

João Miguel Ventura Xavier

Licenciado em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica



Contaminação microbiológica– qualificação, quantificação e implicação no processo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Eng^o Mário Gomes, Plant Associate Director, ASCENZA AGRO S.A.

Co-orientadora: Isabel Maria Rôla Coelho, Professora Auxiliar com Agregação,
Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutor José Paulo Barbosa Mota, Professor Catedrático
do Departamento de Química da FCT-UNL

Arguente: Mário Fernando José Eusébio, Professor Auxiliar do
Departamento de Química da FCT-UNL

Vogais: Engenheiro Mário Alexandre Guerreiro Santos
Gomes, Plant Associate Director na ASCENZA
AGRO,SA

Novembro, 2020



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Contaminação microbiológica– qualificação, quantificação e implicação no processo

Copyright © João Miguel Xavier, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

Agradecimentos

À ASCENZA AGRO SA, pela oportunidade concedida para a realização do estágio.

À FCT-UNL pelo acolhimento e momentos proporcionados durante este Mestrado Integrado.

Ao Eng^a Mário Gomes e à Professora Isabel Coelho por toda a atenção, ajuda, paciência e conselhos.

A toda a equipa que me recebeu e ajudou na ASCENZA AGRO SA – Bruno, Inês, Afonso, Pedro e Susana.

À Margarida pelo amor incondicional, apoio, ajuda e paciência dado.

Ao meu Pai João e à minha irmã Maria, por todo o encorajamento e ajuda em todos os momentos fáceis e difíceis.

A todos os meus tios e avós pelo apoio e boa disposição que me ajudaram a chegar aqui.

Á Cláudia pela ajuda e aconselhamento.

A toda a gente que de alguma forma deu um contributo para que eu terminasse esta viagem.

Obrigado.

Resumo

As contaminações microbiológicas são uma preocupação em qualquer indústria. O crescimento de bactérias ou fungos em produtos ou linhas de produção podem danificar os produtos e equipamentos ou até pôr em risco a saúde dos trabalhadores e dos consumidores finais.

Desde as restrições à utilização do formaldeído, que era até então usado como biocida na indústria agroquímica, esta teve de desenvolver novas estratégias preventivas e corretivas da contaminação microbiológica de produtos e linhas de produção.

Neste trabalho foram estudadas as implicações da contaminação através do histórico de contaminações microbiológicas e devoluções de produtos, e avaliadas as medidas já postas em prática para a sua prevenção. Foram também qualificadas as contaminações através de estudos já feitos pela empresa

Adicionalmente, através do estudo teórico e da observação do funcionamento da fábrica foi elaborada uma matriz causa-efeito e uma matriz de resolução para as causas de contaminação.

De forma a quantificar a incidência de contaminação foi feito o estudo estatístico de amostras retiradas ao longo do período de um ano assim, como a escolha de matérias primas e co-formulantes para nova análise.

Por fim são sugeridas melhorias no processo, como a inclusão de biocida na formulação de produtos, o tratamento de águas de formulação, a disponibilização de mais equipamentos de plástico, melhor tratamento dos EPI's e alterações à produção de solução espessante com vista a reduzir adicionalmente a incidência de contaminação microbiológica.

Palavras-chave: Microrganismo, Formulação, Biocida, Prevenção, Correção, Quantificação, Implicação, Qualificação.

Abstract

Microbiological contaminations are a concern in every industry. The growth of bacteria and fungi in products or production lines can damage those products or equipments and even the endanger the health of workers.

Since the restrictions on the use of formaldehyde, which was previously used as a biocide in the agrochemical industry, this industry had to develop new preventive and corrective measures to address microbiological contamination of products and production lines.

The implications of microbiological contamination were studied in this work through the microbiological and product return history, through previous studies the contamination were qualified and the measures already in practice were presented and evaluated.

Additionally, a cause-effect matrix and a resolution matrix were made through theoretical study and on-site observation of the process.

To quantify the degree of contamination, a statistical study of samples taken over a period of one year was made, as well as the sampling of handpicked raw materials and formulants.

