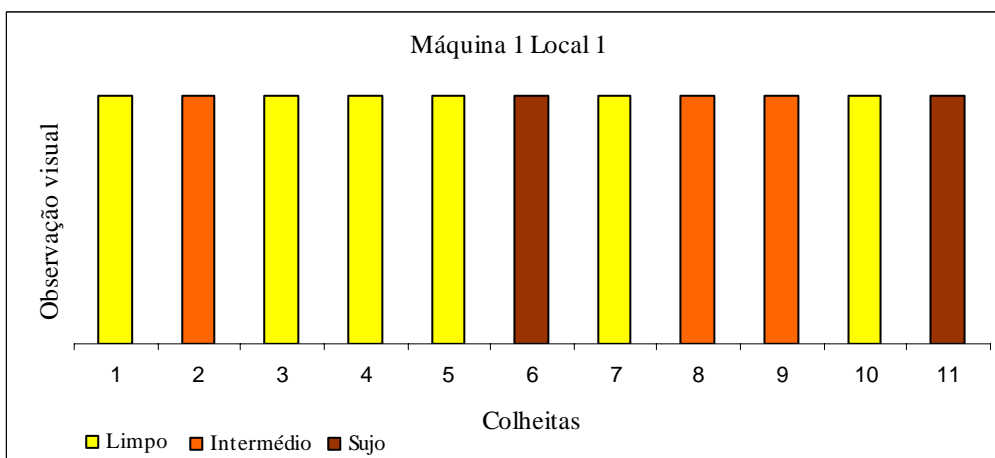


Figura 26 – Resultados, dos registos da observação visual à lâmina (local 1) da máquina 1, nas 11 colheitas realizadas.

No tapete (local 2) da mesma máquina o resultado foi semelhante, com a maioria das observações considerando superfícies visualmente limpas. Assim sendo, verificaram-se 7 locais limpos, 3 locais intermédios e 1 sujo (Fig. 27).

Figura 27 – Resultados, dos registos da observação visual ao tapete (local 2) da máquina 1, nas 11 colheitas realizadas.

Na máquina 3, à semelhança da anterior, a maioria dos locais foram considerados visualmente limpos no acto da observação. Assim, na lâmina (local 1) consideram-se 5 locais como limpos e dos 8 restantes, 4 foram considerados com limpeza intermédia e os outros 4 locais como sujos (Fig. 28).

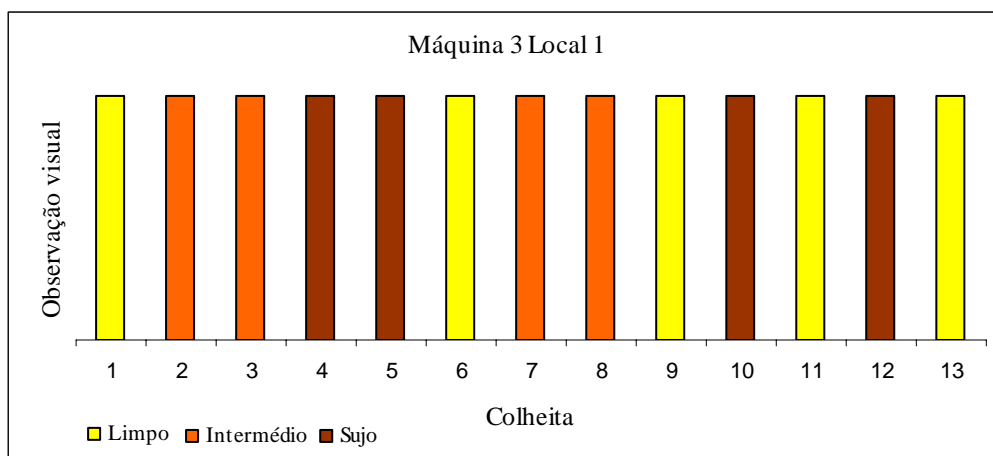
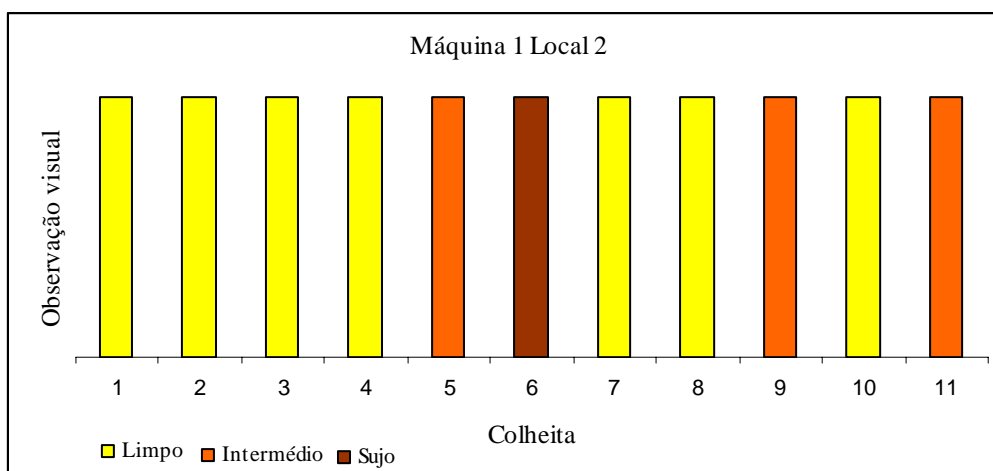


Figura 28 – Resultados, dos registos da observação visual à lâmina (local 1) da máquina 3, nas 13 colheitas realizadas.



No tapete (local 2) da mesma máquina, obteve-se o maior registo de locais considerados limpos, 8 locais, 4 considerados com limpeza intermédia e apenas 1 sujo (Fig. 29).

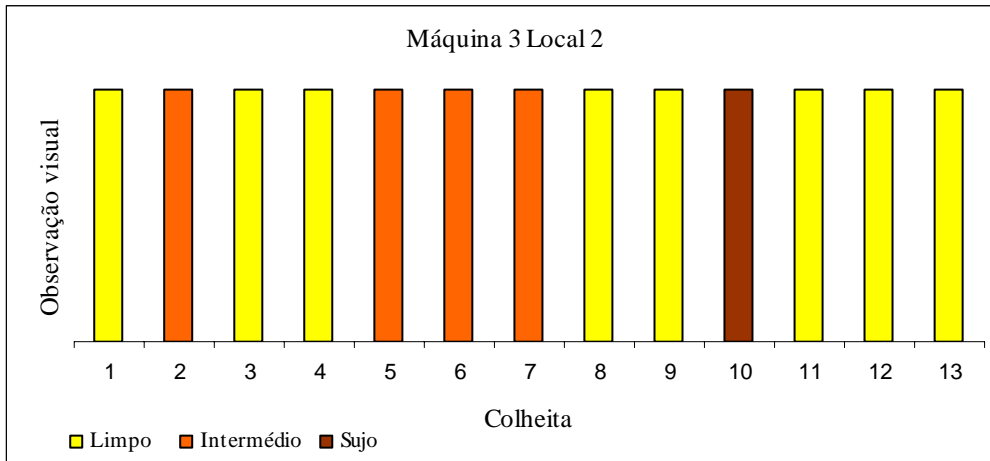


Figura 29 – Resultados, dos registos da observação visual ao tapete (local 2) da máquina 3, nas 13 colheitas realizadas.

Com os valores obtidos nos 48 ensaios, construiu-se uma tabela de resultados conformes e não conformes (Fig. 30), que permitisse efectuar uma análise de concordância entre os diferentes testes (microbiologia clássica, detecção de ATPmetria e visualização de detecção de proteína), e também com o registo da observação visual.

Na Figura 30, verde significa valores conformes e vermelho valores não conformes, com os valores indicativos disponíveis (Decisão da Comissão 471/2001; e Manual técnico da Higiene para os testes de ATPmetria e detecção de proteína), disponíveis nos anexos X e XI.

As colheitas 12 e 13 da máquina 1 não se realizaram, pelo que não estão presentes na Figura 30.

