



**Avaliação da qualidade microbiológica do ar de uma
empresa de processamento de carnes**

Ana Rita Ramos Silva

UMinho | 2021

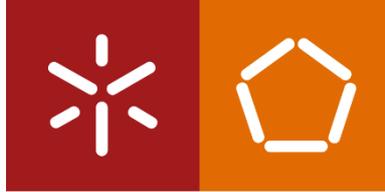


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Rita Ramos Silva

**Avaliação da qualidade
microbiológica do ar de uma
empresa de processamento de
carnes**

dezembro de 2021



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Ana Rita Ramos Silva

**Avaliação da qualidade microbiológica do ar de
uma empresa de processamento de carnes**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Armando Albino Dias Venâncio
e da
Engenheira Isabel Pinto

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-CompartilhaGual

CC BY-NC-SA

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à empresa que me recebeu e permitiu que a realização desta dissertação fosse possível. Agradeço em especial à Engenheira Isabel Pinto pelo tempo despendido.

Ao meu orientador, Professor Doutor Armando Albino Dias Venâncio, por toda a partilha de conhecimento e pela disponibilidade durante a orientação desta dissertação.

A todas as pessoas do Centro de Engenharia Biológica que se cruzaram comigo e que me ajudaram de alguma forma na realização desta dissertação.

Finalmente, quero ainda agradecer aos meus pais, ao meu irmão e ao meu namorado pela paciência e por estarem sempre ao meu lado.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho acadêmico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Avaliação da qualidade microbiológica do ar de uma empresa de processamento de carnes

Resumo

O crescimento de fungos não é normalmente aceite nos enchidos. Uma vez que o ar foi descrito como a principal fonte de esporos de fungos que contaminam os enchidos, os locais onde estes produtos são produzidos, armazenados e embalados, têm de possuir o mínimo possível de fungos no ar. Pelo que, para além do cumprimento das boas práticas de higiene, torna-se necessário o controlo microbiológico do ar. Este controlo tem como finalidade controlar o aparecimento dos bolores nos enchidos, de modo a evitar a sua deterioração, aumentando o tempo de prateleira. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a qualidade microbiológica do ar interior de algumas zonas de uma empresa de processamento de carnes. Tomou-se como valores guia os valores limite estabelecidos pela Portaria n.º 138-G/2021, os valores adotados pela APHA e os valores da escala de Fung.

A qualidade microbiológica do ar foi avaliada através da amostragem ao ar com o amostrador AirTEST Omega que possui uma taxa de fluxo de 100 L/min. Foram realizadas amostragens, sempre em triplicado, de 200 L e de 1000 L. As placas resultantes das amostragens foram incubadas durante 7 dias a 25 °C para permitir o crescimento de fungos. No final dos 7 dias efetuou-se a contagem de unidades formadoras de colónias (*UFC*). Foi ainda realizada uma desinfeção por nebulização a uma das zonas em estudo e através da análise dos resultados obtidos foi possível aferir se o tratamento foi eficaz.

Pelo limite estabelecido pela legislação portuguesa, 95 % dos resultados estão em conformidade, por sua vez, pelo critério da APHA o total de conformes já decresce para 54 %. Se o critério de avaliação for a escala de Fung, 63 % dos valores estão no nível de aceitação de ar limpo, 26 % dos valores no ar aceitável e apenas 11 % dos valores representam um ar não aceitável. O corredor e a embalagem foram as zonas que apresentam resultados mais críticos.

Verificou-se que a abertura das portas dos climas tem influência no número de fungos dos aerossóis microbianos dos climas. Por sua vez, a desinfeção por nebulização não mostrou ser eficiente, pelo que outras técnicas terão de ser estudadas. Medidas como manter as portas dos climas fechadas sempre que possível e reduzir o tempo de permanência dos enchidos no corredor e na zona da embalagem, podem resultar na diminuição da contaminação pelos fungos.

Palavras-chave: enchidos, fungos, qualidade microbiológica.

Evaluation of the microbiological air quality of a meat processing company

Abstrat

Fungal growth is not normally accepted in sausages. Since air has been described as the main source of fungal spores that contaminate sausages, the places where these products are produced, stored and packaged must have as little fungal as possible in the air. Therefore, in addition to the fulfillment of good hygiene practices, microbiological air control is necessary. This control aims to control the appearance of molds in sausages in order to avoid deterioration, increase the shelf life. The main objective of this work was to evaluate the microbiological quality of indoor air in some areas of a meat processing company. The guide values adopted were the limit values established by *Portaria* Nr. 138-G/2021, the NASA values adopted by the APHA and the fung scale values.

The microbiological quality of the air was evaluated by air sampling with the AirTEST Omega sampler with a flow rate of 100 L/min. Samples were always carried out in triplicate, of 200 L and 1000 L. The plates, resulting from the samples, were incubated for 7 days at 25°C to allow the growth of fungi. At the end of the 7 days, colony-form units (CFU) were counted. A nebulization disinfection was also performed in one of the areas under study and through the analysis of the results obtained it was possible to assess whether the treatment was effective or not.

By the limit established by Portuguese law, 95 % of the results are in conformity, in turn, at the discretion of the APHA the total number of compliances already decreases to 54 %. If the evaluation criterion is the Fung scale, 63 % of the values are at the level of clean air acceptance, 26 % of the values in the acceptable air and only 11 % of the values represent a not acceptable clean air. The corridor and packaging were the areas that presented the most critical results.

It was found that the opening of the doors of climates has an influence on the number of fungi of microbial aerosols of climates. In turn, nebulization disinfection has not been shown to be efficient so other techniques will have to be studied. Measures such as keeping the doors of the climates closed whenever possible and reducing the length of stay of sausages in the corridor and in the packaging area, may result in decreased contamination by fungi.

Keywords: Fungi, microbiological quality, sausages.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstrat	vi
Índice.....	vii
Símbolos e Abreviaturas	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de tabelas	xi
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Enquadramento do tema	1
1.2. Objetivos.....	2
Capítulo 2 – Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Os enchidos – Definição e classificação	3
2.1.1. Os enchidos a nível Nacional	4
2.1.2. Processo de fabrico dos enchidos	5
2.1.3. Características Físico-químicas dos enchidos.....	8
2.1.4. Contaminações microbiológicas	9
2.2. Segurança alimentar	11
2.3. Qualidade do ar interior	13
2.3.1. Aerossóis microbianos	16
2.3.2. Amostragem.....	17
2.3.3. Valores limite permitidos e/ou recomendados.....	20
2.4. Desinfecção	21
2.4.1. Nebulização.....	21
Capítulo 3 – Metodologia	23
3.1. Locais de recolha das amostras.....	23
3.2. Preparação dos meios de cultura.....	24
3.3. Amostragem	25
3.4. Desinfecção	27
3.5. Inoculação de fungos dos enchidos	28
3.6. Tratamento dos resultados	28
Capítulo 4 – Apresentação e discussão dos resultados.....	30
4.1. Contagem de microrganismos nas zonas seleccionadas	30

4.1.1. Meio DRBC.....	34
4.1.2. Meio MEA.....	36
4.2. Comparação entre os meios de cultura DRBC e MEA.....	38
4.3. Comparação dos valores obtidos nos diferentes locais	39
4.4. Comparação dos valores obtidos antes e depois da desinfecção do Clima 1.....	40
4.5. Correlação entre os vários locais	41
4.6. Influência da temperatura e da humidade relativa nos resultados obtidos.....	42
4.7. Comparação visual dos bolores nos enchidos e nas placas incubadas.....	42
Capítulo 5 – Conclusão e Recomendações.....	44
Bibliografia	46

Símbolos e Abreviaturas

a_w – Atividade da água

APHA – American Public Health Association

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

CE – Comissão Europeia

CEN – Comité Europeu de Normalização

CH₂O – formaldeído

CO – monóxido de carbono

CO₂ – dióxido de carbono

COVs – Compostos Orgânicos Voláteis

DOP – Denominação de Origem Protegida

DRBC – Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol

EFSA – European Food Safety Authority

ETG – Especialidade Tradicional Garantida

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points

IGP – Indicação Geográfica Protegida

ISO – International Organization for Standardization

MEA – Malt extract agar

NASA – National Aeronautics and Space Administration

n.º – número

OMS – Organização Mundial de Saúde

pH – potencial de hidrogénio

RSECE – Regulamento dos Sistemas Energéticos de Climatização em Edifícios

UE – União Europeia

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

Índice de figuras

Figura 1 – Representação de alguns enchidos: A– Alheira; B– Chouriço; C–Morcela; D– Linguiça; E– Farinheira; F– Salpicão.....	5
Figura 2 – AirTEST Omega.....	25
Figura 3 – Posições de recolha.	26
Figura 4 – Representação esquemática da posição do dispositivo durante a recolha de amostras	27
Figura 5 – New Jet.	28
Figura 6 – Carga fúngica no ar por unidade de volume, no clima 1, no clima 5a e no clima 5b, e sua conformidade com os valores legislados e recomendados (Escala de Fung (ar limpo e ar aceitável) e APHA) para o meio DRBC.....	34
Figura 7 – Carga fúngica no ar por unidade de volume, no corredor e na embalagem, e sua conformidade com os valores legislados e recomendados (Escala de Fung (ar limpo e ar aceitável) e APHA) para o meio DRBC.....	36
Figura 8 – Carga fúngica no ar por unidade de volume, no clima 1, no clima 5a e no clima 5b, e sua conformidade com os valores legislados e recomendados (Escala de Fung (ar limpo e ar aceitável) e APHA) para o meio MEA.....	37
Figura 9 – Carga fúngica no ar por unidade de volume, no corredor e na embalagem, e sua conformidade com os valores legislados e recomendados (Escala de Fung (ar limpo e ar aceitável) e APHA) para o meio MEA.....	38
Figura 10– Enchido com fungos.	43
Figura 11– Colónia inoculada do enchido.....	43
Figura 12– Amostra Clima 1 02/07.....	43

Índice de tabelas

Tabela 1 – Valores limite e margem de tolerância para os contaminantes físico-químicos do ar interior	15
Tabela 2 – Valores limite e condições de referência para os poluentes microbiológicos	16
Tabela 3 – Valores adotados pela APHA - contaminação microbiológica.....	20
Tabela 4 – Escala de Fung – contaminação microbiológica	21
Tabela 5 – Número de unidades formadoras de colónias obtidos para o clima 1, clima 5a, clima 5b, corredor e embalagem para o meio DRBC	31
Tabela 6 – Número de unidades formadoras de colónias obtidos para o clima 1, clima 5a, clima 5b, corredor e embalagem para o meio MEA	32
Tabela 7 – Classificação dos resultados segundo a legislação portuguesa e APHA.....	33
Tabela 8 – Classificação dos resultados de acordo com a escala de Fung	34
Tabela 9 – Valores médios da carga fúngica expressos em UFC/m^3 obtidos com os diferentes meios nos diferentes locais e respetivo p-value.....	39
Tabela 10 – Valores médios da carga fúngica expressos em UFC/m^3 obtidos nos diferentes locais e respetivo p-value – Meio DRBC.....	39
Tabela 11 – Valores médios da carga fúngica expressos em UFC/m^3 obtidos nos diferentes locais e respetivo p-value – Meio MEA.....	40
Tabela 12 – Valores médios da carga fúngica expressos em UFC/m^3 obtidos antes e depois da desinfeção e respetivo p-value.....	40
Tabela 13 – Coeficiente de Pearson entre diferentes locais - DRBC	41
Tabela 14 – Coeficiente de Pearson entre diferentes locais - MEA.....	41
Tabela 15 – Coeficientes de Pearson entre os climas, a temperatura e a humidade relativa.....	42

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Enquadramento do tema

Este trabalho foi desenvolvido numa empresa de processamento de carnes e nos laboratórios da Universidade do Minho no âmbito da dissertação em Engenharia Biológica, no ramo de Tecnologia Química e Alimentar, tendo uma duração de cinco meses, de março a julho de 2021. O tema surgiu da necessidade de reduzir o aparecimento de bolores nos enchidos, de modo a tornar o produto mais seguro e atrativo a nível comercial.

As condições ambientais, como a humidade e a temperatura, dos locais de fabrico e maturação dos enchidos favorecem o crescimento microbiano, nomeadamente o crescimento de fungos na superfície dos enchidos (Bernáldez, et al., 2013). Fatores como o declínio lento do pH, pouco fumo na fumagem ou a ocorrência de superfícies com uma humidade mais elevada aquando do processamento favorecem também o crescimento de fungos na superfície dos produtos (Sørensen, Jacobsen, Nielsen, Frisvad, & Koch, 2008). Algumas espécies destes fungos podem produzir efeitos indesejáveis na qualidade dos enchidos, podendo alterar, por exemplo, o seu sabor (Lozano-Ojalvo, et al., 2015). Outras podem ainda produzir micotoxinas, que são metabolitos secundários tóxicos para o consumidor (Bernáldez, et al., 2013). Mesmo que algumas espécies não alterem a qualidade do produto, o seu crescimento não deixa de ser indesejável uma vez que um produto que apresente bolores na sua superfície deixa de ser atrativo a nível comercial, diminuindo os lucros da empresa.

O aparecimento de fungos nos alimentos, neste caso, nos enchidos, pode estar diretamente relacionado com a carga microbiana presente no ar, uma vez que o ar foi descrito como a principal fonte de esporos de fungos que contaminam os enchidos (Asefa, et al., 2010). Pelo que um maior controlo da qualidade do ar nos locais de fabrico e maturação dos produtos, nomeadamente um controlo da carga microbiana presente, pode resultar numa diminuição da proliferação de bolores na superfície dos enchidos, e consequentemente de uma menor necessidade de adicionar aditivos com funções antifúngicas à superfície dos enchidos, tornando o produto mais natural.

1.2. Objetivos

O crescimento de fungos não é aceito na maioria dos produtos derivados de carne, sendo considerado um problema económico, estético e até de segurança alimentar, tanto para os produtores como para os consumidores.

Neste sentido, a realização desta dissertação tem como objetivo geral avaliar a qualidade microbiológica do ar, usando para a amostragem do ar o amostrador AirTEST Omega, tendo em consideração a legislação, os valores adotados pela APHA e a escala de Fung.

Como objetivos específicos têm-se:

- Quantificar os microrganismos presentes nas amostras dos diferentes locais;
- Comparar os resultados obtidos com a legislação, com o critério da APHA e com a escala de Fung;
- Analisar os valores obtidos para cada local;
- Comparar os valores obtidos entre os diferentes locais;
- Avaliar a eficácia da desinfeção por nebulização;
- Correlacionar os valores obtidos de diferentes locais;
- Verificar se a temperatura e humidade dos climas têm influência nos resultados;
- Comparar visualmente os fungos dos enchidos com os fungos que cresceram nas placas resultantes das amostragens.

Capítulo 2 – Revisão bibliográfica

2.1. Os enchidos – Definição e classificação

A carne faz parte da alimentação do homem desde os tempos primitivos, sendo ainda hoje um alimento muito apreciado. A necessidade de conservar a carne levou à criação de enchidos em invólucros de tripa natural (Carvalho, 2010). Pelo que, a transformação da carne em enchidos é uma forma de conservação da mesma (Almeida, 2009). Este aumento da vida útil da carne, era conseguido através da secagem, salga e fermentação, que permitiam reduzir a atividade da água (a_w) e o pH dos produtos e, ainda, através de um tratamento térmico que eliminava células patogénicas (Vandendriessche, 2008). A produção de enchidos passou a ser industrial apenas no século XX (Rodrigues, 2012).