As a result of the work developed within this study, several improvement suggestions are made like the inclusion of biocide in the formulation of products and the treatment of process water, in order to further reduce the incidence of microbiological contamination.

Keywords: Microorganism, Formulation, Biocide, Prevention, Correction, Quantification, Implication, Qualification.

Conteúdo

1. ENQUADRAMENTO	1
1.1 Grupo Rovensa	1
1.2 Oportunidade e Objetivos	2
2. INTRODUÇÃO	3
2.1 Contaminação microbiológica – Tipos de microorganismos	4
2.1.1 Bactérias	4
2.1.2 Fungos	6
2.1.3 Biofilmes	7
2.2 Condições para o crescimento microbiano	7
2.2.1 Água	8
2.2.2 Condições atmosféricas	8
2.2.3 Nutrientes	8
2.2.4 Temperatura	8
2.2.5 pH	9
2.3 Tipologia de formulações	9
2.3.1 Suspensão Concentrada (SC)	10
2.3.2 Concentrado para Emulsão (EC)	10
2.3.3 Suspensão de Cápsulas (CS)	10
2.3.4 Solução Concentrada (SL)	11
2.4 Descrição dos processos	11
2.4.1 Suspensões Concentradas	11
2.4.2 Suspensões de Cápsulas	12
2.5 Histórico Microbiológico	12

2.5.1	Adição de formaldeído	13
2.5.2	Contaminação/Devoluções.....	13
2.5.3	Estudos anteriores	14
2.6	Produtos Críticos.....	15
3.	ANÁLISE DE CAUSAS DE CONTAMINAÇÃO.....	17
3.1	Comparação de métodos operatórios e matérias-primas de produtos críticos.....	17
3.2	Causa-Efeito de Contaminação.....	17
3.2.1	Critérios de qualidade da água	19
3.2.2	Matérias-Primas	19
3.2.3	Condições de armazenamento.....	19
3.2.4	Reutilização	20
3.2.5	Produto Residual	20
3.2.6	Mangueiras	20
3.2.7	Limpeza da instalação	20
3.2.8	Pessoal.....	21
3.3	Reflexão destes factores na instalação	21
3.3.1	Qualidade da água.....	21
3.3.2	Matérias-Primas	22
3.3.3	Condições de armazenamento.....	22
3.3.4	Reutilização	22
3.3.5	Produto Residual	23
3.3.6	Mangueiras	24
3.3.7	Limpeza da Instalação.....	24
3.3.8	Pessoal.....	24
3.4	Matriz GUT.....	25
4.	AÇÕES CORRETIVAS E PREVENTIVAS.....	27
4.1	Prevenção e Monitorização.....	27
4.2	Checklist de Limpeza	28
4.3	Circuito de Limpeza e amostragem.....	35
5.	MÉTODOS DE ANÁLISE.....	37
5.1	Meios de cultura para o crescimento de microrganismos	37
5.2	Kit de deteção de microrganismos.....	37
5.3	Biocida.....	39
6.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	41
6.1	Análise Estatística de amostras.....	41

6.2	Amostragem	49
7.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS DE FUTURO	53
7.1	Conclusões	53
7.2	Perspetivas de futuro	54
7.2.1	Inclusão de biocida na produção	54
7.2.2	Mais equipamento de plástico	55
7.2.3	Água de formulação e mangueiras	55
7.2.4	EPI's	56
7.2.5	Solução Espessante	56
8.	BIBLIOGRAFIA	59
	ANEXOS	65