Colheita	Local	A. T.	Ent.	ATP	Prot.	Obsv. Vis.
1	M1L1	Red	Green	Green	Green	Green
	M1L2	Red	Red	Green	Green	Green
	M3L1	Red	Green	Green	Green	Green
	M3L2	Red	Green	Green	Red	Green
2	M1L1	Green	Green	Green	Red	Red
	M1L2	Green	Green	Green	Green	Green
	M3L1	Green	Green	Red	Red	Red
	M3L2	Red	Red	Red	Green	Red
3	M1L1	Green	Green	Green	Green	Green
	M1L2	Green	Green	Green	Green	Green
	M3L1	Green	Green	Green	Green	Red
	M3L2	Green	Green	Green	Green	Green
4	M1L1	Green	Green	Green	Green	Green
	M1L2	Green	Green	Red	Green	Green
	M3L1	Red	Green	Green	Red	Red
	M3L2	Red	Green	Green	Red	Green
5	M1L1	Green	Green	Green	Green	Green
	M1L2	Green	Green	Red	Green	Red
	M3L1	Red	Red	Red	Green	Red
	M3L2	Green	Red	Green	Green	Red
6	M1L1	Green	Green	Green	Red	Red
	M1L2	Green	Green	Green	Green	Green
	M3L1	Green	Green	Green	Green	Green
	M3L2	Red	Green	Red	Red	Red
7	M1L1	Green	Green	Red	Green	Green
	M1L2	Red	Green	Red	Green	Green
	M3L1	Red	Green	Red	Red	Red
	M3L2	Green	Green	Red	Green	Green
8	M1L1	Green	Green	Red	Green	Red
	M1L2	Green	Green	Red	Green	Green
	M3L1	Green	Green	Green	Green	Red
	M3L2	Red	Green	Green	Green	Green
9	M1L1	Green	Green	Red	Red	Red
	M1L2	Red	Green	Red	Red	Red
	M3L1	Green	Green	Green	Green	Green
	M3L2	Green	Green	Green	Green	Green
10	M1L1	Green	Green	Red	Red	Green
	M1L2	Red	Green	Red	Red	Green
	M3L1	Green	Green	Red	Red	Red
	M3L2	Red	Green	Red	Red	Red
11	M1L1	Red	Green	Red	Red	Red
	M1L2	Green	Green	Green	Green	Red
	M3L1	Green	Green	Red	Red	Green
	M3L2	Green	Green	Green	Green	Green
12	M1L1	-----	-----	-----	-----	-----
	M1L2	-----	-----	-----	-----	-----
	M3L1	Red	Green	Red	Red	Red
	M3L2	Green	Green	Green	Green	Green
13	M1L1	-----	-----	-----	-----	-----
	M1L2	-----	-----	-----	-----	-----
	M3L1	Green	Green	Green	Red	Green
	M3L2	Green	Green	Green	Green	Green

Figura 30 – Análise de concordância entre os vários testes, assim como da observação visual.

Os resultados detalhados da análise estatística comparativa entre microrganismos aeróbios totais a 30 °C (AT) e ATPmetria, entre microrganismos aeróbios totais a 30 °C e teste de proteína (PROT) e entre ATPmetria e teste de proteína (PROT), assim como os valores dos resultados dos testes de McNemar e do Coeficiente Kappa encontram-se detalhadamente apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resumo dos resultados dos testes estatísticos de McNemar e do Coeficiente Kappa, C-conforme e NC- não conforme.

Testes comparados	Dados	p	k										
AT/ATP	<table border="1"> <tr> <td colspan="3">ATP</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">AT</td> <td>C</td> <td>NC</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>18 11</td> </tr> <tr> <td>NC</td> <td>2 12</td> </tr> </table>	ATP			AT	C	NC	C	18 11	NC	2 12	0,022	0,410
ATP													
AT	C	NC											
	C	18 11											
	NC	2 12											
AT/PROT	<table border="1"> <tr> <td colspan="3">PROT</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">AT</td> <td>C</td> <td>NC</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>20 9</td> </tr> <tr> <td>NC</td> <td>3 11</td> </tr> </table>	PROT			AT	C	NC	C	20 9	NC	3 11	0,146	0,428
PROT													
AT	C	NC											
	C	20 9											
	NC	3 11											
ATP/PROT	<table border="1"> <tr> <td colspan="3">PROT</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">ATP</td> <td>C</td> <td>NC</td> </tr> <tr> <td>C</td> <td>15 5</td> </tr> <tr> <td>NC</td> <td>8 15</td> </tr> </table>	PROT			ATP	C	NC	C	15 5	NC	8 15	0,581	0,398
PROT													
ATP	C	NC											
	C	15 5											
	NC	8 15											

## 4. Discussão

De acordo com o Livro Branco Sobre a Segurança dos Alimentos (Comissão das Comunidades Europeias, 2000), ao longo das últimas décadas assistiu-se a uma evolução notável, tanto nos métodos de produção e processamento de alimentos como nos controlos necessários para assegurar a observância de normas de segurança alimentar.

A higiene de todas as superfícies, equipamentos e utensílios, tem elevado impacto na qualidade e segurança dos alimentos produzidos numa indústria, principalmente nos produtos altamente sensíveis ao crescimento microbiano, como sejam produtos frescos, peixe, carne, leite e vegetais (Donk & Gaalman, 2004).

A higiene dos géneros alimentícios traduz as medidas e condições necessárias para controlar os perigos potenciais veiculados pelos alimentos, garantindo que sejam próprios para o consumo humano, tendo em conta a sua utilização esperada.

Tradicionalmente, os procedimentos de limpeza eram avaliados recorrendo a inspecção visual ou a métodos de análise microbiológica. Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas surgiram novos e diferentes tipos de testes, normalmente de resultados mais rápidos. De acordo com Moore & Griffith (2002b), sempre que um novo método de monitorização de higiene for usado, deverá ser comparado com a metodologia clássica.

Segundo a WHO/FAO (2003) para a implementação de planos HACCP é necessário que os processos de monitorização (medição ou observação programada de um Ponto Crítico de Controlo (PCC) em função dos limites críticos) e verificação dos PCC sejam executados com rapidez, porque em processos contínuos, não há possibilidade de efectuar testes analíticos com resultados demorados. Tendo em conta esta situação, as medições de parâmetros físicos e químicos são preferíveis aos testes microbiológicos.

Idealmente, as indústrias devem poder dispor de um método rápido e simples de controlo da higiene, contudo não existem testes ideais para determinar esta eficácia. A escolha de um método de monitorização pressupõe identificar a composição dos detritos orgânicos resultantes da produção e identificar a prevalência bem como as condições fisiológicas de sobrevivência dos microrganismos.

De acordo com Blankenfeld-Enkvist & Brännback (2002), o método de colheita de amostras com zaragatoa, apenas remove 1 – 10 % dos contaminantes das superfícies, contudo como os 3 ensaios efectuados (análise microbiológica clássica, detecção de ATP e detecção de proteína) se basearam no mesmo método de colheita, esta desvantagem não deverá interferir na comparação.

A análise dos dados obtidos permite verificar que, em média, os microrganismos aeróbios totais a 30 °C se encontravam em maior número no tapete (local 2) da máquina 1, seguindo-se o tapete (local 2) da máquina 3.

Já as contagens de *Enterobacteriaceae* mostram que, em média, o tapete (local 2) da máquina 3 foi o local pior higienizado, seguindo-se a lâmina (local 1) da mesma máquina.

As medições de ATP obtidos, em média, indicam que o local com maiores contagens de RLU, em média, foi o tapete (local 2) da máquina 3, seguindo-se a lâmina (local 1) da mesma máquina.

O teste de visualização de detecção de proteína, revelou maiores quantidades na lâmina (local 1) da máquina 3, seguida da lâmina (local 1) da máquina 1.

A observação visual, obteve registos sobreponíveis aos da detecção de proteína.

Os valores indicativos dos teores microbianos totais e de *Enterobacteriaceae* presentes em superfícies estão estabelecidos na Decisão da Comissão 471/2001. Segundo essa legislação, numa superfície, para o número de microrganismos aeróbios totais a 30 °C ser considerado aceitável deverá variar entre 0 – 10 UFC/cm<sup>2</sup>; todos os valores acima de 10 UFC/cm<sup>2</sup> são considerados inaceitáveis. No que se refere a *Enterobacteriaceae*, o limite aceitável situa-se entre 0 – 1 UFC/cm<sup>2</sup>, sendo inaceitável acima deste intervalo.