Assim, os enchidos são produtos cárneos pertencentes ao grupo dos preparados à base de carne. Pelo Regulamento (CE) n.º 853/2004, de 29 de abril de 2004, estes definem-se como produtos transformados resultantes da transformação da carne, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca.

Os enchidos apresentam grande variedade tanto a nível de sabores e de texturas, como de formas. Toda esta variedade, resulta das diferentes matérias-primas utilizadas, dos restantes ingredientes e do próprio processo de fabrico. Em Portugal, a carne mais utilizada para o fabrico dos enchidos é a carne de suíno (Mendes, 2013).

Há diversas categorias em que os enchidos se inserem, dependendo das técnicas usadas no processo de fabrico e dos constituintes utilizados. Na zona do mediterrâneo, os enchidos podem ser fumados, fermentados ou secos (Marcos, Viegas, Almeida, & Guerra, 2016). Alheira, linguiça e farinheira são exemplos de enchidos fumados, uma vez que foram sujeitos a pelo menos uma etapa de fumagem. Os enchidos fermentados não são sujeitos a nenhum tratamento térmico, sendo consumidos maioritariamente crus. São os diferentes períodos de fermentação, bem como a redução da humidade, que permitem obter a textura e o sabor característicos deste tipo de enchido. Por fim, os enchidos secos passam por uma etapa de secagem ou desidratação, onde ocorre a diminuição da a_w , sendo a morcela um exemplo deste tipo de enchido (Gomes, 2018).

2.1.1. Os enchidos a nível Nacional

Em Portugal os enchidos são produzidos em todo o país, no entanto são predominantemente fabricados na região Norte, mais concretamente em Trás-os-Montes, e na região sul, nomeadamente o Alentejo (Marcos, Viegas, Almeida, & Guerra, 2016).

Os enchidos tradicionais portugueses são produtos únicos que têm normalmente origem em zonas geográficas que estão normalmente associadas à respetiva designação comercial, e que têm uma forte ligação ao desenvolvimento dessa região. Fatores como a raça do animal, tipo de solo, vegetação, clima da região e a própria tecnologia do fabrico, são fatores que influenciam a qualidade do produto (Almeida, 2009). Assim, enchidos de regiões diferentes, apresentam características diferentes, nomeadamente o sabor, textura, entre outros (Gomes, 2018).

Com o objetivo de valorizar comercialmente estes produtos, surge a certificação e consequente atribuição das marcas (Gomes, 2018):

- Denominação de Origem Protegida (DOP): Denominação que identifica um produto com o nome da região. O produto é originário dessa região, onde as características se devem a essa região.
- Indicação Geográfica Protegida (IGP): Indicação que identifica um produto com a designação do nome de uma região, onde pelo menos uma parte do ciclo de fabrico tem origem nessa região
- Especialidade Tradicional Garantida (ETG): Denominação que identifica um produto produzido com matérias-primas tradicionais.

Para além da certificação valorizar os produtos tradicionais, assegura também as condições de higiene com que estes são produzidos, bem como o respeito pelos métodos de fabrico tradicionais. Pelo que o processo de certificação é um recurso importante para a proteção da autenticidade destes produtos (Mendes, 2013). Atualmente, em Portugal, há 38 produtos certificados, dos quais 36 com IGP e 2 com DOP (Marcos, Viegas, Almeida, & Guerra, 2016).

De entre os diversos enchidos produzidos em Portugal destacam-se (Gomes, 2018):

- A alheira (Figura 1A) é um produto fumado, onde são misturados diferentes tipos de carne ligados com pão, condimentada com sal, pimenta, colorau, azeite e alho.
- O chouriço (Figura 1B) pode ser de carne, sangue, entre outros. A de carne é feita à base de carnes e gorduras de suíno, misturadas com pimentão, alho, sal, entre outros.

- A morcela (Figura 1C) é uma mistura de aparas de entremeada, língua e coração de suínos, sangue, condimentada com alho, louro, cravinho, cominhos e cebola. Em alguns casos acrescenta-se arroz.
- A linguiça (Figura 1D) é um produto fumado, feito de suíno e gorduras, condimentada com cebola, alho, entre outros.
- A farinheira (Figura 1E) é um produto fumado, constituído por gordura de porco, farinha de trigo, vinho branco, colorau, sal e pimenta.
- O salpicão (Figura 1F) é também um produto fumado. É uma mistura de lombo de porco (ou outras partes magras), gordura rija, colorau, alho, louro e vinho.

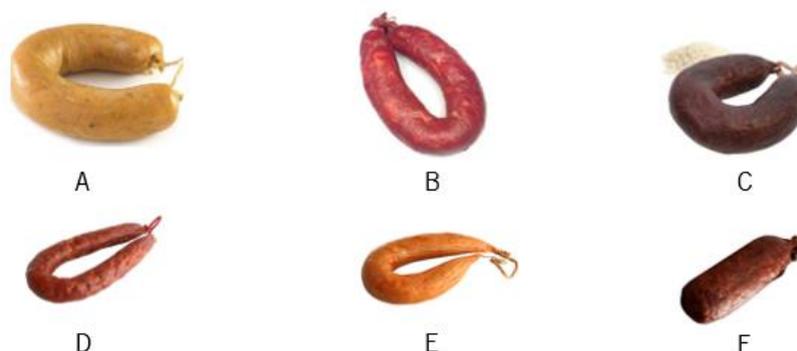


Figura 1 – Representação de alguns enchidos: A– Alheira; B– Chouriço; C–Morcela; D– Linguiça; E– Farinheira; F– Salpicão.

No geral, os enchidos tradicionais portugueses, como os restantes enchidos, são fabricados, na sua maioria, com carne de suíno e gordura. E diferentes enchidos tem na sua composição diferentes condimentos (sal, alho, pimenta, etc.) que são de extrema importância para as características organolépticas do produto. Para além desta importância, foi demonstrado que estes condimentos possuem um papel relevante na inibição de microrganismos deteriorantes e patogénicos (Marcos, Viegas, Almeida, & Guerra, 2016).

2.1.2. Processo de fabrico dos enchidos

Embora o processo de fabrico dos enchidos atualmente seja maioritariamente industrial, este baseia-se nos processos de fabrico tradicionais. As mudanças que foram realizadas ao processo tradicional baseiam-se na mecanização dos processos, que permite que a produção seja contínua e não dependa das condições ambientais. Para além disso, a produção de enchidos baseia-se na estabilização da matéria-prima, onde se pretende que o produto se torne estável à

temperatura ambiente, sem que haja desenvolvimento de microrganismos que tornem o produto impróprio para consumo, e no desenvolvimento das características sensoriais (Almeida, 2009).

A produção de enchidos compreende as seguintes fases principais: escolha/seleção da carne e da gordura a utilizar; miga/corte da carne; preparação da mistura e dos temperos; maturação; enchimento e atadura; processamentos térmicos – fumagem e/ou secagem; tratamentos térmicos (Marcos, Viegas, Almeida, & Guerra, 2016).

Na etapa de seleção, tal como o nome indica, são selecionadas as diferentes carnes a utilizar bem como as gorduras. Esta seleção deverá permitir uma fração de carne e gordura equilibrada, uma vez que a quantidade de gordura afeta a maciez, a suculência e o sabor dos produtos. Para além disso, mantém a humidade nas fibras musculares, permitindo que as fermentações que ocorrem na fase de cura sejam mais rápidas (Marcos, Viegas, Almeida, & Guerra, 2016).

A etapa seguinte consiste na redução de tamanho das matérias-primas selecionadas, de modo a facilitar a mistura com os restantes ingredientes. Dependendo do tipo de enchido pretendido, o corte pode ser em pedaços maiores ou menores.

Segue-se a mistura, e nesta fase são adicionados ao preparado obtido da etapa de corte, ingredientes específicos de cada tipo de enchido. A mistura deve permitir obter uma massa homogénea, no entanto, não deve ser excessiva para não haver incorporação de ar na massa, que iria facilitar o crescimento bacteriano e a oxidação das gorduras (Rodrigues, 2013).

A mistura homogénea obtida é deixada em repouso para que ocorra a maturação. Nesta fase ocorre a difusão do sal nos pedaços de carne e conseqüentemente perda de água. Ocorre também a extração de proteínas miofibrilares, o que torna os pedaços de carne mais viscosos e contribuem para a ligação das massas. Para além disso, nesta fase há desenvolvimento microbiano que liberta produtos do metabolismo para a massa, interferindo no sabor do produto (Elias, Fraqueza, & Barreto, 2005). Ocorre ainda fermentação láctica, que confere ao produto um sabor mais ácido. Esta fermentação pode ocorrer de forma espontânea ou através da adição de culturas *starter*, sendo mais comum ocorrer de forma espontânea (Roseiro, et al., 2019).

De seguida ocorre o enchimento da tripa com o produto. Esta tripa pode ser natural ou artificial e a escolha recai sob a que melhor se adapta às características do produto final pretendido, bem como dos processos a que ainda será sujeito. Este invólucro tem como objetivo dar forma e tamanho à massa e, além disso, proteger de contaminações externas, sendo que o

próprio invólucro não pode ser uma fonte de contaminação (Marcos, Viegas, Almeida, & Guerra, 2016). Depois do enchimento, segue-se o processamento térmico.

A cura é uma técnica usada para prolongar a vida útil de produtos alimentícios e é a última fase na preparação dos enchidos, podendo ser realizada por fumagem e/ou secagem (Marco, Navarro, & Flores, 2006). Os processos físicos, químicos, bioquímicos e microbiológicos que tiveram início na fase de maturação serão continuados nesta fase, dando origem a um produto com características organolépticas e de conservação distintas do produto inicial (Elias, Fraqueza, & Barreto, 2005). Em Portugal, a cura está quase sempre associada ao processo de fumagem (Marcos, Viegas, Almeida, & Guerra, 2016).

A fumagem é uma das técnicas mais antigas utilizadas na conservação dos enchidos (Mendes, 2013). Esta técnica consiste na colocação dos enchidos em câmaras ou fumeiros onde são sujeitos à ação do fumo resultante da combustão de madeira. Esta madeira pode ser de azinho, faia, entre outros. O fumo atua sobre os enchidos através da sua composição e da sua temperatura. Para além de compostos com características conservantes, o fumo confere também sabor ao enchido. O fumo contém componentes fenólicos que conferem alguma proteção à oxidação das gorduras. A duração e a temperatura da fumagem variam com o tipo de enchido (Carvalho, 2010) (Almeida, 2009).

De acordo com a temperatura atingida pelo fumo há fumagem a frio, quando a temperatura não ultrapassa os 30-40 °C, e fumagem a quente, onde a temperatura pode chegar a 70-90 °C (Mendes, 2013). Independentemente de a temperatura ser mais ou menos elevada, ocorre desidratação do produto, contribuindo para a redução do crescimento microbiano.

Assim, a fumagem confere cor, sabor e aroma diferenciados aos enchidos, favorecendo também a preservação do mesmo devido às propriedades desidratantes, bactericidas e antioxidantes (Škaljac, et al., 2018).

Por sua vez, a secagem, tal como a fumagem, é um dos métodos mais antigos de preservação dos alimentos. Neste processo, os enchidos são colocados em câmaras onde parte da água do produto irá evaporar. Esta redução de água diminui a ação das enzimas, promove a redução de peso e volume dos enchidos, reduzindo o espaço necessário para armazenamento, bem como os custos de transporte, e ainda diminui o crescimento microbiano. No entanto, a remoção de água afeta as propriedades sensoriais e nutricionais dos enchidos, pelo que a remoção tem de ser controlada de modo a manter um equilíbrio, evitando que o enchido fique demasiado seco ou com humidade a mais (Grau, Andres, & Barat, 2014).

Durante o processo, é importante controlar as condições ambientais, como a temperatura, a humidade e a ventilação, de modo a manter-se um equilíbrio entre a evaporação superficial e a desidratação interna. Se a desidratação for muito rápida há um endurecimento precoce do enchido. Dependendo do tipo de enchido e das condições ambientais, a duração da secagem pode ir de 10 a 120 dias (Almeida, 2009).

A presença de gordura nos produtos contribui para o decréscimo na taxa de secagem pois funciona como uma barreira que impede a saída de alguma quantidade de água do produto, permitindo que o produto não fique demasiado seco (Grau, Andres, & Barat, 2014).

O enchido pode ainda ser sujeito a um tratamento térmico. Este tratamento térmico garante, em alguns casos, a eliminação de microrganismos patogénicos através da aplicação do binómio temperatura/tempo para um determinado microrganismo.

No final do processo produtivo, o enchido é então embalado de acordo com o cliente a que se destinam. Pode ser embalado a vácuo ou em atmosfera modificada. A embalagem a vácuo é um dos métodos mais antigos e consiste na criação de um ambiente anaeróbio, não permitindo que microrganismos aeróbios se multipliquem, nem a oxidação da mioglobina. No entanto, ocorre a conversão da oximioglobina a desoximioglobina na ausência de O_2 , o que provoca a alteração da cor vermelha para roxa (McMillin, 2017) (O'Sullivan & Kerry, 2010). Por sua vez, o embalamento em atmosfera modificada consiste na alteração da composição do ar atmosférico através da adição de uma mistura gasosa adequada. Esta mistura gasosa permite inibir o crescimento microbiano bem como a oxidação da carne. Normalmente, esta mistura contém dióxido de carbono, oxigénio e azoto (Venturini, Contreras-Castillo, & Faria, 2009).

A embalagem destina-se a proteger o produto de contaminações, aumentando assim a sua vida útil. Para além disso, a embalagem deve conter informações legais e de orientação para o consumidor e não devem reagir com o produto (Coma, 2008).

2.1.3. Características Físico-químicas dos enchidos

A qualidade bem como a segurança de um alimento pode ser avaliada através das suas propriedades físicas e químicas. Assim, os enchidos podem ser caracterizados através do pH e da a_w , que se alteram ao longo do processo de fabrico e que variam consoante o tipo de enchido.

Cerca de 75 % da carne crua é água, mas nem toda é água livre. Assim, a a_w é um parâmetro que permite avaliar a fração de água disponível nos enchidos. Esta água disponível permite a multiplicação microbiana, sendo por isso a a_w utilizada como um indicador útil da estabilidade microbiológica dos alimentos. Além disso, a a_w tem influência nos mecanismos

químicos e bioquímicos dos alimentos, como a oxidação lipídica, alteração da cor e textura, perda de nutrientes e alteração na atividade enzimática (Maneffa, et al., 2017).

Os valores de a_w podem variar entre 0 e 1, e quanto menor o valor maior a estabilidade do alimento. Fatores como o pH, o potencial oxidação-redução, a temperatura e a presença de certas substâncias (como o sal) aumentam a sua ação inibitória (Almeida, 2009).

De acordo com o valor da a_w , os alimentos podem ser divididos em 3 grupos:

- Alimentos de humidade elevada: $0.90 < a_w < 1.00$
- Alimentos de humidade intermédia: $0.60 < a_w < 0.90$
- Alimentos de humidade reduzida: $a_w < 0.60$

A maioria dos enchidos tradicionais portugueses tem uma a_w entre 0.87 e 0.90, pelo se são alimentos de humidade intermédia. Estes alimentos podem ser armazenados sem recurso a temperaturas mais baixas (Mendes, 2013).

A acidez dos alimentos pode ser medida através da medição do pH, e o valor varia entre 1 e 14. Um alimento é tanto mais ácido quanto menor for o valor do pH. Tal como a a_w , o pH também tem efeito inibitório na multiplicação de microrganismos. Esta inibição é tanto maior, quanto menor for o pH. Assim, produtos com uma maior acidez, possuem uma maior estabilidade (Mendes, 2013).