Lista de Figuras

Figura 1 Fases do crescimento bacteriano .	5
Figura 2 Fluxograma de produção de microencapsulados.	12
Figura 3 Fluxograma de histórico microbiológico.	13
Figura 4 Resultados da cultura de amostras em vários meios de cultura.	15
Figura 5 Diagrama Causa-Efeito de contaminação.	18
Figura 6 Resultados da adição de biocida a líquidos de lavagem. Legenda: AM - análises microbiológicas; AMB - análises microbiológicas com biocida; AR - aguarda resultados; ND - não detetado; 24 - baterias detetadas às 24h; 48 - bactérias detetadas às 48h.	23
Figura 7 Circuito de método de limpeza e validação.	28
Figura 8 Equipamentos da formulação de herbicidas líquidos.	29
Figura 9 Equipamentos da formulação de inseticidas líquidos.	29
Figura 10 Diagrama de processo de formulação de líquidos.	30
Figura 11 Circuito de lavagem de equipamentos de formulação.	30
Figura 12 Etiquetagem de frasco de amostra de lavagem sem biocida.	31
Figura 13 Etiquetagem de amostra de lavagem com biocida.	31
Figura 14 Diagrama das linhas de enchimento de herbicidas.	32
Figura 15 Diagrama das linhas de enchimento de inseticidas.	33
Figura 16 Diagrama do processo de enchimento.	33
Figura 17 Diagrama da recirculação de líquido de lavagem em uma máquina de enchimento	34
Figura 18 Fluxograma do circuito de Lavagem e amostragem na formulação.	35
Figura 19 Fluxograma do circuito de Lavagem e amostragem no enchimento.	36
Figura 20 Imagem ilustrativa do kit Microbiology Cult-Dip combi.	38
Figura 21 Instruções de utilização do kit de amostra	38
Figura 22 Instruções para a contagem de culturas no kit de amostra.	39
Figura 23 Percentagens de contaminação nos enchimentos.	43
Figura 24 Percentagens de contaminação na formulação de inseticidas	45
Figura 25 Percentagens de contaminação na formulação de herbicidas	46
Figura 26 Contaminação e número de amostras ao longo do tempo no enchimento	47
Figura 27 Contaminação e número de amostras ao longo do tempo na formulação de inseticidas.	47
Figura 28 Contaminação e número de amostras ao longo do tempo na formulação de inseticidas.	48
Figura 29 Fotografia dos kits de amostra utilizados.	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 Devolução de produtos críticos.....	14
Tabela 2 Matriz GUT.	25
Tabela 3 Tabela de resultados de amostras retiradas nas secções de enchimento.....	42
Tabela 4 Amostras de enchimentos	42
Tabela 5 Tabela de resultados de amostras na formulação de inseticidas	44
Tabela 6 Tabela de resultados de amostras na formulação de herbicidas.....	45
Tabela 7 Temperatura ambiente mínima, máxima e média em Setúbal ao longo de um ano.	48
Tabela 8 Temperatura da água mínima, máxima e média em Setúbal ao longo de um ano.	49
Tabela 9 Resultados das amostras microbiológicas a co-formulantes de produtos críticos.....	50

1. Enquadramento

1.1 Grupo Rovensa

O grupo surge sob o lema “Well-balanced agriculture” [“Agricultura equilibrada”] e possui três unidades de negócio: *crop protection*, *crop nutrition* e *biocontrol*.

O grupo Rovensa é constituído pelas empresas Ascenza, Tradecorp, Idai Nature, OGT, SDP, Microquímica. A Ascenza constitui o ramo de “Protecção de Culturas”.

O grupo vende produtos em mais de 70 países e possui escritórios em mais de 25 países, com fábricas, centros de investigação e laboratórios no Brasil, em França, em Espanha, em Portugal e na Irlanda. Este grupo pertence à Bridgepoint, uma empresa de *private equity* com sede no Reino Unido.[1]