Os resultados obtidos nas determinações dos microrganismos aeróbios totais a 30°C, mostram que, dos 11 ensaios realizados na lâmina (local 1) da máquina 1, apenas 2 estão acima do intervalo pré-definido, a colheita 1, com 2 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> e a 11 com 1,3 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>. No tapete (local 2) da mesma máquina, no mesmo número de ensaios, obtiveram-se o dobro de resultados não conforme, ou seja, a colheita 1, com 3,6 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, a 7, com 1,2 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, a 9 com 1,7 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> e a 10 com 5,7 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>.

Na lâmina (local 1) da máquina 3, tendo em conta o mesmo parâmetro microbiológico, dos 13 ensaios realizados, 5 estavam fora do limite pré-estabelecido, o ensaio 1 com 4,3 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, o 4 com 1,7 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, o 5 com 3,5 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, o 7 com 7,6 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> e o 12 com 5,2 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>. No tapete (local 2) da mesma máquina, verificou-se não conformidade em 7 dos 13 ensaios realizados: o ensaio número 1 com 1,2 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, o 2 com 1,5 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, o 4 com 8,0 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, o 6 com 6,1 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, o 7 com 5,2 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, o 8 com 3,4 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> e por fim o ensaio 10 com 1,1 x 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup>.

Verifica-se então que, de acordo com o critério microbiológico, os microrganismos aeróbios totais a 30 °C, no tapete (local 2) de ambas as máquinas mostram mais resultados não conformes do que as lâminas respectivas.

No que se refere a *Enterobacteriaceae*, a comparação entre os números obtidos e os números apontados pela referida Decisão, mostra que na lâmina (local 1) da máquina 1, os resultados de todos os ensaios estavam dentro dos limites, enquanto que no que se refere

ao tapete (local 2), nos mesmos 11 ensaios, apenas em 1 se encontrava fora do intervalo estipulado, o ensaio 1, que apresentou a contagem de  $4,4 \times 10$  UFC/cm<sup>2</sup>.

Na lâmina (local 1) da máquina número 3, verificou-se uma situação semelhante à anterior, apenas os resultados de um ensaio ultrapassam os limites, o ensaio 5 com  $8,6 \times 10$  UFC/cm<sup>2</sup>. No tapete, constatou-se a existência de 2 ensaios não conformes, o 2 com  $9,0$  UFC/cm<sup>2</sup> e o 5 com  $2,0 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>.

Uma vez mais, e no que se refere a *Enterobacteriaceae*, os tapetes encontravam-se mais contaminados do que as lâminas.

Segundo a empresa fornecedora das zaragatoas descartáveis Ultrsnap e do luminómetro SystemSURE II, por se estar na presença de alimentos prontos a consumir, os limites de aceitação para os valores de ATP em qualquer um dos dois locais (lâmina e tapete), serão: conforme, se inferior a 10 RLU; cautela, entre 10 RLU e 20 RLU; e não conforme, mais do que 20 RLU.

Tendo em conta estes valores, dos 11 ensaios realizados na lâmina (local 1) da máquina 1, 6 foram considerados conformes (ensaios 1, 2, 3, 4, 5 e 6), 2 classificados como cautela (ensaios 7 e 10), e 3 classificados como não conformes (ensaios 8, 9 e 11). No tapete (local 2) da mesma máquina, obtiveram-se 5 resultados conformes (ensaios 1, 2, 3, 6 e 11), 4 cautela (ensaios 4, 5, 7 e 8) e 2 não conformes (ensaios 9 e 10). Comparando os dois locais, de acordo com este teste, verifica-se que o tapete (local 2) possuiu menos valores conformes, sendo nesta máquina, o local menos higienizado.

Na máquina 3 no decorrer dos 13 ensaios, a respectiva lâmina (local 1) apresentou 6 valores conformes (ensaios 1, 3, 6, 8, 9 e 13), 5 classificados como cautela, (ensaios 2, 5, 10, 11 e 12), e apenas 2 colheitas apresentaram resultados classificados como não conformes (4 e 7). No tapete (local 2), verificou-se a presença de 8 ensaios denominados conformes (1, 3, 4, 5, 8, 9, 12 e 13), 2 cautela (7 e 11), e, à semelhança do anterior, 3 denominados por não conformes (2, 6 e 10). Nesta máquina, contrariamente à anterior, verificou-se que, de acordo com este teste, o local mais higienizado é o tapete.

O teste de detecção de proteína revela uma cor que é facilmente associada a superfície higienizada ou não. Desta forma, verde simboliza superfície limpa, cinzento superfície não higienizada, necessita repetir o teste, fazer novo enxaguamento ou nova higienização, e roxo, superfície suja, necessita nova higienização.

Na lâmina (local 1) da máquina 1, obtiveram-se 6 ensaios com cor verde (1, 3, 4, 5, 7 e 8), 3 com cor cinzenta, (2, 9 e 10) e 2 de cor roxa (6 e 11). No tapete (local 2) da mesma máquina, obtiveram-se 8 ensaios de cor verde (colheitas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 11) e 3 cinzentos (6, 9 e 10). Comparando os dois locais verifica-se que o tapete, de acordo com este tipo de teste, foi o local melhor higienizado.

Na lâmina (local 1) da máquina 3, apenas em 5 locais se verificou manifestação da cor verde no teste (1, 3, 6, 8 e 9); o mesmo número de locais obtiveram cor cinzenta (2, 4, 7,

11 e 13), 3 observações obtiveram cor roxa (5, 10 e 12). No tapete (local 2) da mesma máquina, obtiveram-se 8 locais com cor verde (2, 3, 5, 8, 9, 11, 12 e 13), 3 com cor cinzenta (1, 6 e 7), e apenas 2 com cor roxa (4 e 10). Comparando a lâmina (local 1) e o tapete (local 2) desta máquina, neste teste, verifica-se que o tapete é o local melhor higienizado.

A observação visual, não traduz limpeza microbiológica ou química, uma vez que superfícies visualmente limpas, podem estar contaminadas. Contudo este parâmetro também foi registado, à semelhança dos resultados dos testes anteriores, para cada máquina e para cada local de colheita.

Assim sendo, na lâmina (local 1) da máquina 1 registou-se a existência de 6 observações consideradas superfícies limpas (1, 3, 4, 5, 7 e 10), 3 designadas como limpeza intermédia (2, 8 e 9) e 2 classificadas como sujas (colheitas 6 e 11). No tapete (local 2) desta máquina, em 7 observações verificou-se que a superfície se encontrava limpa (1, 2, 3, 4, 7, 8 e 10), em 3 considerou-se intermédio (5, 9 e 11), e em apenas 1 considerou-se suja (observação 6). Neste tipo de observação, o tapete encontrava-se visualmente mais limpo que a lâmina.

Na lâmina (local 1) da máquina 3, nas 13 observações efectuadas, verificou-se que a superfície se encontrava limpa em 5 observações (1, 6, 9, 11 e 13), com limpeza intermédia em 4 (2, 3, 7 e 8), e com superfície suja em 4 observações, (4, 5, 10 e 12). No tapete (local 2) da mesma máquina, em 8 observações considerou-se a superfície limpa (1, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13), em 4 que a sua limpeza era intermédia (2, 5, 6 e 7), e em apenas 1 observação se considerou suja, a observação 10.

Bóer & Beuner (1999), defendem que a validação de um teste alternativo, deverá ser feita comparando-o com um teste padrão, pelo que, para adopção de um método rápido para a monitorização de higiene, tem que se fazer a sua avaliação prévia em relação à análise microbiológica clássica.

A análise mais pormenorizada dos resultados, permite verificar que a colheita número 1, nos 4 locais de amostragem, demonstra valores díspares quando comparados com as restantes colheitas. Tendo em conta, que as colheitas em ambas as máquinas foram realizadas no mesmo dia e sob as mesmas condições laboratoriais, terá provavelmente ocorrido algum tipo de contaminação no processamento das amostras, ou os meios utilizados estavam de alguma forma contaminados, uma vez que estando já preparados antes do início dos ensaios, e há tempo indeterminado, não foi possível garantir a sua esterilidade.

Na colheita 5 do tapete (local 2) da máquina 3, foram detectadas unidades formadoras de colónias de *Enterobacteriaceae*, e ausência de contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C. Uma vez que a contagem de *Enterobacteriaceae* deverá estar integrada na contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, os resultados obtidos

não podem ser considerados normais, além de terem sido pontuais, pelo que também este ensaio não foi considerado na análise dos resultados.