O pH da carne crua de suíno, varia entre 5.6 e 6.0. Este valor decresce durante o processo de fabrico do enchido, devido à formação de ácido láctico durante a fermentação láctica, podendo atingir um valor de 4.5 (Almeida, 2009).

2.1.4. Contaminações microbiológicas

Bactérias, fungos e protozoários são os contaminantes microbiológicos mais comuns. O desenvolvimento destes contaminantes põe em causa a segurança e a qualidade dos alimentos (Asefa, et al., 2010). Se por um lado os microrganismos podem contaminar e deteriorar os alimentos, tornando-os impróprios para consumo, estes também podem ser importantes no processo de fabrico de outros alimentos, como por exemplo, no fabrico de alimentos fermentados (Fung D. Y., 2010). A contaminação de um alimento e a consequente multiplicação dos microrganismos indesejáveis é um problema, uma vez que pode levar à deterioração do produto, para além de ser perigoso para a saúde do consumidor, ainda mais se os microrganismos envolvidos forem bactérias patogénicas (Bernardi, Garcia, & Copetti, 2019).

A multiplicação de microrganismos nos enchidos é influenciada por fatores como a temperatura, a a_w , o pH, a disponibilidade de oxigénio e os nutrientes presentes. Os principais grupos de microrganismos existentes nos enchidos são os microrganismos halotolerantes, bactérias ácido-láticas, bolores e leveduras (Almeida, 2009).

A temperatura tem influência no desenvolvimento dos microrganismos, na medida em que cada microrganismo tem uma temperatura ótima para a sua multiplicação. A a_w , sendo que exprime a água disponível, tem influência no desenvolvimento dos microrganismos, uma vez que a água é essencial para o seu crescimento (Maneffa, et al., 2017). Relativamente ao oxigénio, se não houver oxigénio disponível, os microrganismos aeróbios não se vão desenvolver.

Os microrganismos presentes nos enchidos provêm da carne, dos restantes ingredientes, do meio ambiente nas instalações da empresa, dos equipamentos e dos operários da empresa. O pH ácido (4.5 – 6) e a a_w inferior a 0.9, dificultam o crescimento microbiano nos enchidos (Gioia, et al., 2016). O tratamento térmico elimina grande parte destes microrganismos. Pelo que é após o tratamento térmico que os produtos são contaminados pelos microrganismos presentes no próprio ar. Durante a permanência dos enchidos nas câmaras de climatização os fungos presentes no ar depositam-se na sua superfície, contaminando o produto.

Fungos

Os fungos são microrganismos eucariotas, heterotróficos, onde se incluem os fungos filamentosos (bolores) e leveduras (Baptista & Venâncio, 2003).

A grande dispersão dos bolores e leveduras no ambiente deve-se ao facto de estes conseguirem proliferar em ambientes com condições mais extremas, como baixos valores de a_w , pH e temperatura. Ao contrário das bactérias, que precisam de uma a_w superior a 0.9 para se desenvolver, os fungos conseguem multiplicar-se com uma a_w menor. No entanto, não inferior 0.6. Os fungos crescem com relativa rapidez em ambientes mais ácidos e toleram valores de pH entre 2.5 e 9.5. Relativamente à temperatura ótima de crescimento dos fungos, esta varia entre 25-30 °C, para a temperatura mínima, e 40-45 °C, para a temperatura máxima (Baptista & Venâncio, 2003).

Sendo os enchidos produtos ácidos e com uma a_w mais reduzida, os fungos são a principal causa de deterioração destes produtos à base de carne (Asefa, et al., 2010).

A qualidade das matérias-primas e os fatores físicos como temperatura e a a_w foram relatados como fatores importantes para o crescimento de fungos na superfície dos enchidos (Asefa, et al., 2010). Este crescimento, se for extenso, pode levar ao desenvolvimento de sabor

estranho, alteração da textura bem como à contaminação do produto com micotoxinas, uma vez que algumas das espécies de fungos associadas aos produtos de carne são capazes de produzir micotoxinas quando encontram as condições ótimas (Sørensen, Jacobsen, Nielsen, Frisvad, & Koch, 2008).

A presença destas micotoxinas nos produtos cárneos não é desejável, uma vez que são metabolitos secundários que tem efeitos tóxicos relevantes à saúde do consumidor. Entre estes compostos destacam-se: aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, esterigmatocistina e verrucosidina. Estas micotoxinas são muito tóxicas e têm efeitos carcinogénicos e teratogénicos. Todos esses compostos podem ser produzidos por diferentes espécies dos géneros: *Aspergillus* e *Penicillium* (Bernáldez, et al., 2013). Estes dois géneros são as mais mencionadas quando se fala em deterioração de produtos cárneos (Bernardi, Stefanello, Garcia, & Copetti, 2021).

O ar foi descrito como a principal fonte de esporos de fungos que contaminam os enchidos (Asefa, et al., 2010) (Parussolo, et al., 2019) (Bernardi, Garcia, & Copetti, 2019). Estes fungos, para além de entrarem nos ambientes industriais pelo próprio ar, entram também através de matérias-primas contaminadas. Já no interior das instalações são libertados para o ar, e com o tempo tendem a depositar, tanto na superfície dos produtos produzidos como na superfície dos equipamentos. Já nas superfícies, encontrando condições adequadas de humidade e temperatura, multiplicam-se com mais facilidade. Por este motivo, torna-se importante e necessário o controlo da qualidade das matérias-primas e o cumprimento das boas práticas de higiene.

O ar das empresas de processamento de carne contém muitas partículas microscópicas, às quais os fungos se podem fixar, que são transportadas para os vários ambientes da empresa, incluindo as câmaras de maturação e a zona da embalagem (Helm-Archer, Kerth, Jones, McCaskey, & Conner, 2004). Por esse motivo, um controlo da carga microbiana do ar nas câmaras de maturação do produto, e nos restantes locais em que o produto está exposto ao ar, é uma das melhores formas de reduzir o aparecimento de fungos nos enchidos, de modo a garantir uma maior segurança alimentar (Bernardi, Garcia, & Copetti, 2019).

2.2. Segurança alimentar

Segurança alimentar é o conjunto de todas as medidas necessárias a adotar durante a produção, o armazenamento, a distribuição e a preparação dos alimentos de modo a garantir que estes alimentos sejam seguros ao consumo humano (WHO, 1984). De acordo com um estudo publicado em 2015 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que todos os anos,

ocorram cerca de 600 milhões de novos casos de doenças transmitidas por alimentos não seguros e cerca de 420 000 mortes (Mota, et al., 2021). Para além do risco à saúde dos consumidores, os alimentos inseguros causam impactos económicos negativos a quem o produz, seja pela perda do produto, seja pela perda de confiança dos consumidores no produto e em quem o produz. Um exemplo de perda económica causada por alimentos inseguros foi a epidemia de *Escherichia coli* na Alemanha, que em 2011 causou cerca de 1.3 milhões de dólares de prejuízos, desde as indústrias até aos agricultores (ONU, 2015).

A segurança alimentar engloba então 4 conceitos principais: *Food Safety*, *Food Security*, *Food Fraud* e *Food Defence*. O primeiro consiste em reduzir/eliminar a contaminação não intencional de modo a garantir um alimento livre de contaminações, o segundo consiste em garantir o acesso aos alimentos em quantidade e qualidade suficientes para se manter um estilo de vida saudável, o terceiro está relacionado em enganar os consumidores em relação à autenticidade do produto de modo a obter um maior lucro económico, o quarto e último conceito consiste em eliminar a contaminação intencional.

O HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) surge com o objetivo de controlar a qualidade dos produtos alimentares, prevenindo a contaminação cruzada dos mesmos através da aplicação de medidas técnicas e científicas durante a produção e a manipulação dos produtos alimentares (Gaare & Mishra, 2021). Estas medidas implementadas previamente têm como objetivo eliminar os perigos, quer sejam biológicos, físicos e/ou químicos, garantindo um alimento seguro para o consumidor. O HACCP foi inicialmente criado pela Pillsburg juntamente com a NASA e com o U.S. Army Laboratories na década de 60, com o objetivo de desenvolver metodologias para entregar alimentos de forma segura aos astronautas da NASA. Só a partir da década de 70 é que o HACCP foi aplicado nas indústrias, e atualmente já faz parte da legislação de vários países, incluindo a União Europeia (ASAE, 2021).

Dada a importância da segurança alimentar, a União Europeia (UE) criou um conjunto de medidas de modo a garantir a segurança dos produtos alimentares, bem como a assegurar a confiança dos consumidores. A 28 de janeiro de 2002, publicou o Regulamento (CE) n.º 178/2002, do Parlamento Europeu e do Conselho, que determina os princípios e as normas gerais da legislação alimentar, cria a European Food Safety Authority (EFSA) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Mais tarde surge o Regulamento (CE) n.º 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, que estabelece requisitos gerais de higiene a serem respeitados pelas empresas do setor alimentar. Segundo este

regulamento, a responsabilidade pela segurança alimentar é dos operadores das empresas que devem seguir uma abordagem preventiva implementando um programa de HACCP, de modo a assegurar que a segurança alimentar não seja comprometida. Este regulamento estabelece ainda que é necessário minimizar a contaminação transportada pelo ar, pelo que o monitoramento do ar pode ser incluído no programa HACCP implementado na empresa. Por sua vez, o Regulamento (CE) n.º 1441/2007 da Comissão, de 5 de dezembro de 2007, surge para estabelecer os critérios microbiológicos aplicáveis aos produtos alimentares. Assim, a validação do sistema HACCP pode ser realizada através da verificação do cumprimento dos critérios microbiológicos estabelecidos no regulamento.

Em Portugal, pelo Decreto-Lei n.º 237/2005, de 30 de dezembro de 2005, criou-se a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). A ASAE é a responsável pela fiscalização do cumprimento da legislação por parte das atividades alimentares. É também responsável pela avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar, sendo o organismo nacional de ligação com outras entidades semelhantes quer a nível europeu como a nível internacional.

2.3. Qualidade do ar interior

Cerca de 80% a 90% do tempo das pessoas é passado dentro de instalações (Lima & Venâncio, 1999). Assim, a qualidade do ar interior está diretamente ligada com a qualidade de vida dos seus ocupantes. Por este motivo, a preocupação em manter uma boa qualidade do ar interior tem vindo a aumentar consideravelmente (Saraga, Pateraki, Papadopoulos, Vasilakos, & Maggos, 2011).

Um ar interior de boa qualidade melhora o bem-estar das pessoas e a saúde dos seus colaboradores refletindo na produtividade dos mesmos. Por sua vez, um ar interior de baixa qualidade pode causar vários problemas de saúde, como alergias, doenças respiratórias, dores de cabeça e irritação dos olhos aos ocupantes. Para além disso, e especificando no caso das indústrias alimentares, é importante que o ar envolvente seja de boa qualidade para que o produto alimentar produzido seja também de qualidade e seguro para o consumo, uma vez que o ar foi descrito como a principal fonte de esporos de fungos que contaminam os enchidos (Jones, 1999) (Asefa, et al., 2010) (Parussolo, et al., 2019) (Bernardi, Garcia, & Copetti, 2019). A perda de produtos produzidos devido à contaminação por fungos conduz a uma perda económica por parte das empresas bem como à perda de confiança por parte do consumidor.

A qualidade do ambiente interior depende de um grande número de fatores como a temperatura, a humidade, a velocidade do ar, existência ou não de odores, concentração de microrganismos no ar, ruído entre outros. Pelo que é um conceito muito abrangente. Estes fatores podem ser agrupados em várias áreas, e uma delas é a qualidade do ar. Vários fatores afetam diretamente a qualidade do ar interior, tais como as fontes de contaminação, a ventilação, a climatização (temperatura), a humidade, a atividade interna, e o próprio ambiente externo (Saraga, Pateraki, Papadopoulos, Vasilakos, & Maggos, 2011). Pelo que a qualidade ambiental interna envolve o ajuste da temperatura, da ventilação e da humidade, bem como a manutenção dos valores limite para os vários contaminantes do ar interior.

Um dos vários poluentes encontrados em ambientes interiores são os microrganismos, destes os mais comuns são as bactérias e os fungos. A variedade e a concentração dos mesmos aumentam com o número de ocupantes do espaço. Relativamente aos fungos, a presença destes varia consoante a estação do ano, sendo superior no outono e no verão (Abreu, 2010).

De modo a garantir a segurança dos ocupantes dos edifícios, o Decreto-Lei n.º 79/2006, de 4 de abril de 2006, aprovou o regulamento dos sistemas energéticos de climatização em edifícios (RSECE) que impôs condições de monitorização e auditorias periódicas dos edifícios referentes ao consumo de energia e à qualidade do ar interior. Este decreto-lei foi atualizado e substituído pelo Decreto-Lei n.º 118/2013, de 20 de agosto de 2013. Em dezembro de 2020 foi aprovado um novo regulamento, que substitui o regulamento anterior, o Decreto-Lei n.º 101-D/2020. De entre as várias mudanças que foram realizadas ao decreto, uma delas foi a eliminação da obrigatoriedade da realização de auditorias periódicas à qualidade do ar interior. No entanto, mantem-se a necessidade de se controlar as fontes de poluição e de se adotar medidas preventivas, de modo a se cumprir os requisitos legais para a redução de possíveis riscos para a saúde dos ocupantes do edifício.

De acordo com a legislação em vigor (Decreto-Lei n.º 101-D/2020), é crucial manter valores mínimos de caudal de ar novo por espaço e valores limite para as concentrações de poluentes do ar interior, de modo a salvaguardar a saúde e o bem-estar dos ocupantes dos edifícios. O decreto estabelece ainda que passa a privilegiar-se a ventilação natural em vez da artificial, o que reduz os custos com os edifícios, uma vez que há uma otimização de energia e recursos.

Assim, a Portaria n.º 138-G/2021, estabelece os valores mínimos de caudal de ar novo por espaço e os valores limite, bem como as condições de referência, para os vários poluentes do

ar interior dos edifícios. Na tabela 1 são apresentados os valores limites para as partículas em suspensão (PM10 e PM2.5), para os compostos orgânicos voláteis, o monóxido de carbono, o formaldeído, o dióxido de carbono, e o radão. São ainda apresentados os valores limites para a concentração do benzeno, o tricloroetileno, o tolueno, o estireno e o tetracloroetileno, no caso de se verificar uma concentração de COVs inferior à estabelecida na tabela. Por sua vez, na tabela 2 são apresentadas as condições de referência para os poluentes microbiológicos, bem como o valor limite para algumas espécies em específico tendo em conta o nível de perigosidade que cada uma apresenta.

Para a análise dos poluentes físico-químicos devem ser utilizados sistemas de medição que estejam de acordo com as normas CEN, normas ISO, normas nacionais ou normas internacionais. No caso das análises microbiológicas, estas devem ser realizadas por laboratórios acreditados para o efeito. De modo a ser possível realizar as análises microbiológicas ao ar interior, torna-se necessário em primeiro lugar recolher o ar a analisar – amostragem.

Tabela 1 – Valores limite e margem de tolerância para os contaminantes físico-químicos do ar interior

Poluentes	Valores limite	Unidades	Margem de tolerância (%)
Partículas em suspensão (PM10)	50	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	100
Partículas em suspensão (PM2.5)	25	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	100
Compostos orgânicos voláteis totais (COVs)	600	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	-
Monóxido de carbono (CO)	10	mg/m^3	100
Formaldeído (CH ₂ O)	100	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	-
Dióxido de carbono (CO ₂)	2250	mg/m^3	30
Radão	300	Bq/m^3	-

Adaptado de Portaria n.º 138-G/2021, de 1 de julho de 2021.