Para a análise comparativa detalhada dos dados serão excluídos os valores resultantes das contagens de *Enterobacteriaceae*, uma vez que as mesmas, como citado anteriormente, se encontram integradas nos resultados das contagens dos microrganismos aeróbios a 30 °C.

A observação visual, além de intrinsecamente subjectiva, não traduz limpeza microbiológica ou química, além de que não pode constituir um meio de monitorização das operações de higiene, pelo que, apesar de se terem registado as observações, os resultados não foram incluídos na comparação estatística dos vários testes.

Da análise da Figura 30, infere-se que dos 43 ensaios considerados válidos, 24 são concordantes, entre si e em simultâneo, nos 3 testes realizados, nomeadamente contagem de microrganismos aeróbios totais a 30 °C, detecção de ATP por bioluminescência e visualização da detecção de proteína.

Analisando detalhadamente cada colheita, tendo em conta apenas os 3 testes citados anteriormente, verifica-se que na colheita 2 apenas as determinações realizados no tapete (local 2) da máquina 1, apresentaram todos os testes concordantes entre si; na colheita 3, todos os ensaios revelaram testes concordantes entre si; na colheita 4 e 5, apenas as amostras das 2 lâminas mostraram valores concordantes entre si; na colheita 6 e 7, apenas os testes realizadas na máquina 3 concordaram entre si; na colheita 8, apenas a lâmina da máquina 3 apresenta todos os resultados conforme; na e colheita 9 a lâmina da máquina 1 e os 2 locais (lâmina e tapete) da máquina 3 apresentam valores concordantes; na 10, apenas os tapetes de ambas as máquinas concordavam entre si; na 11 apenas a máquina 1 apresenta testes concordantes.

As colheitas 12 e 13, apenas ocorreram na máquina 3. Na primeira todos os valores concordaram entre si, enquanto que na segunda essa concordância apenas ocorre no tapete (local 2).

Nas restantes 19 colheitas (não concordantes entre si), podem existir 6 tipos de combinações diferentes. Para facilidade de interpretação dos dados, apresentou-se os resultados em forma de Tabela.

Tabela 5 – Colheitas não concordantes entre si nos 3 testes

A	<ul style="list-style-type: none"> <li>– aeróbios totais – conforme</li> <li>– ATP – conforme</li> <li>– proteína – não conforme</li> </ul>	Colheita 2, lâmina (local 1) máquina 1; colheita 6, a lâmina (local 1) e o tapete (local 2) da máquina 1; colheita 13, na lâmina (local 1)
B	<ul style="list-style-type: none"> <li>– aeróbios totais – conforme</li> <li>– ATP – não conforme</li> <li>– proteína – não conforme</li> </ul>	Colheita 2, lâmina (local 1) da máquina 3; colheita 9, a lâmina (local 1) da máquina 1; colheita 10, as lâminas (locais 1) de ambas as máquinas; colheita 11, a lâmina (local 1) da máquina 3
C	<ul style="list-style-type: none"> <li>– aeróbios totais – conforme</li> <li>– ATP – não conforme</li> <li>– proteína – conforme</li> </ul>	Colheita 4, tapete (local 2) da máquina 1; colheita 5, o tapete (local 2) da máquina 1; colheita 7, a lâmina (local 1) da máquina 1; colheita 8, os 2 locais da máquina 1; colheita 11, a tapete (local 2) da máquina 3.
D	<ul style="list-style-type: none"> <li>– aeróbios totais – não conforme</li> <li>– ATP – conforme</li> <li>– proteína – conforme</li> </ul>	Colheita 8, o tapete (local 2) da máquina 3;
E	<ul style="list-style-type: none"> <li>– aeróbios totais – não conforme</li> <li>– ATP – não conforme</li> <li>– proteína – conforme</li> </ul>	Colheita 2, tapete (local 2) da máquina 3; colheita 7, o tapete (local 2) da máquina 1;
F	<ul style="list-style-type: none"> <li>– aeróbios totais – não conforme</li> <li>– ATP – conforme</li> <li>– proteína – não conforme</li> </ul>	Colheita 4, tapete (local 2) da máquina 3;

Aos 43 ensaios aplicou-se análise estatística.

Antes de realizar um tratamento estatístico de dados, é necessário analisar previamente um conjunto de premissas que determinam o tipo de teste a utilizar, nomeadamente a quantidade de variáveis em estudo, se os valores podem ser distribuídos segundo uma escala, e ainda se apresentam distribuição normal.

Nas amostras, em estudo pretendeu-se analisar diferentes testes, com variáveis diferentes, mas com um objectivo comum, avaliar se o programa de higienização foi realizado de forma eficaz, atribuindo a essa premissa a denominação de valor conforme e não conforme, de acordo com o valor resultante do teste, daí a designação de amostras emparelhadas. Quantificar os resultados tendo em conta uma escala torna-se por este facto impossível, assim como a distribuição normal dos mesmos.

De acordo com todos estes factores, é mais adaptado ao ensaio o recurso a um teste não paramétrico, nomeadamente o teste de McNemar. O recurso a este teste permite comparar 2 proporções onde existem pares de resultados numa variável binária (Petrie & Watson, 2001).

Procedeu-se, igualmente, à determinação do coeficiente Kappa, o qual determina o grau de concordância ou associação entre 2 testes; o valor 1 significa concordância perfeita, o valor 0 que o grau de concordância é igual ao grau de não concordância, valores

negativos raramente ocorrem, mas significam que o valor de concordância é menor que o valor de concordância esperado (Petrie & Watson, 2001).

A Tabela 4, mostra os resultados da análise comparativa dos testes efectuados.

A comparação entre microrganismos aeróbios totais a 30 °C e ATP obteve um valor  $p = 0,022$ ; de acordo com este teste estatístico, se o valor de  $p < 0,05$  os resultados apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Das 13 amostras não concordantes, 11 mostraram valores conformes de microrganismos aeróbios totais a 30 °C e resultados de ATP não conformes, situação perfeitamente entendível uma vez que o teste de ATP identifica matéria orgânica, mesmo não contaminada por microrganismos, pelo que, provavelmente, terá havido uma má higienização das superfícies após a laboração. Apesar de microbiologicamente parecer aceitável, na indústria alimentar esta situação pode ser complicada, uma vez que o material remanescente poderá servir de substrato ao crescimento de bactérias, favorecendo eventualmente o crescimento exponencial da população bacteriana.

Então, apenas 2 dos 43 ensaios realizados (cerca de 5% do total dos ensaios), constituem problema, porque existe contagem bacteriana mas os valores de ATPmetria são conformes.

Esta situação, aparentemente pouco clara, tem que ter em atenção que as contagens obtidas se encontram dentro do mesmo logaritmo dos valores indicativos, pelo que, pode ser pelo menos parcialmente explicada pela incerteza da técnica analítica, ou pela própria colheita, uma vez que os microrganismos não estão nunca uniformemente distribuídos pela superfície, pelo que não será possível, mesmo em colheitas sucessivas, fazer uma amostragem completamente sobreponível.

Niza Ribeiro *et al.* (2002), corroboram, defendendo que as irregularidades na distribuição das amostras sobre as superfícies e eventualmente a existência de agregados de bactérias, podem ser importantes. Por outro lado, estas 2 situações ocorrem no mesmo local, o tapete (local 2) da máquina 3, o qual estava visivelmente danificado apresentando mesmo “fendas”. As características destas “fendas”, de difícil acesso para higienização, poderão constituir fonte de contaminação.

A comparação entre microrganismos aeróbios totais a 30 °C e teste de visualização de detecção de proteína, obtiveram um valor  $p = 0,146$ ; uma vez que  $p > 0,05$  os resultados não apresentam diferenças estatísticas significativas. A análise dos dados mostra que 31 dos ensaios, concordam entre si, existindo apenas 12 que discordam entre si.

Em 9 dos 12 ensaios, a pesquisa de microrganismos aeróbios totais a 30 °C deu valores conformes e os resultados do teste de detecção de proteína não conformes, o que provavelmente se deveu a um processo de higienização mal conduzido. Mais uma vez o tipo de analito explica o resultado, pois pode estar presente proteína sem contaminação microbiana.

Os 3 ensaios restantes, revelam, presença de microrganismos e ausência de visualização da proteína, o que pode parecer pouco explicável, contudo a cor verde do teste não significa ausência de proteína, mas apenas que está dentro de valores considerados aceitáveis para a monitorização da higiene na indústria alimentar. Em algumas situações este teste não é de fácil interpretação. A distinção entre “verde acinzentado” ou “cinza arroxeado” nem sempre é fácil, dependendo da sensibilidade do operador que a realiza. No entanto, quando a proteína está presente em níveis aceitáveis (verde), ou quando há uma quantidade elevada (roxo), a interpretação do teste é fácil.

A comparação entre a ATPmetria e o teste de visualização de detecção de proteína, obteve um valor  $p = 0,581$ , pelo que sendo  $p > 0,05$ , as amostras não são significativamente diferentes. Da análise dos dados verifica-se que 30 ensaios concordam entre si, enquanto 13 discordam entre si.

Em 5 dos 13 ensaios, a pesquisa de ATP resultou conforme e a de proteína não conforme, provavelmente, por questões relacionadas com o local de colheita. Os 8 ensaios que revelaram resultados com valores conformes de detecção de proteína e valores não conformes de ATP, são provavelmente explicados pela presença sobretudo de ATP microbiano e menos de ATP proveniente de produtos fatiados.

O coeficiente kappa, nas três determinações realizadas, resultou em valores equiparados, a saber, 0,410 (41%) entre aeróbios totais e ATP; 0,428 (42,8%) entre aeróbios totais e observação do teste de detecção de proteína; 0,398 (39,8%) entre ATP e observação do teste de detecção de proteína.

De acordo com Petrie & Watson (2001), a comparação entre os resultados de aeróbios totais e ATP e entre aeróbios totais e observação do teste de detecção de proteína é classificada como moderada, enquanto a comparação entre ATP e os resultados da observação do teste de detecção de proteína é classificada razoável. Por outro lado Thrusfield (2005), sugere que valores superiores ou iguais a 0,75 indicam excelente concordância, enquanto que valores inferiores a 0,40 sugerem pobre concordância. De acordo com este autor, nenhuma das comparações realizada entre os testes apresenta excelente concordância, existindo mesmo uma comparação (ATP e observação do teste de detecção de proteína), que é considerada pobre.

Segundo Moore & Griffith (2002b), a maior parte dos estudos estabelece uma boa correlação entre a detecção de ATP por bioluminescência e a análise microbiológica clássica, contudo no seu próprio estudo isto não acontece. De acordo com os autores isto deve-se essencialmente ao facto de que a maior parte dos detritos nas superfícies de trabalho serem essencialmente orgânicos e não microbiológicos, o que provavelmente também explica os resultados deste estudo.

Vários autores recomendam o uso de detecção de ATP por bioluminescência para monitorização de planos de higienização. Malik, Cooper & Griffith (2003) recomendam que a

monitorização em hospitais seja realizada recorrendo a detecção de ATP por bioluminescência, enquanto que Bell, Stallard, Brown & Standley (1994), referem que técnica de detecção de ATP por bioluminescência demonstrou ser um bom meio para garantir os altos parâmetros de higiene dos tanques de leite pela optimização da rapidez e eficácia com que estas podem ser monitorizadas.

A subjectividade inerente à interpretação do teste de detecção de proteína quando os resultados não são explicitamente aceitáveis ou não aceitáveis, aliado ao tempo que medeia entre a colheita da amostra e a leitura dos resultados, são um inconveniente claro para este teste quando aplicado na monitorização da higiene numa indústria como a estudada. Os 10 minutos, para as indústrias em que a pressão de produção é muito elevada, é um tempo ainda considerável, e se ao fim deste tempo não se consegue dizer claramente se é necessário voltar a higienizar, a monitorização do PCC estará comprometida.

Na comparação entre o teste de detecção de proteína e o de ATPmetria, aplicados nesta indústria em particular, este último parece sair claramente em vantagem, quer pelo tipo e rapidez de resultados, quer pela facilidade de interpretação.

Existem evidências que sugerem que a relação custo/benefício na utilização dos métodos rápidos, nomeadamente detecção de ATP por bioluminescência, é provavelmente maior que a relação custo/benefício resultante da monitorização recorrendo a microbiologia tradicional (Moore & Griffith, 2002b). A grande dificuldade para as pequenas indústrias poderá ser o custo do aparelho de leitura de ATP, eventualmente pouco comportável em alguns casos.



## 5. Conclusões

O conhecimento das populações microbianas nas superfícies de trabalho é fundamental quando se pretende a segurança de um dado produto alimentar. Para além de microrganismos indicadores de higiene, também é importante assegurar a ausência de microrganismos potencialmente patogénicos, pelo que o recurso a outros testes mais específicos e mesmo a análises de microbiologia clássica devem ser, periodicamente, realizadas.

O teste de visualização de detecção de proteína revelou algum interesse, particularmente pela facilidade de transporte das zaragatoas e pelo seu custo comparativamente menor em relação ao teste de ATPmetria. No entanto, devido sobretudo à dificuldade de leitura da cor e ao tempo de espera até que essa leitura possa ser feita (10 minutos), não pareceu o mais adequado às características da indústria em presença.

A utilização de ATPmetria permitiu resultados bastante rápidos, quase imediatos, e uma vez que fornece um valor absoluto, não é susceptível de interpretações duvidosas. Apresenta a desvantagem do custo do aparelho, que representa um investimento inicial avultado; ainda assim é facilmente transportável.

Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, as características da indústria onde decorreu o estudo, em particular da sala de fatiados, e os objectivos que se pretendiam alcançar, concluiu-se que

- o processo de higienização deverá, provavelmente, ser revisto;
- a observação visual prévia à utilização de qualquer teste de monitorização é fundamental;
- o recurso à detecção de ATP por bioluminescência, é dos testados, o método mais adequado para monitorizar o plano de higienização utilizado e, desta forma, controlar os PCC do plano de autocontrolo implementado.



## Bibliografia

- Aycicek, H., Oguz, U. & Karci, K. (2006). Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209, 203-206.
- Bell, C., Stallard, P.A., Brown, S.E. & Standley, J.T.E. (1994). ATP – Bioluminescence techniques for assessing the hygienic condition of milk transport tankers. *International Dairy Journal*, 4, 629-640.
- Baptista, P. (2003). *Higienização de equipamentos e instalações na indústria agro-alimentar*. Guimarães: Forvisão.
- Baptista, P. & Saraiva, J. (2003). *Higiene pessoal na indústria alimentar*. Guimarães: Forvisão.
- Blankenfeld-Enkvist, G.V. & Brännback, M. (2002). Technological trends and needs in food diagnostics – National Technology Agency. *Technology Review* 132/2002. Helsinki.
- Bóer, E. & Beuner, R.R. (1999) Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 119-130.
- Comissão das Comunidades Europeias (2000). Livro Branco Sobre a Segurança dos Alimentos. Bruxelas.
- Costa, P.D., Andrade, N.J., Brandão, S.C.C., Passos, F.J.V. & Soares, N.F.F (2006). ATP-Bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 345-349.
- Crowley, H., Cagney, C., Sheridan, J.J., Anderson, W., McDowell, D.A., Blair, I.S., Bishop, R.H. & Duffy, G. (2005). *Enterobacteriaceae* in beef products from retail outlets in the Republic of Ireland and comparison of the presence and counts of *E.coli* O157:H7 in these products. *Food Microbiology*, 22, 409-414.
- Cruz, A.G., Cenci, S.A. & Maia, M.C.A. (2006). Quality assurance requirements in produce processing. *Food Science & Technology*, 17, 406-411.
- Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto. Diário da República nº 164/27 – I Série. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Lisboa.
- Decisão da Comissão 471/2001 de 8 de Junho. Official Journal of the European Communities L165/48 de 21 de Junho de 2001.
- Donk, D.P.V & Gaalman, G. (2004). Food safety and hygiene. Systematic layout planning of food processes. *Chemical Engineering Research and Design*, 82, 1485-1493.
- Easter, M. (2003). *Hygiene monitoring in support of food safety – a review of methods and industry trends*. Acedido em Janeiro 12, 2008, disponível em: [http://www.kaivac.com/products/ATP/hygiene monitoring review of methods and tr ends.pdf](http://www.kaivac.com/products/ATP/hygiene%20monitoring%20review%20of%20methods%20and%20tr%20ends.pdf).