Tabela 2 – Valores limite e condições de referência para os poluentes microbiológicos

Condições de referência/ Valores limite de UFC	
Fungos	Concentração de fungos no interior inferior à concentração de fungos no exterior
Espécies comuns	Mistura de espécies, excluindo as produtoras de micotoxinas, com concentração inferior a 500 /m ³
Espécies pouco comuns	Cada espécie com concentração inferior a 50 /m ³ Mistura de espécies com concentração inferior a 150 /m ³
Espécies patogénicas	Ausência de qualquer espécie
Espécies toxinogénicas	Cada espécie com concentração inferior a 12 /m ³

Adaptado de Portaria n.º 138-G/2021, de 1 de julho de 2021.

2.3.1. Aerossóis microbianos

Aerossóis são suspensões de partículas microscópicas transportadas pelo ar. No setor alimentar, as mais relevantes são os bioaerossóis ou aerossóis microbianos (Masotti, Cattaneo, Stuknytė, & Noni, 2019). Os aerossóis microbianos consistem num conjunto de partículas de origem biológica transportados pelo ar com um tamanho que pode variar até 100 µm de diâmetro e que obedecem aos princípios da gravitação, eletromagnetismo, turbulência e difusão, o que dificulta a amostragem do ar (Lima & Venâncio, 1999). Estes podem estar no ar apenas como partículas microbianas ou podem formar agregados com outras partículas, modificando o seu tamanho e condicionando o comportamento aerodinâmico. Partículas menores irão demorar mais tempo a depositar (Górny, 2020).

Uma vez que os microrganismos estão em abundância no meio ambiente, as partículas destes podem ligar-se às poeiras no ar formando os aerossóis microbianos. Em ambientes internos, a atividade humana também é uma fonte de aerossóis microbianos. A formação de partículas microbianas varia de acordo com vários fatores físicos e biológicos. Dos fatores físicos, a temperatura é a mais relevante uma vez que afeta diretamente a taxa metabólica dos microrganismos. Os fatores biológicos têm a ver com as características de cada espécie (Górny, 2020).

Os aerossóis microbianos podem incluir bactérias, esporos de fungos e leveduras (Masotti, Cattaneo, Stuknytė, & Noni, 2019). De acordo com Lima & Venâncio (1999) existem poucas

espécies de fungos presentes no ar das indústrias, sendo as mais comuns: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* e *Aspergillus*. No que diz respeito às bactérias, as mais comuns são *Bacillus* e *Clostridium* em forma de endosporos e exósporos, e *Micrococcus* e *Staphylococcus* como células vegetativas de bactérias (Masotti, Cattaneo, Stuknytė, & Noni, 2019).

Apesar de os microrganismos presentes no ar poderem ser facilmente transportados pelo mesmo, a maioria não se consegue reproduzir no próprio ar, uma vez que este não oferece as condições favoráveis, como os nutrientes necessários e a humidade. No entanto podem preservar a sua viabilidade, bem como todas as suas propriedades biológicas o tempo suficiente para se depositarem numa superfície e a contaminar. Essa superfície pode ser um produto podendo afetar a qualidade do mesmo (Masotti, Cattaneo, Stuknytė, & Noni, 2019). Assim, a contaminação do ar nas indústrias alimentares constitui um problema para a qualidade dos produtos nelas produzidos (Helm-Archer, Kerth, Jones, McCaskey, & Conner, 2004).

De modo a garantir uma maior segurança, tanto para a saúde humana como para os produtos alimentares, torna-se necessário avaliar os aerossóis microbianos presentes no ar ambiente. Esta avaliação pode ser feita através da amostragem ao próprio ar, que irá permitir quantificar as partículas microbianas presentes num determinado volume de ar, bem como identificar os agentes microbianos. Detetar precocemente os focos de contaminação, permite adotar medidas eficazes de modo a reduzir a contaminação do ar e das superfícies e conseqüentemente reduzir a contaminação dos produtos alimentares, protegendo os mesmos da deterioração, aumentando o tempo de prateleira (Bernardi, Stefanello, Garcia, & Copetti, 2021).

Para diminuir os aerossóis microbianos no ar torna-se necessário implementar medidas, tais como a diminuição da humidade relativa, a redução ou eliminação de fontes de humidade, manutenção de níveis de higiene elevados, limpeza dos filtros dos sistemas de filtração entre outros. Para além disso, outros métodos, como a ozonização (injeção de ozono no ar) mostraram ser eficazes na redução de fungos em aerossóis microbianos (Serra, Abrunhosa, Kozakiewicz, Venâncio, & Lima, 2003).

2.3.2. Amostragem

Para avaliar a quantidade de fungos, presentes no ar, a que os enchidos estão expostos torna-se necessário quantificar as partículas microbianas presentes no mesmo. Esta avaliação pode ser feita através de amostragem ao ar. Os métodos tradicionais existentes avaliam apenas a quantidade de microrganismos viáveis, por esse motivo não é possível saber a quantidade total de partículas microbianas a que os enchidos estão expostos (Górny, 2020). Uma vez que não existe

um procedimento estabelecido de amostragem ao ar, este pode ser escolhido por quem a realizou (Napoli, Marcotrigiano, & Montagna, 2012). Assim, para a realização da amostragem ao ar, há duas técnicas que podem ser utilizadas (amostragem passiva ou ativa). No caso de se optar por uma amostragem ativa, há diversos tipos de amostradores e conseqüentemente diferentes tipos de amostragens. No entanto, a maioria dos métodos disponíveis representam apenas aproximações da concentração de fungos e bactérias (Silva, Presgrave, Moraes, & Delgado, 2012). De notar ainda que de acordo com Napoli, Marcotrigiano, & Montagna (2012), vários estudos compararam os valores das cargas microbianas obtidos através de amostragens ativa e passiva tendo os resultados sido inconsistentes, se nuns casos havia correlação significativa entre os dois métodos, noutros casos não havia correlação. Para além disso, diferentes amostradores ativos possuem uma elevada variabilidade entre si, apresentando valores diferentes no mesmo lugar e ao mesmo tempo. Por estas duas razões, a comparação dos resultados de diferentes estudos fica dificultada.

De acordo com Sveum, Moberg, Rude, & Frank (1992), os vários métodos existentes para amostragens ao ar podem ser agrupados em métodos de sedimentação, contacto com um meio sólido (agar) ou líquido, filtração, centrifugação e precipitação eletrostática.

A sedimentação é um exemplo de monitorização passiva por não requerer o uso de um amostrador de ar (Silva, Presgrave, Moraes, & Delgado, 2012). Esta consiste em colocar placas de Petri com meio de cultura em exposição no local a ser monitorizado, por um determinado período de tempo, e depois colocadas a incubar para permitir o crescimento das colónias e posterior contagem. Este método é muito limitado uma vez que só permite visualizar partículas viáveis que sedimentam e que se fixam na superfície durante o tempo em que a placa esteve em exposição, não permitindo visualizar partículas de menores dimensões suspensas no ar. Por ser um método que depende apenas da ação gravitacional, está sujeito a variações causadas pela movimentação do ar (Silva, Presgrave, Moraes, & Delgado, 2012). Para além disso, a monitorização passiva, contrariamente à amostragem ativa, não permite a seleção de volumes específicos de ar, pelo que os resultados obtidos serão expressos em unidades formadoras de colónias por unidade de tempo. Assim, este método apenas é útil para analisar qualitativamente os microrganismos, permitindo também monitorizar contaminação de superfícies, como o caso da superfície dos enchidos.

Por sua vez, para fazer a monitorização ativa do ar é necessário usar um amostrador de ar (Silva, Presgrave, Moraes, & Delgado, 2012). Por ser utilizado um amostrador de ar onde se

conhece o volume de ar amostrado, os resultados obtidos serão quantitativos. Diferentes amostradores irão coletar o ar de diferentes formas, o que se traduz em diferentes métodos de amostragens já mencionados.

Os amostradores centrífugos, utilizam a força centrífuga para fazer o ar passar pelo amostrador e coletar as partículas microbianas. Estes amostradores não geram um fluxo de ar muito elevado pelo que o stress mecânico causado nas partículas microbianas é menor quando comparado com os amostradores de impacto (Sveum, Moberg, Rude, & Frank, 1992).

Nos métodos de amostragem por filtração, o ar é forçado a passar por uma membrana filtrante através de uma bomba ou vácuo. Coletam partículas de todos os tamanhos, dependendo do filtro utilizado e da sua porosidade. São úteis para avaliar quantitativamente fungos e esporos de bactérias. No entanto, devido à desidratação causada pela filtração, pode não ser eficaz para a contagem de células vegetativas (Sveum, Moberg, Rude, & Frank, 1992).

Na precipitação eletrostática, o amostrador confere uma carga às partículas e estas são coletadas numa superfície com carga contrária (Sveum, Moberg, Rude, & Frank, 1992).

Nos amostradores de impacto com um meio líquido, o impacto com o meio pode danificar as células microbianas presentes no ar, diminuindo a viabilidade das mesmas e consequentemente alterar os valores dos resultados obtidos, para além de poder dispersar aglomerados aumentando o número de colónias na contagem (Sveum, Moberg, Rude, & Frank, 1992). Para além disso, para tempos de amostragem muito longos, as células podem-se multiplicar no meio líquido utilizado, alterando os resultados.

Relativamente aos amostradores de impacto com um meio sólido, o ar nestes aparelhos é forçado a passar por uma placa perfurada, no caso de amostradores de peneira, ou através de uma fenda estreita, se for um amostrador de fenda, e embate na placa com o meio de cultura sólido que se encontra no interior do dispositivo. O stress mecânico causado pelo impacto pode danificar as células microbianas, reduzindo a viabilidade (Sveum, Moberg, Rude, & Frank, 1992). No final da amostragem, a placa pode ser colocada a incubar diretamente. Após a incubação efetua-se a contagem de colónias. Este tipo de amostradores, são capazes de operar com volumes elevados, permitindo monitorizar a qualidade do ar em salas onde a carga microbiana é muito reduzida.

2.3.3. Valores limite permitidos e/ou recomendados

A fixação de valores limite/recomendados para o número de microrganismos no ar, constituem uma ferramenta útil na avaliação quantitativa dos resultados obtidos das amostragens realizadas ao ar.

Nesse sentido e com o objetivo de garantir uma maior segurança a nível microbiológico no interior dos edifícios, a Portaria n.º 138-G/2021, de 1 de julho de 2021, ao abrigo do Decreto-Lei n.º 101-D/2020, de 7 de dezembro de 2020, estabelece valores de referência de qualidade do ar interior em Portugal. No regulamento está estabelecido um valor limite para as *UFC* (unidades formadoras de colónias) de espécies comuns de fungos de 500 por m^3 . De notar que estes valores não são específicos para indústrias alimentares.

A *American Public Health Association* (APHA) adota as recomendações propostas pela NASA. São ainda definidos 3 níveis de limpeza, cada um com níveis de exigências diferentes (100, 10 000 e 100 000 – Tabela 3), onde o nível 100 corresponde ao nível mais exigente e utilizado para produção de microchips, por exemplo. Os valores propostos têm também em consideração duas técnicas diferentes de amostragem, sedimentação e através de amostradores de ar (Sveum, Moberg, Rude, & Frank, 1992).

A indústria alimentar, pode ser enquadrada no nível 100 000. Assim, para este nível, e no caso de ser utilizado um amostrador de ar nas amostragens, o ar encontra-se com níveis microbiológicos satisfatórios se o valor de *UFC* não ultrapassar os 88.4 por m^3 (tabela 3) (Andrade, Silva, & Brabes, 2003).

Tabela 3 – Valores de *UFC* adotados pela APHA - contaminação microbiológica

	Níveis de limpeza		
	100	10 000	100 000
<i>UFC/m³</i> (Impressão)	3.5	17.6	88.4
<i>UFC/cm²</i> por semana (Sedimentação)	1.3	6.5	32

Fonte: adaptado de (Sveum, Moberg, Rude, & Frank, 1992)

No entanto, os valores propostos pela NASA e adotados pela APHA também não são específicos para a indústria alimentar.

Pela falta de valores específicos para a indústria alimentar, vários autores sugerem valores limite através dos seus próprios estudos. De destacar Fung, que através de estudos relacionados com a qualidade microbiológica do ar em ambientes de processamento alimentar, desenvolveu a

escala de Fung que pode ser usada de forma generalizada na microbiologia alimentar tanto para bactérias como para fungos (Al-Dagal & Fung, 1993).

A escala de Fung também contém 3 níveis de aceitabilidade para a quantidade de UFC presentes no ar (tabela 4): de 0 a 100 por m^3 o ar é considerado limpo; de 100 a 300 por m^3 o ar é aceitável; e acima de 300 por m^3 o ar é considerado não aceitável (Fung D. Y., 2002).

Tabela 4 – Escala de Fung – contaminação microbiológica

Valores em UFC por m^3	Nível de aceitação
0 a 100	Ar limpo
100 a 300	Ar aceitável
>300	Não aceitável

Fonte: adaptado de (Al-Dagal & Fung, 1993)

2.4. Desinfecção

2.4.1. Nebulização

A nebulização é uma forma de tratar superfícies através do ar. É um tratamento final, uma vez que deve ser realizado após a limpeza das superfícies, pois permite alcançar áreas inacessíveis, como superfícies muito altas ou fechadas. Este tratamento, dependendo do produto utilizado deve ocorrer sem presença humana para que não haja riscos para a saúde do utilizador, e sem presença de produtos alimentares (Diversey, 2021) (Betelgeux, 2021).

A nebulização consiste na projeção de um produto de desinfecção, este produto pode ser diluído ou puro. A projeção é feita através de um equipamento adequado, que permita formar uma neblina. Esta neblina irá atingir todas as superfícies, desinfetando-as.

A nebulização pode ser aplicada em diversas áreas, tais como na área da saúde, para o tratamento de salas de pacientes e salas de cirurgia, na indústria farmacêutica e laboratórios, em todos os locais que trabalham sob condições assépticas, em instalações de animais de laboratório de investigação e pesquisa, na indústria de cosméticos, em estabelecimentos paramédicos e estabelecimentos públicos e, finalmente, na indústria alimentar. Nesta indústria, a desinfecção através da nebulização é utilizada para tratar áreas de risco (quando previsto no HACCP). Este tratamento tem, na maioria das vezes, como objetivo evitar riscos à saúde, mas também evitar perdas económicas, eliminando os fungos (Diversey, 2021).

Após a desinfecção, é recomendado um período de espera de pelo menos uma hora. Este tempo de espera pode variar consoante o tamanho das partículas, quanto menor a partícula, maior

o tempo de espera. Para diferentes diâmetros da partícula, a velocidade da queda da partícula e a área tratada são diferentes pelo que a eficácia da nebulização depende da composição e concentração do produto e do tempo de espera (Clece, 2021).

Para se obter uma maior eficiência da desinfecção por nebulização, garantir uma maior segurança dos operadores e evitar contaminações do produto, é necessário que o local esteja fechado hermeticamente, que as superfícies estejam previamente limpas, que a umidade relativa da sala esteja entre 60 e 80 % e a temperatura entre 10 e 25 °C, que o sistema de ar condicionado e extração esteja desligado e, finalmente, que não haja operadores nem alimentos dentro do local (Diversey, 2021). Esta nebulização não substitui uma limpeza e desinfecção cuidadosas (Betelgeux, 2021).

Capítulo 3 – Metodologia

Tendo em consideração os objetivos deste estudo, o mesmo foi realizado sob a forma de um estudo de caso descritivo. Toda a fundamentação do presente trabalho foi realizada através de pesquisa bibliográfica da literatura referentes ao tema, bem como da legislação em vigor.

A parte prática deste trabalho teve como principal guia base um documento que define as metodologias a adotar para auditorias periódicas à qualidade do ar interior, a Nota Técnica NT-SCE-02. A análise dos resultados é realizada tendo em conta os valores limites estabelecidos na Portaria n.º 138-G/2021, de 1 de julho de 2021, ao abrigo do Decreto-Lei n.º 101-D/2020, de 7 de dezembro de 2020, bem como dos valores propostos pela APHA e pela Escala de Fung.

Neste trabalho foi determinada a carga microbiana de amostras de ar de várias áreas da empresa. Para isso, recorreu-se à recolha de amostras nos locais com o apoio do amostrador portátil AirTEST-Omega. As amostras foram incubadas por 7 dias, procedendo-se posteriormente à contagem das colónias visíveis nas placas de Petri.

3.1. Locais de recolha das amostras

Em primeiro lugar, foi necessário selecionar os locais onde iriam ser realizadas as amostragens. Para a seleção dos locais teve-se em consideração o processo de fabrico dos enchidos, para se perceber em que etapas do processo produtivo é que os enchidos estariam mais expostos aos microrganismos presentes no ar. Concluiu-se que esses locais seriam as salas de climatização do produto (clima 1 e clima 5), onde o produto permanece a secar até ser embalado, o corredor (zona existente entre as salas de climatização), onde o produto fica por vezes armazenado, e a embalagem, local onde os produtos estão expostos antes de serem embalados. Em todos estes locais, o produto está exposto ao ar depois de já ter sido alvo de pelo menos um tratamento térmico. O clima 5 foi dividido em duas zonas (a e b) devido às suas dimensões e por aclimatizar diferentes tipos de produtos nas duas zonas. Relativamente ao corredor e à embalagem, embora o produto permaneça nestas duas zonas um curto período de tempo em comparação com o tempo que o mesmo fica na zona dos climas, são dois locais onde há um maior tráfego de operários e conseqüentemente são locais onde pode ocorrer contaminações cruzadas mais facilmente. De notar que ambas as câmaras de climatização têm uma temperatura definida para 18 °C. No entanto a humidade relativa definida no clima 1 é diferente da do clima 5, sendo de 60% no primeiro e 70% no segundo.

3.2. Preparação dos meios de cultura

A utilização de um meio de cultura num amostrador de ar por impacto com um meio sólido é crucial. A escolha do meio de cultura a utilizar estará sempre dependente do objetivo do trabalho, uma vez que diferentes meios de cultura favorecem o crescimento de diferentes fungos filamentosos (Santos, Venâncio, & Lima, 1998).

Muitas vezes, a identificação de fungos filamentosos tem como base as características morfológicas, por esse motivo é importante utilizar meios de cultura padrão, uma vez que a morfologia dos fungos varia consoante o meio utilizado (Santos, Venâncio, & Lima, 1998). Por esse motivo, para se comparar dois fungos que cresceram em matrizes diferentes, torna-se necessário fazer crescer o mesmo fungo em matrizes iguais. Por exemplo, para comparar fungos filamentosos que cresceram nos enchidos com os fungos que cresceram num determinado meio de cultura, é preciso inocular os fungos dos enchidos no meio de cultura em questão.

Os meios de cultura para o crescimento de fungos, para além de terem de ser nutricionalmente adequados, devem inibir o crescimento de bactérias. Para isso utiliza-se antibióticos adequados nos meios com pH neutro, ou utilizam-se meios com pH ácido. Retardar o crescimento de espécies invasoras e promover a formação de colónias compactas é essencial para facilitar a contagem de colónias (Santos, Venâncio, & Lima, 1998).

Para este trabalho, optou-se por utilizar 2 meios de cultura: MEA (Malt Extract Agar) e DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar).

O meio de cultura à base de agar com diclorano, rosa de bengal e cloranfenicol (DRBC), é apropriado à enumeração de fungos filamentosos e leveduras que crescem em alimentos frescos (frutas, legumes, carnes e lacticínios). A elevada atividade da água aumenta o aparecimento de bactérias e de fungos com um crescimento rápido, sendo por isso necessário utilizar diclorano e o antibiótico. O diclorano inibe o crescimento de fungos invasores e o rosa de bengal retarda o crescimento das colónias. Finalmente, o cloranfenicol é um antibiótico que inibe o crescimento de bactérias (Santos, Venâncio, & Lima, 1998).

O meio de cultura de agar de extrato de malte (MEA) é o meio de cultura mais simples para a enumeração da maioria das leveduras responsáveis pela deterioração de alimentos, por apresentar muitos nutrientes disponíveis. Para além disso, o seu baixo valor de pH, reduz o crescimento de bactérias (Santos, Venâncio, & Lima, 1998).

Entre estes dois meios (DRBC e MEA), se os fungos filamentosos estiverem presentes em maior número do que as leveduras, o meio mais adequado a se utilizar é o meio de cultura DRBC (Santos, Venâncio, & Lima, 1998).

Para a preparação de 500 mL de meio de cultura DRBC, pesou-se a quantidade indicada na embalagem do meio e juntou-se 500 mL de água esterilizada. Dissolveu-se o meio na água e levou-se ao autoclave a 121 °C durante 20 min para eliminar quaisquer contaminações. Após sair do autoclave, foi colocado na estufa a 50 °C para arrefecer o meio, mas não ao ponto de solidificar. Com o meio a 50 °C suplementou-se, assepticamente, com cloranfenicol que irá inibir o crescimento de bactérias presentes nas amostras de ar (Schuller, 1998). Depois de suplementado, colocou-se o meio em placas de 55 mm, deixou-se solidificar e colocou-se as tampas nas placas. Todo o processo efetuado após o meio sair da estufa foi realizado numa câmara de fluxo laminar de modo a evitar contaminações do meio. Em caso de contaminações, começam a aparecer microrganismos nas placas mesmo estas estando fechadas.

Por sua vez, para a preparação de 500 mL de meio de cultura MEA, pesou-se 10 g de extrato de malte, 0.5 g de peptona, 10 g de glucose, 10 g de agar e juntou-se 500 mL de água esterilizada (Schuller, 1998). Praticamente todo o processo posterior foi idêntico ao realizado para a preparação do meio DRBC, excetuando a suplementação com cloranfenicol, que neste caso não foi realizada.

3.3. Amostragem

O amostrador utilizado neste trabalho foi o o AirTEST Omega (figura 2).



Figura 2 – AirTEST Omega.

AirTest Omega é então um amostrador de ar por impacto com um meio sólido em peneira. O ar é forçado a passar pelo crivo de recolha, ficando as partículas microbianas retidas no meio de cultura. Este dispositivo permite a utilização de placas de Petri de 55 mm ou 90 mm de

diâmetro. Possui uma taxa de fluxo de 100 L/min, volumes reguláveis de 10 L a 1000 L com intervalos de 10 L e apenas recolhe partículas com granulometria a partir de 0.3 μm . Para a recolha de amostras, o equipamento pode ser colocado em 3 posições diferentes, podendo ainda ser colocado num tripé (figura 3), que permite que o aparelho seja colocado a uma altura de recolha entre 0.50 m e 2.50 m e num ângulo da horizontal à vertical entre 0° e 90°.

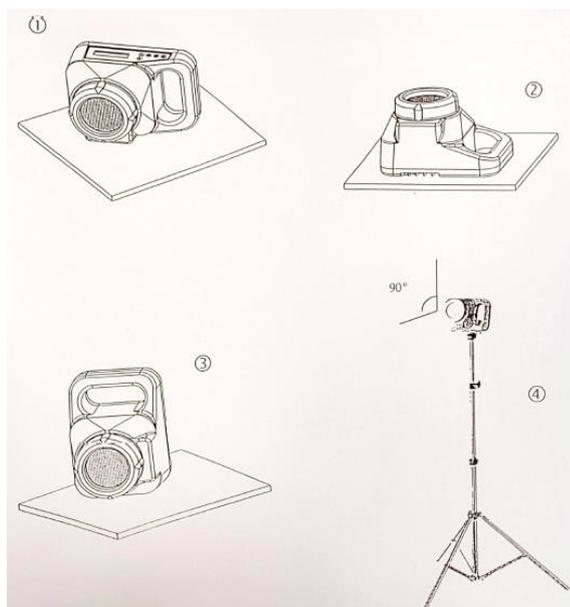


Figura 3 – Posições de recolha.

Com os meios de cultura prontos, prosseguiu-se então para a amostragem nos diferentes locais escolhidos. Para a seleção do volume de ar a recolher mais adequado, realizou-se uma primeira amostragem de 50 L, 200 L e 1000 L (em triplicado). As placas foram incubadas por 7 dias a 25 °C, e as colónias foram contadas no final do tempo de incubação (Schuller, 1998). Através dos resultados obtidos optou-se por recolhas de 1000 L nos climas e de 200 L no corredor e na embalagem. Optou-se por recolher um volume de ar inferior no corredor e na embalagem, quando comparados com os climas, uma vez que as placas das amostragens de 500 L e 1000 L para estes dois locais apresentavam um número de colónias muito elevado, tornando-se até incontável. Assim, efetuaram-se recolhas de 1000 L nos climas utilizando o meio DRBC e o meio MEA, e recolhas de 200 L no corredor e na embalagem utilizando os mesmos meios de cultura. Todas as recolhas de ar foram realizadas em triplicado. O amostrador durante todas as amostragens, foi colocado a uma distância de 1.5m do chão, através da utilização de um tripé. A figura 4 representa de forma esquemática a posição em que o mesmo foi colocado durante as recolhas de ar em todos os locais.



Figura 4 – Representação esquemática da posição do dispositivo durante a recolha de amostras

No final de cada amostragem, as placas foram incubadas durante 7 dias a 25 °C. No final dos 7 dias, efetuou-se a contagem das colónias (Schuller, 1998).

Uma vez que a amostragem foi efetuada num curto espaço de tempo não será possível concluir como ocorre e se ocorre variação em diferentes estações do ano. Será sim possível, fazendo uma amostragem a diferentes locais, comparar os resultados dos diferentes locais e ainda comparar resultados de diferentes semanas de modo a verificar se as variações que ocorrem são aleatórias ou se seguem uma tendência em algum sentido. Com o objetivo de se verificar se a temperatura e a humidade relativa das salas de climatização têm influência nos resultados das mesmas, efetuou-se o registo da temperatura e da humidade relativa antes de se efetuar a amostragem.

A amostragem foi realizada durante os meses de março, abril, maio e junho.

3.4. Desinfecção

Foi ainda realizada uma desinfecção, de acordo com as recomendações do fornecedor do dispositivo utilizado, ao clima 1. Para esta desinfecção utilizou-se o dispositivo New Jet (figura 5). Neste dispositivo, colocou-se 1.5 L de Viragri Plus e 3.5 L de água. Deixou-se o dispositivo a realizar a nebulização no clima 1 até todo o conteúdo do depósito ser totalmente gasto.



Figura 5 – New Jet.

3.5. Inoculação de fungos dos enchidos

Posteriormente, foram inoculados fungos da superfície dos enchidos no meio de cultura DRBC, previamente preparado, com o objetivo de se perceber, através de comparação visual, se os fungos que cresciam nos enchidos são da mesma espécie dos fungos visualizados nas placas de Petri incubadas. Para isso, transferiu-se parte da colônia em crescimento no enchido para as placas com meio de cultura através de uma ansa de inoculação. As placas de Petri inoculadas foram incubadas a 25 °C. No final, comparou-se visualmente as colônias das placas de Petri inoculadas com fungos dos enchidos com as colônias das placas de Petri resultantes das amostragens de ar.

3.6. Tratamento dos resultados

Os resultados obtidos através da contagem de colônias, foram colocados numa folha Excel. Já na folha Excel, foram tratados.

Com o objetivo de se comparar os resultados obtidos nas diferentes áreas da empresa, efetuou-se um teste Wilcoxon entre o clima 1 e o clima 5a; o clima 1 e o clima 5b; o clima 5a e o clima 5b; o corredor e a embalagem. O teste serviu para perceber se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os locais estudados.

Para se perceber se existiram diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos antes e depois da desinfecção do clima 1, efetuou-se o teste Mann-Whitney. Este teste também foi realizado para se verificar se existiam diferenças entre os valores obtidos com o meio de cultura DRBC e o MEA.

Finalmente, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson, de modo a perceber a relação entre os resultados dos diferentes locais analisados, bem como a influência da

temperatura e da humidade dos climas nos resultados. Os valores do coeficiente de Pearson variam entre +1 e -1. Quando mais próximo de 0, menor a relação entre os resultados. Valores positivos traduzem uma correlação positiva em que ambos os resultados aumentam ou diminuem. Se o coeficiente for negativo, um conjunto de resultados diminui enquanto o outro aumenta.

Capítulo 4 – Apresentação e discussão dos resultados

As amostragens de ar ambiente foram realizadas em 5 locais diferentes da empresa, no clima 1; em duas zonas do clima 5 (a e b); no corredor; e na zona da embalagem. Em todos os locais foram usados os meios de cultura DRBC e MEA.

As amostragens no clima 1 foram realizadas duas vezes por semana, excetuando no mês de maio em que apenas se retirou amostras uma vez por semana. Realizaram-se no total 20 amostragens (10 com meio DRBC e 10 com o meio MEA) antes da desinfecção por nebulização, que se realizou no dia 27 de maio de 2021, e mais 20 amostragens (10 com meio DRBC e 10 com o meio MEA) após a desinfecção. No clima 5, para ambas as zonas (a e b), recolheu-se ar 16 vezes com o meio DRBC e 16 vezes com o meio MEA. Relativamente ao corredor e à embalagem, para cada zona e para cada meio de cultura, realizaram-se 14 amostragens, fazendo um total de 28 amostragens em cada local. Cada amostragem foi realizada em triplicado. Pelo que o valor apresentado será o valor médio das 3 contagens. As amostragens com o meio DRBC foram realizadas em dias diferentes das amostragens com o meio MEA. Os valores apresentados serão ainda analisados tendo em conta a legislação portuguesa, os valores adotados pela APHA e de acordo com a escala de Fung.

4.1. Contagem de microrganismos nas zonas selecionadas

Inicialmente, efetuou-se a contagem de unidades formadoras de colónias presentes nas placas.

Na tabela 5 e 6, são apresentados os valores de *UFC* lidos, obtidos para o clima 1, clima 5a, clima 5b, corredor e para a embalagem, para o meio DRBC e para o meio MEA, respetivamente. De notar que, como cada amostragem foi efetuada em triplicado, o valor apresentado em ambas as tabelas, representa a média dos 3 valores obtidos da contagem de *UFC* das placas.