- Ferreira, W.F.C. & Sousa, J.C.F. (2000). *Microbiologia* (volume 2). (pp.3). Lisboa: Lidel – edições técnicas, lda.
- Forsythe, S.J. (2002). *Microbiologia da Segurança Alimentar*. (pp. 227-229). Porto Alegre: Artmed.
- Griffith, C.J., Cooper, R.A., Gilmore, J., Davies, C. & Lewis, M. (2000). An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. *Journal of Hospital Infection*, 45, 19-28.
- Hawronskyj, J.M. & Holah, J. (1997). ATP: A universal hygiene monitor. *Food Science & Technology*, 8, 79-84.
- Hygiene (nd). Manual de utilização técnica. Edição de autor.
- Jessen, B. & Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 265-269.
- Jullien, C., Bénézech, T., Carpentier, B., Lebret, V. & Faille, C. (2003). Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 56, 77-87.
- Langsrud, S., Sidhu, M.S., Heir, E. & Holck, A.L. (2003). Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 283-290.
- Larson, E.L., Aiello, A.E., Gomez-Duarte, C., Lin, S.X., Lee, L., Della-Latta, P. & Lindhardt, C. (2003). Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. *Food Microbiology*, 20, 735-739.
- Legnani, P., Leoni, E., Berveglieri, M., Mirolo, G. & Alvaro, N. (2004). Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food Control*, 15, 205-211.
- Lelieveld, H.L.M., Mostert, M.A. & Holah, J. (2005). *Handbook of hygiene control in the food industry*. (pp.1-13 & 588-618) Cambridge (England): Woodhead publishing limited.
- Lipscomb, I.P., Pinchin, H.E., Collin, R., Harris, K. & Keevil, C.W. (2006). The sensitivity of approved Ninhydrin and Biuret tests in the assessment of protein contamination on surgical steel as an aid to prevent iatrogenic prion transmission. *Journal of Hospital Infection*, 64, 288-292.
- Liu, Y.J., Vico, L.D. & Lindh, R. (2008). *Ab initio* investigation on the chemical origin of the firefly bioluminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 194, 261-267.
- Malik, R.E., Cooper, R.A. & Griffith, C.J. (2003). Use of audit tools to evaluate the efficacy of cleaning systems in hospitals. *American Journal of Infection Control*, 31, 181-187.
- Metaxopoulos, J., Kritikos, D. & Drosinos, E.H. (2003). Examination of microbiological parameters relevant to the implementation of GHP and HACCP system in Greek meat industry in the production of cooked sausages and cooked cured meat products. *Food Control*, 14, 323-332.
- Moore, G. & Griffith, C. (2002a). A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiology*, 19, 65-73.

- Moore, G. & Griffith, C. (2002b). A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: an industry trial. *International Journal of Environmental Health Research*, 12, 317-329.
- Niza Ribeiro, J., Cerqueira, J., Santos, P. & Louzã, A. (2002). Validação interna de um método de ensaio baseado em ATP para a monitorização da higiene de superfícies de aço inox na indústria dos lacticínios. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 97, 71-80.
- Noronha, J. (n.d.). *Manual de Higienização na Indústria Alimentar*. Acedido em Dezembro 12, 2007, disponível em:  
[http://www.esac.pt/noronha/manuais/Manual\\_higienizacao\\_aesbuc.pdf](http://www.esac.pt/noronha/manuais/Manual_higienizacao_aesbuc.pdf).
- Noronha, J. & Baptista, P. (2003). *Segurança alimentar em estabelecimentos agro-alimentares: projecto e construção*. Guimarães: Forvisão.
- NP 1828 (1981). Norma Portuguesa de Microbiologia alimentar: Colheita de amostras para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 1829 (1982). Norma Portuguesa de Microbiologia alimentar: Preparação da amostra para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 3005 (1985). Norma Portuguesa de Microbiologia alimentar: Preparação das diluições para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 4137 (1991). Norma Portuguesa de Microbiologia alimentar: Regras gerais para a determinação de *Enterobacteriaceae* sem revitalização. Técnicas do número mais provável (NMP) e de contagem de colónias. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- NP 4405 (2002). Norma Portuguesa de Microbiologia alimentar: Regras gerais para a contagem de microrganismos. Contagem de colónias a 30 °C. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- Patel, P.D. (1994). *Rapid analysis techniques in food microbiology*. (pp.196-231) Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Petrie, A. & Watson, P. (2001). *Statistics for Veterinary and Animal Science*. (pp. 109-111 e pp. 173-175) United Kingdom: Blackwell Science.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005). *Microbiology* (6th Ed). (pp. 2 e pp. 492-495). New York: McGraw-Hill.
- Redsven, I., Kymäläinen, H.-R., Pesonen-Leinonen, E., Kuisma, R., Ojala-Paloposki, T., Hautala, M. & Sjöberg, A.-M. (2007). Evaluation of a bioluminescence method, contact angle measurements and topography for testing the cleanability of plastic surfaces under laboratory conditions. *Applied Surface Science*, 253, 5536-5543.
- Rocha, V.S. (2007). *Determinação de carbono orgânico assimilável em amostras de água – Estudo de comparação do método de determinação da concentração de ATP com o método clássico de contagem de colónias*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica. Lisboa: Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa.
- Rodionova, N.S. & Petushkov, V.N. (2006). Effect of different salts and detergents on luciferin-luciferase luminescence of the enchytraeid *Fridericia heliota*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 83, 123-128.

- Simm, E.M., Andrade, N.J., Mendonça, R.C.S., Passos, F.J.V. & Chaves, J.B.P. (2006). Interferência de substâncias orgânicas, *Staphylococcus carnosus* e Esporos de *Bacillus subtilis* na medida de ATP-bioluminescência. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9, 305-310.
- Soares, E. (2007). Doenças de origem alimentar - infecções e intoxicações. *Segurança e qualidade alimentar*, 2, 6-8.
- Tebbutt, G.M. (2007). Does microbiological testing of foods and the food environment have a role in the control of foodborne disease in England and Wales?. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 883-891.
- Tompkin, R.B. (2004). Environmental sampling – A tool to verify the effectiveness of preventive hygiene measures. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 95, 45-51.
- Thrusfield, M. (2005) *Veterinary epidemiology*. (pp. 327-329) United Kingdom: Blackwell publishing.
- Wildbrett, G. (2000). *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria* (pp.1-8 & 179-191). Zaragoza (España): Acribia, S.A.
- WHO/FAO, Comissão do Codex Alimentarius (2003). *Código de práticas internacionais recomendadas – Princípios gerais de higiene alimentar CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003*. Roma (Itália).

## **Anexos**

**Anexo I - Instrução de trabalho da indústria alimentar – Plano de higienização para a desinfecção ambiental.**

**Anexo II – Instrução de trabalho da indústria alimentar – Plano de higienização para paredes e pavimentos.**

**Anexo III - Instrução de trabalho da indústria alimentar – Plano de higienização para a fatiadora.**

**Anexo IV – Constituição do meio TGE-Agar –Tryptone Glucose Extract Agar.**

**Anexo V – Constituição do meio VRBGA – Violet Red Bile Glucose Agar.**

**Anexo VI – Resultados dos ensaios realizados na lâmina (local 1) da máquina 1.**

**Anexo VII – Resultados dos ensaios realizados no tapete (local 2) da máquina 1.**

**Anexo VIII – Resultados dos ensaios realizados na lâmina (local 1) da máquina 3.**

**Anexo IX – Resultados dos ensaios realizados no tapete (local 2) da máquina 3.**

**Anexo X – Limites de aceitação estabelecidos pela Decisão da Comissão 471/2001, relativos ao número de Unidades Formadoras de Colónias em superfícies.**

**Anexo XI – Limites de aceitação estabelecidos pela empresa fornecedora das zaragatoas descartáveis Ultrasnap e do luminómetro SystemSURE II, medidos em RLU.**



## Anexo I - Instrução de trabalho da indústria alimentar – Plano de higienização para a desinfeção ambiental.

INSTRUÇÕES DE TRABALHO		
LINHA DE FATIADOS		
Código:		
Edição:		

### DESINFECCÃO AMBIENTAL

#### 1. Material e meios de desinfeção

##### 1.1 Desinfectantes

Designação	Agente de desinfeção	Periodicidade	Apresentação	Tratamento	Tempo actuação	Tempo recuperação
(1) TOTAL SHOCK SF	Glutaraldeido	Quinzenal	Líquido	Manutenção	2 horas (*)	24 horas
(2) F 66	Cloreto de benzalcónio	Bimestral	Líquido	Manutenção (**)	1 hora (*)	3 horas
				Choque	1 h 40 min (*)	

(\*) Ver anexo A.

(\*\*) Manutenção - Tratamento a cumprir a menos que haja indicações em contrário.

##### 1.2 Meios mecânicos auxiliares

- AEROBRUMER TIPO H;

#### 2. Modo de funcionamento

1. Desligar os ventiladores da Sala de Fatiados;
2. Colocar o AEROBRUMER TIPO H sensivelmente no meio da sala, afastado dos equipamentos, por forma a garantir a correcta libertação do desinfectante (atomização) para o ambiente;



3. Utilizando luvas e máscara, desenganchar as fixações dos puxadores de molas da cubeta (depósito inferior) conforme indica a figura 2;



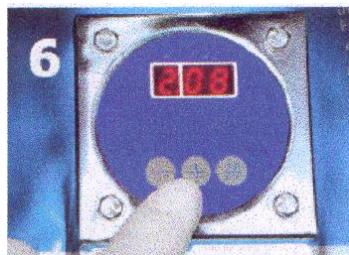
4. Colocar na cubeta o desinfetante a utilizar (1) ou (2) de acordo com a periodicidade definida. Por cada hora de funcionamento deverá juntar-se cerca de 5 litros de desinfetante, não devendo NUNCA ultrapassar o nível indicado pelo vinco circular situado no interior da cubeta (ver figuras 3 e 4)



5. Colocar de novo o aparelho sobre a cubeta, e fixá-lo com os puxadores de molas (ver figura 5)



6. Ligar o aparelho à tomada apropriada, e marcar o tempo de funcionamento adequado ao desinfectante a utilizar (ex: 2.00h para o TOTAL SHOCK SF) pressionando para o efeito os botões (- e +) existentes no painel (ver figura 6)



7. Colocar o aparelho em funcionamento pressionando para o efeito o botão **RUN** existente no painel (ver figura 6A)



8. Fechar a Sala de Fatiados durante o período de funcionamento do aparelho, **NÃO SENDO PERMITIDA A ENTRADA NA SALA DURANTE ESTE PERÍODO**. O aparelho desliga automaticamente quando termina o tempo definido.
9. Após o tempo de recuperação indicado, ligar os ventiladores da Sala de Fatiados permitindo assim a sua ventilação;
10. Caso seja utilizado o desinfectante (2), **proceder obrigatoriamente ao enxaguamento** dos equipamentos, superfícies e utensílios antes da sua utilização.
11. Antes de arrumar o aparelho, proceder à sua limpeza da seguinte forma, utilizando para o efeito luvas e máscara:
  - a. Desenroscar o tampão da cubeta (ver figura 7);



- b. Retirar o desinfectante que se encontra na cubeta, através do orifício de saída e colocá-lo num recipiente para próxima utilização. Não deve haver mistura com o

detergente original; logo, o líquido que sobrou, deve ser colocado num recipiente à parte e ser gasto na próxima utilização. Enxaguar a cubeta com água corrente.



NOTA: Ainda que o desinfectante retirado da cubeta apresente uma coloração diferente do desinfectante original, o seu poder de desinfectação não está comprometido, o que significa que deve ser utilizado na aplicação seguinte, completando o volume em falta.

- c. Terminadas as operações de limpeza e arrumação do aparelho, retirar todo o material descartável utilizado (luvas, máscara, avental etc.) e colocá-lo no lixo. Lavar cuidadosamente as mãos e colocar novo material descartável.

### 3. Responsabilidades

#### 3.1. Responsabilidade directa

- Os trabalhadores encarregues da aplicação deste procedimento, sob a supervisão do Chefe de Equipa, são responsáveis em conjunto e duma forma directa pelas acções aqui descritas.

#### 3.2. Responsabilidade pela vigilância

- O Chefe de Sector é responsável pela vigilância do cumprimento das acções previstas no presente procedimento.

#### 3.3. Responsabilidade pela supervisão

- A Direcção de Operações é responsável pela supervisão e pela garantia dos meios necessários às acções previstas neste procedimento, em coordenação com o chefe do serviço de produção.

## ANEXO A

Designação	Tratamento	Tempo de actuação
(1) TOTAL SHOCK SF	Manutenção	12 min / 100 m <sup>3</sup>
(2) F 66	Manutenção	6 min / 100 m <sup>3</sup>
	Choque	10 min / 100 m <sup>3</sup>

## Anexo II – Instrução de trabalho da indústria alimentar – Plano de higienização para paredes e pavimentos.

INSTRUÇÕES DE TRABALHO		
LINHA DE FATIADOS		
Código:		
Edição:		

### Paredes e Pavimentos

#### 1. Material e meios de lavagem e desinfecção

##### 1.1 Água

- Características microbiológicas (características de água potável);
- Características físico-químicas (pH neutro e dureza baixa).

##### 1.2 Detergentes

Designação	Tipo detergente	Apresentação	Tempo actuação	Temperatura actuação	Dose aplicação
(1) SAFEFOAM	Alcalino	Líquido	15´	Ambiente	3,5%

##### 1.3 Desinfectantes

Designação	Agente de desinfecção	Apresentação	Tempo actuação	Temperatura actuação	Dose aplicação
(2) DIVOSAN QC AQ	Quaternário	Líquido	10´	20 °C	0,6%
(3) DEOGEN VS7	Clorado	Líquido	10´	20 °C	0,7%

##### 1.4 Meios mecânicos auxiliares

- Mangueira flexível com bico de pressão e ligador rápido à torneira;
- Mangueira ligada ao kit de formação de espuma;
- Objectos de escovagem manual;
- Dispositivo para pulverização do desinfectante.

##### 2.1 Diária [\*]

- Proceder à limpeza dos detritos grosseiros, removendo-os para o lixo;

- Proceder à pré-lavagem com água fria sob pressão, removendo os detritos ainda visíveis;
- Aplicar sobre as superfícies uma camada uniforme de espuma do detergente (1) e deixar actuar durante 15’;
- Efectuar o enxaguamento com água à temperatura ambiente a alta pressão.

## 2.2 Trimestral <sup>[+]</sup>

- Proceder à pré-lavagem com água fria sob pressão, removendo os detritos grosseiros;
- Aplicar sobre as superfícies uma camada uniforme de espuma do detergente (1) e deixar actuar durante 15’;
- Efectuar o enxaguamento com água fria a alta pressão.

## 3. Desinfecção Diária <sup>[+]</sup>

- Após a lavagem diária, aplicar a solução desinfectante (3)<sup>[a]</sup> nas superfícies, com o auxílio do dispositivo de pulverização do desinfectante, deixando actuar pelo menos durante 10’;
- Fazer o enxaguamento com água à temperatura ambiente.

---

[+] - Paredes até cerca de 2 metros de altura e pavimentos.

[+] - Tectos e paredes acima de 2 metros de altura.

[a] - Em substituição do desinfectante (3) usar o desinfectante (2), apenas na última lavagem da semana.

## 4. Responsabilidades

### 4.1. Responsabilidade directa

- Os trabalhadores encarregues da aplicação deste procedimento, sob a supervisão do Chefe de Equipa, são responsáveis em conjunto e duma forma directa pelas acções aqui descritas.

### 4.2. Responsabilidade pela vigilância

- O Chefe de Sector é responsável pela vigilância do cumprimento das acções previstas no presente procedimento.

### 4.3. Responsabilidade pela supervisão

- A Direcção de Operações é responsável pela supervisão e pela garantia dos meios necessários às acções previstas neste procedimento, em coordenação com o chefe do serviço de produção.