Tabela 5 – Número de unidades formadoras de colónias obtidos para o clima 1, clima 5a, clima 5b, corredor e embalagem para o meio DRBC

Clima 1	Clima 5a	Clima 5b	Corredor	Embalagem
UFC/m^3	UFC/m^3	UFC/m^3	UFC/m^3	UFC/m^3
10.3 ±10.1	13.0 ±13.7	28.0 ±13.1	311.7 ±29.3	1301.7 ±40.4
14.3 ±17.1	18.0 ±7.2	56.3 ±67.7	743.3 ±84.6	178.3 ±20.8
8.7 ±0.6	96.0 ±5.3	113.2 ±4.0	385.0 ±56.8	498.3 ±42.5
53.0 ±13.0	113.7 ±15.6	105.0 ±11.4	216.7 ±15.3	775.0 ±178.0
123.3 ±62.8	113.3 ±32.6	63.0 ±25.5	133.3 ±35.1	63.3 ±2.9
79.3 ±24.1	154.7 ±18.6	118.3 ±7.4	100.0 ±5.0	30.0 ±13.2
13.0 ±7.9	88.3 ±0.6	63.0 ±14.4	190.0 ±17.3	155.0 ±122.8
22.7 ±4.9	51.0 ±4.6	39.0 ±7.2	311.7 ±102.8	165.0 ±5.0
10.0 ±0.0	46.0 ±1.7	45.3 ±2.3	165.0 ±13.2	51.7 ±16.1
143.7 ±3.2	71.3 ±7.1	55.3 ±8.3	196.7 ±46.5	98.3 ±20.2
117.7 ±85.3	44.7 ±9.0	31.7 ±7.6	310.0 ±57.7	66.7 ±15.3
24.0 ±12.2	95.7 ±17.4	88.7 ±12.9	1258.3 ±83.3	431.7 ±28.9
17.0 ±6.1	92.7 ±23.0	117.3 ±90.6	531.7 ±156.7	133.3 ±27.5
18.7 ±13.4	91.7 ±8.1	214.7 ±13.5	176.7 ±29.3	18.3 ±7.6
19.7 ±7.4	129.7 ±25.8	147.7 ±17.9		
24.3 ±2.3	25.3 ±2.3	29.3 ±5.5		
25.3 ±17.1				
245.0 ±7.8				
12.3 ±.12				
3.7 ±1.5				

Tabela 6 – Número de unidades formadoras de colónias obtidos para o clima 1, clima 5a, clima 5b, corredor e embalagem para o meio MEA

Clima 1	Clima 5a	Clima 5b	Corredor	Embalagem
UFC/m^3	UFC/m^3	UFC/m^3	UFC/m^3	UFC/m^3
11.7 ±8.0	30.3 ±8.5	23.3 ±4.2	98.3 ±30.1	191.7 ±63.3
9.7 ±2.9	77.3 ±7.5	63.0 ±5.6	593.3 ±27.5	91.7 ±14.4
17.0 ±10.6	39.7 ±4.6	55.3 ±4.5	180.0 ±121.2	173.3 ±56.9
39.3 ±14.6	173.3 ±3.1	93.7 ±21.0	540.0 ±45.8	1301.7 ±20.8
36.0 ±20.7	75.3 ±11.9	77.3 ±24.8	100.0 ±30.0	86.7 ±2.9
47.7 ±25.7	104.0 ±19.2	99.0 ±17.1	116.7 ±48.0	26.7 ±2.9
6.0 ±3.6	38.0 ±3.0	23.3 ±3.8	111.7 ±20.8	46.7 ±20.2
39.0 ±14.4	71.0 ±7.0	54.7 ±4.0	96.7 ±27.5	71.7 ±23.6
14.7 ±7.6	28.3 ±7.5	27.3 ±2.9	161.7 ±40.1	166.7 ±78.5
81.0 ±9.2	71.0 ±28.0	33.3 ±11.5	90.0 ±5.0	448.3 ±304.6
32.3 ±18.0	109.0 ±33.7	56.3 ±9.6	180.0 ±34.6	71.7 ±30.6
9.3 ±4.9	59.0 ±30.8	25.0 ±3.6	375.0 ±130.3	125.0 ±15.0
13.3 ±8.8	33.7 ±11.6	25.0 ±6.1	431.7 ±191.4	548.3 ±27.5
8.0 ±2.6	52.0 ±5.3	41.7 ±7.4	205.0 ±34.6	60.0 ±31.2
41.3 ±17.5	195.0 ±5.6	184.7 ±24.0		
35.0 ±9.2	92.3 ±36.4	36.0 ±11.4		
49.7 ±46.9				
201.7 ±23.3				
10.7 ±7.4				
27.0 ±30.0				

Pela tabela 5 e 6, verifica-se que, quer para o meio DRBC quer para o meio MEA, o valor mais elevado ocorreu na zona da embalagem, apresentando valores de $1301.7 \pm 40.4 \text{ UFC}/m^3$ e $1301.7 \pm 20.1 \text{ UFC}/m^3$, respetivamente. O valor mais baixo para ambos os meios, ocorreu no clima 1, sendo de $3.7 \pm 1.5 \text{ UFC}/m^3$ para o meio DRBC e $6.0 \pm 3.6 \text{ UFC}/m^3$ para o meio MEA.

A zona da embalagem, de todas os locais que foram analisados, é a única zona em que estão sempre presentes operadores da empresa, e o tráfego de operadores é mais elevado quando comparado com os outros locais. De acordo com Górný (2020) os operadores são uma fonte ativa de contaminação microbológica do ar, pelo que esta pode ser uma das razões do valor da carga

microbiana ser mais elevado neste local. Além da respiração libertar microrganismos para o ar, o próprio movimento dos operadores, aumenta a turbulência do ar, voltando a suspender nele partículas microbianas depositadas. Estes dois fatores aumentam a carga microbiana no ar.

No que toca ao valor mais baixo da carga microbiana do ar, este ocorreu no clima 1, para ambos os meios. O clima 1 foi a zona mais pequena analisada. Geralmente encontra-se com as portas fechadas, com uma temperatura e humidade relativa controlada, favorecendo o controlo microbiológico (Górny, 2020). Aquando da amostragem, onde se obtiveram os valores mais baixos, as portas apenas foram abertas para entrar e sair do clima. Por sua vez, o valor mais elevado coincidiu com o dia em que o clima estava desativado e com as portas abertas.

Outros estudos ao ar foram realizados na empresa, tendo-se obtido para o clima 1 valores de *UFC* entre 2 e 100 e para o clima 5 valores de *UFC* entre 1 e 90. Estas análises foram feitas através da exposição de placas de Petri com meio DRBC, durante 15 min. Pelo que o método das amostragens (passivo) não coincide com o do presente estudo, o que impossibilita a comparação dos resultados obtidos dos dois estudos.

De um modo geral, e como se verifica pela tabela 7, apenas 5 % dos valores não se encontram em conformidade com o que a portaria n.º 138-G/2021 estabelece. Para o meio de cultura DRBC, 95 % dos valores estão em conformidade e para o meio de cultura MEA 95 % dos valores estão em conformidade.

Considerando agora os valores adotados pela APHA, pela tabela 7 verifica-se que para o meio de cultura DRBC e MEA, apenas 48 % e 61 % das amostras, respetivamente, estão em conformidade. No total, apenas 54 % das amostras estão em conformidade. De notar que a zona do corredor não apresentou um único resultado abaixo do limite adotado pela APHA, tanto para um meio de cultura como para o outro. Dos 3 critérios de avaliação adotados, o critério da APHA é o que apresenta um limite mais rígido, pelo que por este critério a percentagem de não conformidade será maior.

Tabela 7 – Classificação dos resultados segundo a legislação portuguesa e APHA

	DRBC		MEA		Total	
	Conforme	Não conforme	Conforme	Não conforme	Conforme	Não conforme
Legislação	95 %	5 %	95 %	5 %	95 %	5 %
APHA	48 %	52 %	61 %	39 %	54 %	46 %

Na tabela 8 é apresentada a classificação dos resultados obtidos de acordo com a escala de Fung. Verifica-se que para o meio DRBC 55 % das amostras enquadram-se no nível de aceitação de ar limpo, 31 % no nível de ar aceitável e apenas 14 % no nível não aceitável. Relativamente ao meio MEA, este apresentou 70 % das amostras no nível de aceitação de ar limpo, 21 % no ar aceitável e 9 % acima dos níveis de aceitabilidade. De todos os critérios adotados, a escala de Fung é a única específica para as indústrias alimentares.

Tabela 8 – Classificação dos resultados de acordo com a escala de Fung

Nível de aceitação	DRBC	MEA	Total
Ar limpo <100 UFC/m^3	55 %	70 %	63 %
Ar aceitável 100 a 300 UFC/m^3	31 %	21 %	26 %
Ar não aceitável >300 UFC/m^3	14 %	9 %	11 %

4.1.1. Meio DRBC

No gráfico da figura 6 são apresentados os valores obtidos das amostragens com o meio de cultura DRBC realizadas no clima 1, clima 5a e clima 5b, bem como o limite estabelecido pela legislação portuguesa, o limite recomendado pela APHA e os vários níveis de aceitabilidade da escala de Fung.

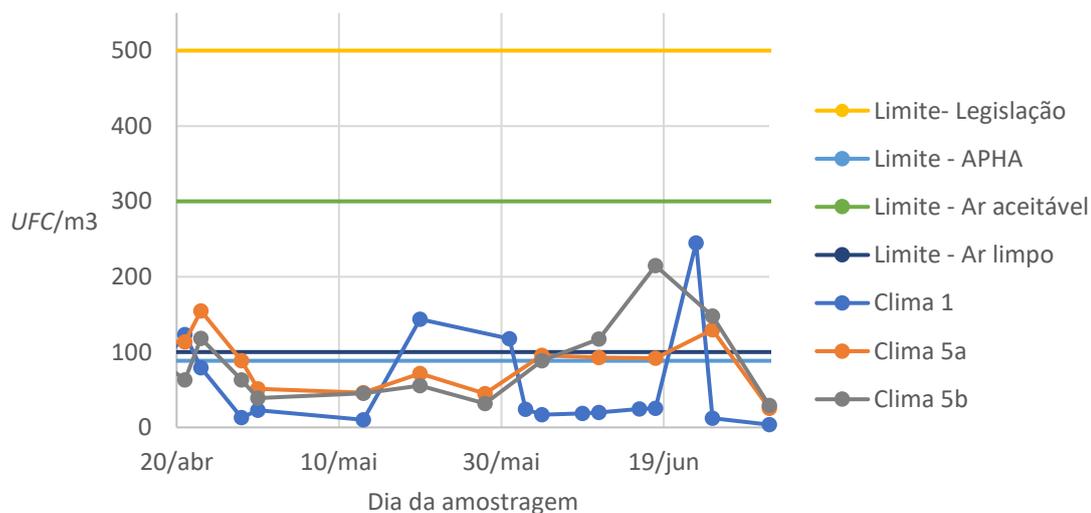


Figura 6 – Carga fúngica no ar por unidade de volume, no clima 1, no clima 5a e no clima 5b, e sua conformidade com os valores legislados e recomendados (Escala de Fung (ar limpo e ar aceitável) e APHA) para o meio DRBC

Analisando o gráfico da figura 6, verifica-se que todos os resultados obtidos se encontram abaixo do limite estabelecido na legislação portuguesa. Há, no entanto, um valor mais elevado no clima 1 que ocorreu no dia em que este local se encontrava desligado e com a porta aberta, permitindo a contaminação do clima 1 pelo corredor, uma vez que o corredor apresenta valores muito superiores ao clima 1 e com o passar do tempo as partículas microbianas tendem a dispersar para zonas onde a concentração é menor (Heldman, 1974).

De acordo com Heldman (1974), o sistema de ventilação também é uma fonte de aerossóis microbianos, principalmente quando o ambiente é totalmente fechado e não estão presentes outras fontes de contaminação conhecidas. Para além de o ar utilizado nos sistemas de ventilação ter uma certa quantidade de carga microbiana, a turbulência causada no ar da sala quando a ventilação se ativa, pode aumentar momentaneamente as partículas suspensas no ar e consequentemente aumentar os valores obtidos nas amostragens. Isto foi verificado, por exemplo, no clima 1 na amostragem do dia 21/04, com o meio de cultura DRBC, onde na primeira amostra se obteve um valor de 74 UFC/m³, na segunda 195 UFC/m³ e na terceira 97 UFC/m³. A ventilação ligou-se no final da primeira amostragem e desligou-se ainda antes de se iniciar a terceira.

Analisando agora os resultados tendo em consideração o limite recomendado pela APHA e pela escala de FUNG, verifica-se que todos os resultados se encontram abaixo do limite de ar aceitável de acordo com a escala de FUNG. No entanto há a ocorrência de um valor mais elevado no clima 5b (para além do já mencionado do clima 1) e esse valor coincide com o dia em que a porta do clima se abriu inúmeras vezes durante a amostragem. Entre o nível de ar aceitável e ar limpo encontram-se 14 valores e abaixo do limite para ar limpo há 38 valores. Finalmente, há 19 resultados acima do limite adotado pela APHA.

No gráfico da figura 7, são apresentados os valores obtidos das amostragens com o meio de cultura DRBC realizadas no corredor e na embalagem, bem como o limite estabelecido pela legislação portuguesa, o limite recomendado pela APHA e os vários níveis de aceitabilidade da escala de FUNG.

Pela figura 7, é possível verificar que o corredor apresenta 3 valores acima do limite estabelecido pela legislação portuguesa. Por sua vez, a embalagem apresenta 2 valores acima do estabelecido.

Há ainda 11 resultados acima do limite de ar aceitável, pela escala de FUNG. Entre o limite de ar aceitável e ar limpo existem 11 resultados, e abaixo do limite de ar limpo há 6 resultados.

Destes, 5 resultados estão abaixo do limite adotado pela ALPHA. Estes 5 resultados foram todos obtidos na embalagem.

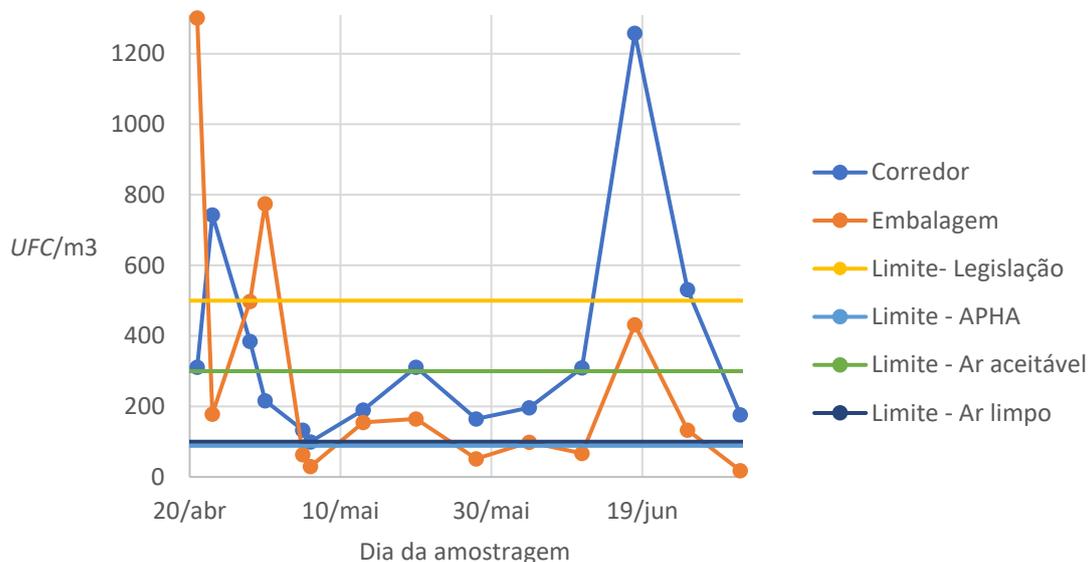


Figura 7 – Carga fúngica no ar por unidade de volume, no corredor e na embalagem, e sua conformidade com os valores legislados e recomendados (Escala de Fung (ar limpo e ar aceitável) e APHA) para o meio DRBC

Comparando os valores obtidos na zona dos climas (cima 1, clima 5a e clima 5b) com a zona do corredor e da embalagem, verifica-se que o corredor e a embalagem apresentam mais valores acima dos valores limites. Tal pode estar relacionado com o facto de a zona dos climas ser um local mais controlado, com controlo de humidade relativa e de temperatura e com menos presença e circulação de operários.