## Anexo III - Instrução de trabalho da indústria alimentar – Plano de higienização para a fatiadora.

INSTRUÇÕES DE TRABALHO		
LINHA DE FATIADOS		
Código:		
Edição:		

### Fatiadora

#### 1. Material e meios de lavagem e desinfecção

##### 1.1 Água

- Características microbiológicas (características de água potável);
- Características físico-químicas (pH neutro e dureza baixa);

##### 1.2 Detergentes

Designação	Tipo detergente	Apresentação	Tempo actuação	Temperatura actuação	Dose aplicação
(1) SHURECLEAN PLUS	Neutro	Líquido	10´	Ambiente	0,5%

##### 1.3 Desinfectantes

Designação	Tipo desinfectante	Apresentação	Tempo actuação	Temperatura actuação	Dose aplicação
(2) SUREDIS	-	Líquido	10´	20 °C	1,0 %
(3) ALCOSAN	Álcool	Líquido	-	-	Puro

##### 1.4 Meios mecânicos auxiliares

- Objectos de escovagem manual (escovas, esponjas, etc.);
- Baldes de plástico;
- Pulverizadores manuais.

## 2. Remoção de detritos

- Sempre que se mude o produto a fatiar, remover os detritos com o auxílio de escova e/ou papel absorvente;
- Diariamente, remover os detritos após a desmontagem do tapete e lâmina.

## 3. Lavagem

- A efectuar diariamente sempre que se mude o produto a fatiar;
- A efectuar diariamente após a desmontagem do tapete e lâmina;
- Proceder à pré-lavagem com água à temperatura ambiente;
- Seguidamente, lavar todas as superfícies exteriores bem como as peças desmontadas com solução detergente (1), em água morna (45 °C);
- No caso particular dos tapete(s) a lavagem deverá ser feita com o(s) mesmo(s) a rodar garantindo desta forma que toda a superfície é lavada.
- Proceda-se ao enxaguamento com água à temperatura ambiente.

## 4. Desinfecção

- Efectuar diariamente antes do início do processo de tranchagem, com o desinfectante (3) em toda a máquina, e particularmente nas zonas de contacto com o produto: rampa de colocação do produto, garras, lâmina, tiras amovíveis e tapete.
- A efectuar diariamente com o desinfectante (3) sempre que se mude o produto a fatiar;
- No final do dia de trabalho, com o auxílio dos pulverizadores manuais, aspergir a solução desinfectante (2)<sup>[a]</sup>, sobre as peças da máquina e restantes superfícies deixando actuar pelo menos 10';
- No caso particular dos tapetes a desinfecção deverá ser feita com o mesmo a rodar garantindo desta forma que toda a superfície é desinfectada.

---

<sup>[a]</sup> - o desinfectante não necessita de enxaguamento

## 5. Responsabilidades

### 5.1 Responsabilidade directa

- Os trabalhadores encarregues da aplicação deste procedimento, são responsáveis em conjunto e duma forma directa pelas acções aqui descritas.

### 5.2 Responsabilidade pela vigilância

- O Encarregado de Sector é responsável pela vigilância do cumprimento das acções previstas no presente procedimento.

### 5.3 Responsabilidade pela supervisão

- A Direcção de Operações é responsável pela supervisão e pela garantia dos meios necessários às acções previstas neste procedimento, em coordenação com o chefe do serviço de produção.

#### Anexo IV – Constituição do meio TGE-Agar –Tryptone Glucose Extract Agar.

Peptona de caseína -----	5,0 g
Extracto de carne -----	3,0 g
Glucose -----	1,0 g
Ágar-ágar -----	15,0 g

#### Anexo V – Constituição do meio VRBGA – Violet Red Bile Glucose Agar.

Extracto de levedura -----	3,0 g
Peptona -----	7,0 g
Cloreto de sódio -----	5,0 g
Sais de bÍlis n.º 3 -----	1,5 g
Glucose -----	10,0 g
Vermelho neutro -----	0,03 g
Cristal violeta -----	0,002 g
Ágar-ágar -----	12,0 g

#### Anexo VI – Resultados dos ensaios realizados na lâmina (local 1) da máquina

1.

Colheita	Análise microbiológica Clássica		Detecção de ATP (RLU)	Teste de detecção de proteína	Registo da observação visual
	Aeróbios Totais (UFC/cm <sup>2</sup> )	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/cm <sup>2</sup> )			
1	2 x 10	0	1	Verde	Limpo
2	1,0	0	6	Cinzento	Intermédio
3	0	0	3	Verde	Limpo
4	1,0	0	4	Verde	Limpo
5	8,0	0	3	Verde	Limpo
6	0	0	2	Roxo	Sujo
7	0	0	11	Verde	Limpo
8	0	0	31	Verde	Intermédio
9	5,0	0	42	Cinzento	Intermédio
10	3,0	0	12	Cinzento	Limpo
11	1,3 x 10	0	51	Roxo	Sujo



## Anexo VII – Resultados dos ensaios realizados no tapete (local 2) da máquina

1.

Colheita	Análise microbiológica Clássica		Deteção de ATP (RLU)	Teste de deteção de proteína	Registo da observação visual
	Aeróbios Totais (UFC/cm <sup>2</sup> )	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/cm <sup>2</sup> )			
1	3,6 x 10 <sup>2</sup>	4,4 x 10	8	Verde	Limpo
2	5,0	0	1	Verde	Limpo
3	1,0	0	5	Verde	Limpo
4	0	0	20	Verde	Limpo
5	3,0	0	17	Verde	Intermédio
6	0	0	5	Cinzento	Sujo
7	1,2 x 10	0	16	Verde	Limpo
8	1,0	0	19	Verde	Limpo
9	1,7 x 10 <sup>2</sup>	0	80	Cinzento	Intermédio
10	5,7 x 10	0	28	Cinzento	Limpo
11	0	0	4	Verde	Intermédio

## Anexo VIII – Resultados dos ensaios realizados na lâmina (local 1) da máquina

3.

Colheita	Análise microbiológica Clássica		Deteção de ATP (RLU)	Teste de deteção de proteína	Registo da observação visual
	Aeróbios Totais (UFC/cm <sup>2</sup> )	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/cm <sup>2</sup> )			
1	4,3 x 10	1	7	Verde	Limpo
2	0	0	11	Cinzento	Intermédio
3	0	0	9	Verde	Intermédio
4	1,7 x 10	0	29	Cinzento	Sujo
5	3,5 x 10	8,6 x 10	16	Roxo	Sujo
6	1,0	0	5	Verde	Limpo
7	7,6 x 10	0	77	Cinzento	Intermédio
8	0	0	10	Verde	Intermédio
9	0	0	3	Verde	Limpo
10	7,0	0	13	Roxo	Sujo
11	1,0	0	19	Cinzento	Limpo
12	5,2 x 10	0	16	Roxo	Sujo
13	1,0	0	4	Cinzento	Limpo

## Anexo IX – Resultados dos ensaios realizados no tapete (local 2) da máquina 3.

Colheita	Análise microbiológica Clássica		Deteção de ATP (RLU)	Teste de deteção de proteína	Registo da observação visual
	Aeróbios Totais (UFC/cm <sup>2</sup> )	<i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/cm <sup>2</sup> )			
1	1,2 x 10 <sup>2</sup>	0	6	Cinzento	Limpo
2	1,5 x 10 <sup>2</sup>	9,0	34	Verde	Intermédio
3	4,0	0	2	Verde	Limpo
4	8,0 x 10	1,0	4	Roxo	Limpo
5	5,0	2,0 x 10 <sup>2</sup>	3	Verde	Intermédio
6	6,1 x 10	0	79	Cinzento	Intermédio
7	5,2 x 10	0	11	Cinzento	Intermédio
8	3,4 x 10	0	3	Verde	Limpo
9	8,0	0	2	Verde	Limpo
10	1,1 x 10	0	24	Roxo	Sujo
11	9,0	0	12	Verde	Limpo
12	4,0	1,0	6	Verde	Limpo
13	0	0	3	Verde	Limpo



**Anexo X – Limites de aceitação estabelecidos pela Decisão da Comissão 471/2001, relativos ao número de Unidades Formadoras de Colónias em superfícies.**

	<b>Limite aceitável</b>	<b>Limite não aceitável</b>
<b>Microrganismos aeróbios totais a 30 °C</b>	0 – 10 / cm <sup>2</sup>	> 10 / cm <sup>2</sup>
<b><i>Enterobacteriaceae</i></b>	0 – 1 / cm <sup>2</sup>	> 1 / cm <sup>2</sup>

**Anexo XI – Limites de aceitação estabelecidos pela empresa fornecedora das zaragatoas descartáveis Ultrasnap e do luminómetro SystemSURE II, medidos em RLU.**

<b>Conforme</b>	<b>Cautela</b>	<b>Não conforme</b>
< 10	11 – 20	> 20