De notar que, para todas as zonas analisadas, os resultados obtidos apresentam uma grande variação, não apresentando nenhuma tendência

4.1.2. Meio MEA

No gráfico da figura 8 são apresentados os valores obtidos das amostragens com o meio de cultura MEA realizadas no clima 1, clima 5a e clima 5b, bem como o limite estabelecido pela legislação portuguesa, o limite recomendado pela APHA e os vários níveis de aceitabilidade da escala de Fung.

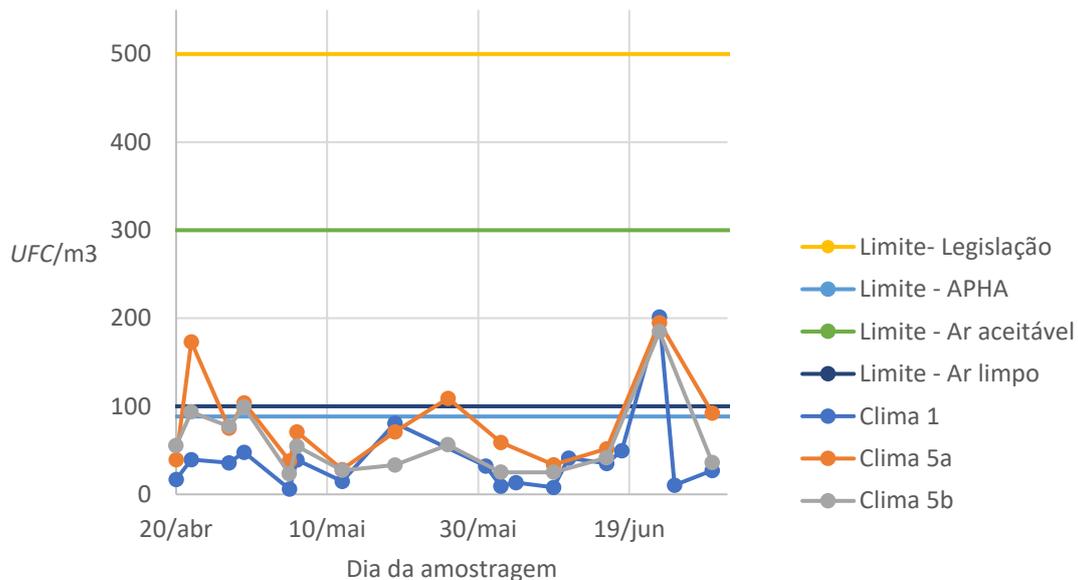


Figura 8 – Carga fúngica no ar por unidade de volume, no clima 1, no clima 5a e no clima 5b, e sua conformidade com os valores legislados e recomendados (Escala de Fung (ar limpo e ar aceitável) e APHA) para o meio MEA

Pelo gráfico da figura 8, verifica-se que todos os resultados estão em conformidade com a legislação portuguesa. De notar, que o pico que acontece no dia 23/06 coincide com o dia em que o clima 1 esteve com a porta sempre aberta. Por sua vez, o clima 5 no dia 23/06 esteve com a porta constantemente aberta.

Analisando agora os resultados tendo em consideração os limites recomendados, verifica-se que todos os resultados se encontram abaixo do limite de ar aceitável pela escala de Fung. De notar ainda que, grande parte dos resultados obtidos encontram-se abaixo do limite adotado pela APHA. O clima 5 foi dividido em duas zonas (a e b) quando foram realizadas as amostragens. O pico que ocorre no dia 22/04 na zona a do clima pode ser explicada pela ventilação, uma vez que esta se ligou ainda durante a amostragem da zona “a” e desligou-se antes de se iniciar a amostragem na zona “b”.

No gráfico da figura 9 são apresentados os valores obtidos das amostragens com o meio de cultura MEA realizadas no corredor e na embalagem, bem como o limite estabelecido pela legislação portuguesa, o limite recomendado pela APHA e os vários níveis de aceitabilidade da escala de Fung.

Pelo gráfico, verifica-se que o corredor e a embalagem apresentam, cada um, 2 valores acima do limite estabelecido pela legislação portuguesa.

Analisando os resultados tendo em conta os limites recomendados, verifica-se que apenas 6 resultados (todos na embalagem) se encontram abaixo do limite adotado pela APHA, e 11 se

encontram abaixo do limite de ar limpo. Destes 11 resultados, apenas 3 não ocorreram na embalagem. Há 7 valores acima do limite de ar aceitável e 10 entre o ar aceitável e o ar limpo.

Comparando os valores obtidos na zona dos climas (cima 1, clima 5a e clima 5b) com a zona do corredor e da embalagem, verifica-se que o corredor e a embalagem apresentam mais valores acima do valor limite, como acontece com os resultados obtidos com o meio de cultura DRBC pelo que as razões são as mesmas.

Todos os resultados obtidos nos diferentes locais, apresentam uma grande variação, não apresentando nenhuma tendência, tal como acontece nos resultados obtidos com o meio de cultura DRBC.

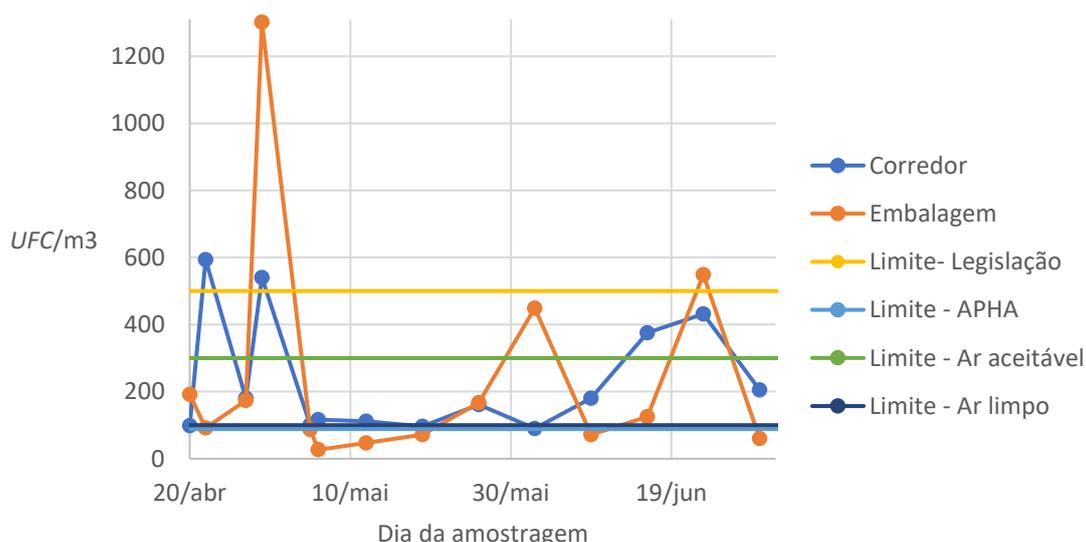


Figura 9 – Carga fúngica no ar por unidade de volume, no corredor e na embalagem, e sua conformidade com os valores legislados e recomendados (Escala de Fung (ar limpo e ar aceitável) e APHA) para o meio MEA

4.2. Comparação entre os meios de cultura DRBC e MEA

Na tabela 9 são apresentados os valores médios obtidos para cada local, bem como o desvio padrão. Pelo teste Mann-Whitney, efetuado no Excel, obtêm-se o *p-value* (tabela 9). Através da análise ao *p-value*, verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois meios de cultura (clima 1, clima 5a, corredor e embalagem), uma vez que *p-value* > 0.05. O clima 5b é o único local onde existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois meios de cultura (*p-value* < 0.05), apresentando, em média, valores superiores com o meio de cultura DRBC.

Tabela 9 – Valores médios da carga fúngica expressos em UFC/m³ obtidos com os diferentes meios nos diferentes locais e respetivo *p-value*

Meio de cultura	UFC/m ³		<i>p-value</i>
	DRBC	MEA	
Clima 1	37.1±43.9	38.9±49.3	0.806
Clima 5a	80.0±41.9	76.0±49.7	0.512
Clima 5b	85.6±51.3	57.4±43.4	0.037
Corredor	359.3±311.1	234.3±175.0	0.114
Embalagem	283.3±364.7	243.6±340.6	0.946

4.3. Comparação dos valores obtidos nos diferentes locais

Nas tabelas 10 e 11 são apresentados os valores médios obtidos para cada local analisado, bem como o desvio padrão, para as amostragens com o meio DRBC e com o meio MEA, respetivamente. Nas mesmas tabelas é ainda indicado o *p-value* dos locais que foram comparados.

Tabela 10 – Valores médios da carga fúngica expressos em UFC/m³ obtidos nos diferentes locais e respetivo *p-value* – Meio DRBC

UFC/m ³					<i>p-value</i>
Clima 1	Clima 5a	Clima 5b	Corredor	Embalagem	
37.1±43.9	80.0±41.9	—	—	—	0.004
37.1±43.9	—	85.6±51.3	—	—	0.022
—	80.0±41.9	85.6±51.3	—	—	0.890
—	—	—	359.3±311.1	283.3±364.7	0.172

Pela tabela 10, verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre o clima 1 e o clima 5a e 5b (*p-value* <0.05). O clima 1 apresentou valores inferiores quando comparado com os climas 5a e 5b. É de esperar que os resultados obtidos sejam inferiores no clima 1 quando comparados com o clima 5, uma vez que o clima 5 apresentou em média, valores superiores de humidade relativa em relação ao clima 1. Para além disso, sendo um clima maior, contém mais produto, o que aumenta o número de vezes em que as portas são abertas para se ir buscar produto para embalar ou expedir. Por sua vez, o clima 5a e o clima 5b não apresentam valores com diferenças estatisticamente significativas (*p-value* >0.05). O mesmo acontece entre

os valores obtidos no corredor e na embalagem que não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} > 0.05$) o que pode estar relacionado com o facto de estes dois locais estarem em contacto direto, sem nenhuma barreira física (porta) entre eles.

Tabela 11 – Valores médios da carga fúngica expressos em UFC/m³ obtidos nos diferentes locais e respetivo $p\text{-value}$ – Meio MEA

		UFC/m ³			$p\text{-value}$
Clima 1	Clima 5a	Clima 5b	Corredor	Embalagem	
38.9±49.3	76.0±49.7	–	–	–	0.000
38.9±49.3	–	57.4±43.4	–	–	0.018
–	76.0±49.7	57.4±43.4	–	–	0.004
–	–	–	234.3±175.0	243.6±340.6	0.583

Fazendo a análise à tabela 11, conclui-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre o clima 1 e o clima 5a e 5b ($p\text{-value} < 0.05$), tendo o clima 1 apresentado valores inferiores, pelas mesmas razões já mencionadas acima. Entre o clima 5a e o clima 5b, verifica-se também diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} < 0.05$) tendo o clima 5a apresentado valores superiores. Estas diferenças estatisticamente significativas muito provavelmente estão relacionadas com a ventilação do clima. Por sua vez, os valores obtidos no corredor e na embalagem não apresentam diferenças significativas ($p\text{-value} > 0.05$).

4.4. Comparação dos valores obtidos antes e depois da desinfeção do Clima 1

Neste trabalho, foi ainda realizada uma desinfeção por nebulização ao clima 1. Com o objetivo de perceber qual a eficácia da desinfeção, efetuou-se uma análise estatística (Teste de Mann-Whitney) dos resultados obtidos (tabela 12).

Tabela 12 – Valores médios da carga fúngica expressos em UFC/m³ obtidos antes e depois da desinfeção e respetivo $p\text{-value}$

	UFC/m ³		$p\text{-value}$
	Antes da desinfeção	Depois da desinfeção	
DRBC	47.8±50.8	50.8±75.3	0.796
MEA	30.2±23.2	42.8±57.7	0.971

Analisando os valores da tabela acima, verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos antes e depois da desinfeção, para

ambos os meios utilizados ($p\text{-value} > 0.05$). Pelo que a desinfecção realizada não surtiu qualquer efeito no que toca à redução da carga microbiana do ar. O que está de acordo com a literatura que menciona que a nebulização não é uma técnica de desinfecção de ar, mas sim de superfícies (Diversey, 2021).

4.5. Correlação entre os vários locais

Na tabela 13 e 14 são apresentados os coeficientes de correlação de Pearson entre os vários locais que estão diretamente ligados ou apenas com portas a separar os espaços, para o meio DRBC e MEA, respetivamente.

Tabela 13- Coeficiente de Pearson entre diferentes locais - DRBC

	Clima 1	Clima 5b	Corredor
Clima 5a		0.622*	0.513*
Corredor	0.029	0.886*	
Embalagem			0.157

*Correlação estatisticamente significativa ($p\text{-value} < 0.05$)

Tabela 14 – Coeficiente de Pearson entre diferentes locais - MEA

	Clima 1	Clima 5b	Corredor
Clima 5a		0.852*	0.720*
Corredor	0.401	0.670*	
Embalagem			0.527

*Correlação estatisticamente significativa ($p\text{-value} < 0.05$)

Pelas tabelas 13 e 14, verifica-se que existe uma correlação positiva entre o clima 5a e o clima 5b, uma vez que o coeficiente de Pearson está entre 0 e 1, o que significa que quando o número de *UFC* aumenta num local, também aumenta no outro o que já era de esperar pois são duas zonas sem nenhuma barreira entre elas e, de acordo com Heldman (1974), as partículas microbianas tendem a dispersar, pelo que se alguma fonte faz aumentar os valores numa das zonas, os valores da outra zona vão consequentemente aumentar também. O mesmo acontece com o clima 5a e o clima 5b quando correlacionados com o corredor. Havendo mais partículas microbianas no corredor, quando as portas do clima 5 são abertas, estas têm tendência a entrar e a aumentar os resultados do clima 5. Por sua vez, não se verificou qualquer correlação significativa ($p\text{-value} > 0.05$) tanto entre o clima 1 e o corredor como entre a embalagem e o

corredor, embora o coeficiente de Pearson indique que quando um aumenta o outro aumenta também, para ambos os casos.

4.6. Influência da temperatura e da humidade relativa nos resultados obtidos

Na tabela 15 são apresentados os coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre os climas, a temperatura e a humidade relativa dos mesmos.

Tabela 15 – Coeficientes de Pearson entre os climas, a temperatura e a humidade relativa

	DRBC			MEA		
	Clima 1	Clima 5a	Clima 5b	Clima 1	Clima 5a	Clima 5b
Temperatura	-0.338	-0.132	0.118	-0.158	0.209	0.007
Humidade relativa	0.487*	0.493	0.007	0.568*	-0.290	-0.385

*Correlação estatisticamente significativa ($p\text{-value}<0.05$)

Pela tabela 15, verifica-se que apenas para no clima 1 existe uma correlação positiva entre os valores obtidos e a humidade relativa; assim, o número de UFC do clima 1 aumentou com o aumento da humidade relativa do clima, o que está de acordo com o conceito que a proliferação de fungos é favorecida com o aumento da humidade (Lima & Venâncio, 1999). Os coeficientes de Pearson entre o clima 5a e a humidade relativa (DRBC) e entre o clima 5b e a humidade relativa (MEA), traduzem uma correlação positiva e negativa, respetivamente, no entanto não é estatisticamente significativa uma vez $p\text{-value}>0.05$ em ambos os casos, tal pode estar relacionado com o facto de haver outros fatores que estejam a fazer variar o número de aerossóis microbianos presentes no ar.

4.7. Comparação visual dos bolores nos enchidos e nas placas incubadas

Uma vez que a morfologia dos fungos varia consoante a matriz onde cresce ou o meio de cultura que é utilizado, para se comparar morfologicamente os fungos torna-se necessário fazê-los crescer no mesmo meio de cultura (Santos, Venâncio, & Lima, 1998). Assim, a fim de se perceber se os fungos que aparecem nos enchidos (figura 10) são da mesma espécie dos fungos que cresceram nas placas incubadas depois das amostragens, inoculou-se fungos dos enchidos em placas de Petri e colocou-se a incubar durante 7 dias a 25 °C.



Figura 10- Enchido com fungos.

Na figura 11 é apresentada a colônia de fungos resultante da inoculação dos fungos presentes nos enchidos. Na figura 12 é apresentada o resultado obtido de uma amostragem ao clima 1, realizada no dia 02/07.

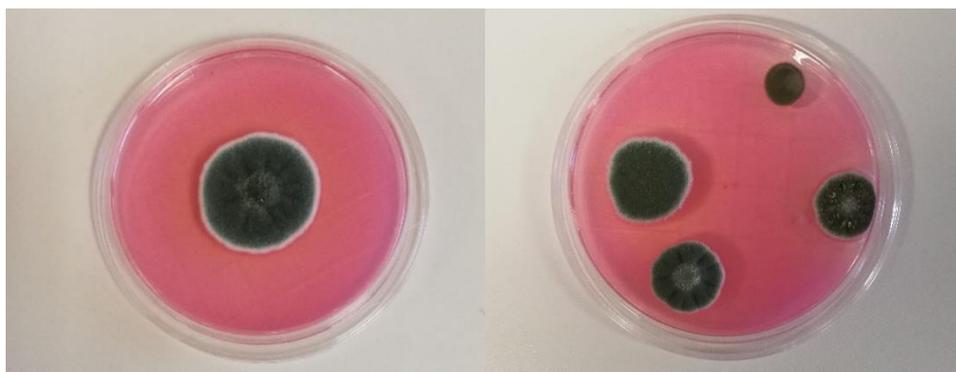


Figura 11- Colônia inoculada do enchido.

Figura 12- Amostra Clima 1 02/07.

Através da comparação morfológica das colônias apresentadas nas duas figuras é possível apenas afirmar, ainda que de forma muito grosseira, que os fungos presentes nos enchidos são do mesmo gênero de certos fungos encontrados no ar, que cresceram no meio de cultura DRBC.

Capítulo 5 – Conclusão e Recomendações

A qualidade microbiológica do ar nas salas de climatização (clima 1, clima 5a e 5b), no corredor e na embalagem, é um parâmetro importante para controlar o aparecimento de fungos nos enchidos, e o monitoramento microbiológico regular pode representar uma ferramenta útil para avaliar a qualidade ambiental da empresa e identificar situações críticas que necessitam de intervenção, de modo a corrigir o problema.

Medidas mais gerais como a manutenção de um alto nível de higiene, a redução da humidade relativa dos locais da empresa, a eliminação de fontes de humidade e a substituição periódica dos sistemas de filtração podem ser implementadas com o intuito de reduzir os aerossóis microbianos.

Os resultados obtidos foram avaliados segundo 3 critérios, a legislação portuguesa, as recomendações da APHA e a escala de Fung. Pelo critério da legislação portuguesa, 95% dos resultados estão em conformidade (abaixo de $500 \text{ UFC} / \text{m}^3$), por sua vez, pelo critério da APHA o total de conformes já decresce para 54% (abaixo de $88.4 \text{ UFC} / \text{m}^3$). Se o critério de avaliação for a escala de Fung, 63% dos valores estão abaixo de $100 \text{ UFC} / \text{m}^3$ estando por isso no nível de aceitação de ar limpo, 26% dos valores estão entre 100 e $300 \text{ UFC} / \text{m}^3$, incluindo-se no ar aceitável, e apenas 11% dos valores representam um ar não aceitável, acima de $300 \text{ UFC} / \text{m}^3$. O clima 1 foi o local que apresentou uma média de resultados menor sendo esta de $(37.1 \pm 43.9) \text{ UFC} / \text{m}^3$. O corredor e a embalagem foram os locais com valores médios mais elevados, $(359.3 \pm 311.1) \text{ UFC} / \text{m}^3$ e $(283.3 \pm 364.7) \text{ UFC} / \text{m}^3$, respetivamente.

Embora os enchidos já passem normalmente mais tempo nos climas do que na zona do corredor e da embalagem, a permanência destes nestas duas zonas deve ser restringida ao tempo estritamente necessário. O corredor e a embalagem apresentam valores médios muito mais elevados quando comparados com os climas, pelo que a redução do tempo de exposição dos enchidos ao ar nestes 2 locais conduzirá a uma redução na contaminação dos enchidos pelos fungos presentes no ar. Trocar os filtros do sistema de ventilação para filtros específicos para a retenção de fungos e manter as portas do corredor e da embalagem fechadas, são medidas que podem conduzir a uma redução no número de unidades formadoras de colónias de fungos presentes no ar nestas duas zonas e consequentemente nas câmaras de climatização também.

Pelos resultados obtidos nos climas 1, 5a e 5b, é possível concluir que a abertura das portas tem influência direta no número de unidades formadoras de colónias presentes nos

aerossóis microbianos dentro dos climas, pelo que uma maior atenção relativamente à abertura das mesmas, só abrindo quando necessário e pelo menor tempo possível, permitirá um maior controle relativamente aos fungos presentes no ar. Colocar estas zonas em pressão positiva também é uma opção válida para evitar a entrada de ar ao abrir as portas.

A desinfeção por nebulização com o produto utilizado, não mostrou ser eficiente na redução de fungos dos aerossóis microbianos pelo que outras técnicas, como a ozonização, podem ser estudadas de modo a avaliar a sua eficácia.

Apesar de a legislação portuguesa estabelecer um limite para a concentração de fungos presente no ar, este não é específico para a indústria alimentar, o que deixa muitas dúvidas quando se trata de efetuar avaliações ao ar interior.

Bibliografia

- Abreu, C. F. (2010). *O ambiente interior e a saúde dos ocupantes de edifícios de habitação*. Covilhã: Universidade da Beira Interior.
- Al-Dagal, M., & Fung, D. Y. (1993). Aeromicrobiology: An assessment of a new meat research complex. *Environmental Health*, 56(1), 7-14.
- Almeida, I. (2009). *Caracterização preliminar do micobiota de enchidos tradicionais portugueses embalados em atmosferas protetoras*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa.
- Andrade, N., Silva, R. d., & Brabes, K. (2003). Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. 27(3), 590-596.
- ASAE. (22 de Setembro de 2021). *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*. Obtido de Segurança Alimentar: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/haccp.aspx>
- Asefa, D. T., Kure, C. F., Gjerde, R. O., Omer, M. K., Langsrud, S., Nesbakken, T., & Skaar, I. (2010). Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 131-135.
- Baptista, P., & Venâncio, A. (2003). *Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos*. Forvisão.
- Bernaldez, V., Córdoba, J. J., Rodríguez, M., Cordero, M., Polo, L., & Rodríguez, A. (2013). Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage "salchichón". *Food Control*, 32(1), 69-76.
- Bernardi, A. O., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2019). Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Current Opinion in Food Science*, 29, 28-34.
- Bernardi, A. O., Stefanello, A., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2021). The control of cheese and meat product spoilage fungi by sanitizers: In vitro testing and food industry usage. *LWT*, 144.
- Betelgeux. (consultado a 27 de setembro de 2021). *Christeyns Food Hygiene*. Obtido de Desinfecção por via aérea: <https://www.betelgeux.es/pt/produtos/desinfecao-por-via-aerea/>
- Carvalho, L. (2010). *Identificação e caracterização de isolados de Staphylococcus: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa.
- Clece. (consultado a 27 de setembro de 2021). Obtido de Desinfecção por Nebulização: <https://www.clece.pt/desinfecao-por-nebulizacao/>
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1-2), 90-103.
- Decreto-Lei n.º 101-D/2020. (7 de dezembro de 2020).
- Decreto-Lei n.º 118/2013. (20 de agosto de 2013).

- Decreto-Lei n.º 79/2006. (4 de abril de 2006).
- Diversey. (consultado em 2021). *Tratamento de desinfeção por nebulização*.
- Elias, M., Fraqueza, M., & Barreto, A. (2005). Caracterização do processo de fabrico do chouriço tradicional alentejano. *Associação Portuguesa de Engenharia Zootécnica*, 13(1), 1-10.
- Fung, D. Y. (2002). Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 1, 3-22.
- Fung, D. Y. (2010). Microbial Hazards in Foods: Food - Borne Infections and Intoxications. Em F. Toldrá, *Handbook of Meat Processing* (pp. 481-500).
- Gaare, M., & Mishra, D. S. (2021). Microbiological environmental monitoring in food processing. *Indian Food Industry Mag*, 3(2), 46-56.
- Gioia, D. D., Mazzola, G., Nikodinoska, I., Aloisio, I., Langerholc, T., Rossi, M., . . . Rovira, J. (2016). Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. growth. *International Journal of Food Microbiology*, 53-59.
- Gomes, J. (2018). *Revisão e validação dos processos produtivos numa indústria de carnes processadas*. Braga: Universidade do Minho.
- Górny, R. L. (2020). Microbial Aerosols: Sources, Properties, Health Effects, Exposure Assessment—A Review. *KONA Powder and Particle Journal*, 37, 64-84.
- Grau, R., Andres, A., & Barat, J. M. (2014). Principles of drying. Em F. Toldrá, Y. H. Hui, I. Astiasarán, J. G. Sebranek, & R. Talon, *Handbook of fermented meat and poultry* (pp. 31-38).
- Heldman, D. R. (1974). Factors influencing air-borne contamination of foods. A review. *Journal of food science*, 39(5), 962-969.
- Helm-Archer, A., Kerth, C., Jones, W., McCaskey, T., & Conner, D. (2004). Relationship between aerosolized microbial load and contamination of fully cooked the frozen meat products. *Journal of Food Science*, 69(1).
- Jones, A. (1999). Indoor air quality and health. *Atmospheric Environment*, 33(28), 4535-4564.
- Lima, N., & Venâncio, A. (1999). Agentes Biológicos (fungos) na atmosfera de trabalho. *Centro de Engenharia Biológica - Universidade do minho*.
- Lozano-Ojalvo, D., Rodríguez, A., Cordero, M., Bernáldez, V., Reyes-Prieto, M., & Córdoba, J. J. (2015). Characterisation and detection of spoilage mould responsible for black spot in dry-cured fermented sausages. *Meat Science*, 100, 283-290.
- Maneffa, A. J., Stenner, R., Matharu, A. S., Clark, J. H., Matubayasi, N., & Shimizu, S. (2017). Water activity in liquid food systems: A molecular scale interpretation. *Food Chemistry*, 237, 1133-1138.
- Marco, A., Navarro, J. L., & Flores, M. (2006). The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*, 73(4), 660-673.

- Marcos, C., Viegas, C., Almeida, A. M., & Guerra, M. M. (2016). Portuguese traditional sausages: different types, nutritional composition, and novel trends. *Journal of Ethnic Foods*, 3(1), 51-60.
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., & Noni, I. D. (2019). Airborne contamination in the food industry: An update on monitoring and disinfection techniques of air. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 147-156.
- McMillin, K. W. (2017). Advancements in meat packaging. *Meat Science*, 132, 153-162.
- Mendes, J. (2013). *Qualidade nutricional e microbiológica de enchidos*. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança.
- Mota, J. D., Boué, G., Prévost, H., Maillet, A., Jaffres, E., Maignien, T., . . . Federighi, M. (2021). Environmental monitoring program to support food microbiological safety and quality in food industries: A scoping review of the research and guidelines. *Food Control*, 130.
- Napoli, C., Marcotrigiano, V., & Montagna, M. T. (2012). Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health*, 12.
- ONU. (2 de Abril de 2015). *ONU News*. Obtido de <https://news.un.org/pt/story/2015/04/1507221-oms-alerta-que-doencas-transmitidas-por-alimentos-matam-351-mil-por-ano>
- O'Sullivan, M. G., & Kerry, J. P. (2010). Meat packaging. Em F. Toldrá, *Handbook of meat processing* (pp. 247-261).
- Parussolo, G., Bernardi, A. O., Garcia, M. V., Stefanello, A., Silva, T. d., & Copetti, M. V. (2019). Fungi in air, raw materials and surface of dry fermented sausage produced in Brazil. *LWT*, 108, 190-198.
- Portaria n.º 138-G/2021. (1 de julho de 2021).
- Regulamento (CE) n.º 1441/2007. (5 de dezembro de 2007).
- Regulamento (CE) n.º 178/2002. (28 de janeiro de 2002).
- Regulamento (CE) n.º 852/2004. (29 de abril de 2004).
- Regulamento (CE) n.º 853/2004. (29 de abril de 2004).
- Rodrigues, A. (2013). *Monitorização do processo produtivo de charcutaria*. Braga: Universidade do Minho.
- Rodrigues, E. (2012). *Projeto de construção de uma indústria de enchidos e produtos cárneos fumados. Caso prático de um projeto a implementar em Cabo Verde*. Leiria: Instituto Politécnico de Leiria.
- Roseiro, L., Gomes, A., Gonçalves, H., Sol, M., Cercas, R., & C. Santos. (2019). Effect of processing on proteolysis and biogenic amines formation in a Portuguese traditional dry-fermented ripened sausage “Chouriço Grosso de Estremoz e Borba PGI”. *Meat Science*, 84(1), 172-179.
- Santos, I. M., Venâncio, A., & Lima, N. (1998). *Fungos contaminantes na indústria alimentar*. Micoteca da Universidade do Minho.

- Saraga, D., Pateraki, S., Papadopoulos, A., Vasilakos, C., & Maggos, T. (2011). Studying the indoor air quality in three non-residential environments of different use: A museum, a printery industry and an office. *Building and Environment*, *46*(11), 2333-2341.
- Schuller, D. E. (1998). *Desenvolvimento de um meio de cultura selectivo/diferencial para a levedura de contaminação alimentar zygosaccharomyces bailii*. Braga: Universidade do Minho - Departamento de Biologia.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venâncio, A., & Lima, N. (2003). Use of Ozone To Reduce Molds in a Cheese Ripening Room. *Journal of Food Protection*, *66*(12), 2355-2358.
- Silva, C. C., Presgrave, O. A., Moraes, A. M., & Delgado, I. F. (2012). Avaliação microbiológica da qualidade do ar de interiores: aspetos metodológicos e legais. *Universitas*, *10*(1), 51-60.
- Škaljac, S., Jokanović, M., Tomović, V., Ivić, M., Tasić, T., Ikonić, P., . . . Petrović, L. (2018). Influence of smoking in traditional and industrial conditions on colour and content of polycyclic aromatic hydrocarbons in dry fermented sausage "Petrovska klobasa". *LWT*, *87*, 158-162.
- Sørensen, L. M., Jacobsen, T., Nielsen, P. V., Frisvad, J. C., & Koch, A. G. (2008). Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International Journal of Food Microbiology*, *124*(1), 58-64.
- Sveum, W. H., Moberg, L. J., Rude, R. A., & Frank, J. F. (1992). Microbiological monitoring of the food processing environment. Em APHA, *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (3 ed., pp. 51-74).
- Vandendriessche, F. (2008). Meat products in the past, today and in the future. *Meat Science*, *78*(1-2), 104-113.
- Venturini, A. C., Contreras-Castillo, C. J., & Faria, J. (2009). Revisão: Sistemas de embalagem para carne bovina fresca em atmosfera modificada. *Brazilian Journal of food technology*, *12*(2), 128-137.
- WHO. (1984). *The role of food safety in health and development*. Geneva.
- WHO. (30 de abril de 2020). *Food Safety*. Obtido de World Health Organization: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>