A SAPEC Agro iniciou no ano de 1965, a produção de produtos para a proteção de culturas e estabeleceu-se no mercado fitofarmacêutico. De início com carácter secundário, a empresa mantinha a representação de outras marcas, mas sempre com o objetivo de ser um grupo de referência e independente no mercado internacional de produtos genéricos diferenciados. A empresa especializou-se então nesta área e aumentou o seu portfólio de produtos, desenvolvendo a generalidade das formulações - como os pós molháveis, concentrados para emulsão e soluções concentradas (WP, EC, SL) - mas também as mais tecnicamente exigentes - tais como os grânulos molháveis, suspensões de cápsulas e suspensões concentradas (WG, CS e SC) - o que a levou a destacar-se como líder de mercado desde o final dos anos 90. Atualmente, exporta cerca de 70% da sua produção e apresenta uma quota de mercado, na Península Ibérica, superior a 12% e em Portugal superior a 30%. Desde então, a SAPEC tem vindo a crescer globalmente, estando presente em 20 países - sendo os mais relevantes Espanha, Itália e França - distribuídos por 5 continentes através de fábricas, laboratórios, equipas (de investigação, escritórios e de recursos humanos) e afiliados. O Complexo Industrial localizado em Setúbal é composto por 5 unidades de produção - Fungicidas/Inseticidas, Herbicidas, Enxofre, Sulfonilureias e Instalações Veterinárias - 2 torres de granulação, 6 laboratórios - Controlo de qualidade e Físico-química, Microbiologia e Biologia celular, Desenvolvimento de formulações, Síntese, Resíduos e BPL - e 3 unidades - Piloto de síntese, Ensaio de resíduos e Ensaio de eficácia de produtos fitofarmacêuticos - dedicando-se principalmente ao negócio da proteção de culturas, mas também à nutrição de culturas e medicamentos veterinários. Conta

com uma capacidade instalada de 110 kton/ano, capacidade de armazenamento máxima de 34,5 kton e produz cerca de 95 produtos, incluindo 42 Fungicidas, 31 Herbicidas e 16 Inseticidas e Acaridas, o que se traduz num volume de negócios superior a 145 milhões de euros. Em 2017, foi adquirida pela Bridgepoint Capital e, mais tarde no fim de 2018, assumiu oficialmente o seu novo posicionamento, através da marca ASCENZA[2][3][4].

1.2 Oportunidade e Objetivos

A ASCENZA Agro, como líder de mercado e sendo uma empresa de renome no panorama agroquímico, apresenta como uma das suas prioridades a otimização das suas formulações, para que os seus produtos além dos mais vendidos, sejam também os de melhor qualidade no mercado.

Nos 6 meses de estágio pretende-se o estudo da implicação, a quantificação e a qualificação das contaminações microbiológicas encontradas em alguns dos produtos, estas contaminações dão lugar a devoluções por parte de clientes, que por sua vez traduzem-se em perdas monetárias para a empresa.

Como principais objetivos encontram-se a quantificação, qualificação e perceção da implicação das contaminações microbiológicas nos processos e produtos finais.

Numa fase inicial é necessário compreender quais os microrganismos e quais as condições necessárias à sua origem e proliferação, e qual a melhor maneira de prevenir o seu aparecimento ou de os eliminar se o aparecimento dos mesmos nos equipamentos e formulações não puder ser prevenido.

Esta prevenção terá bastantes benefícios para a empresa, com menos reclamações de clientes e mais satisfação por parte dos mesmos, menos águas e produtos contaminados levam a menos desperdício de recursos e equipamentos contribuindo assim também para melhorar a pegada ecológica da fábrica.

Irão ser estudados os microrganismos geradores de contaminação, os tipos de formulações afetados e as condições que geram essa contaminação assim como o historial de prevenção de contaminação microbiológica da fábrica. Por fim serão propostas alterações e soluções de forma a reduzir ou eliminar totalmente a contaminação microbiológica dos produtos.

2. Introdução

A presença de microrganismos pode ter um efeito negativo na qualidade do produto em qualquer indústria. Essa situação é comumente referida como contaminação microbiológica.

Na indústria da proteção de colheitas (insecticidas, herbicidas e fungicidas) este problema é especialmente comum, devido à presença de água nas formulações e ao ambiente geral nas fábricas que produzem estes produtos.

Os microrganismos nocivos podem causar uma série de alterações nas propriedades físicas da formulação contaminada. As alterações podem afetar o pH, a viscosidade, a estabilidade da dispersão, a separação de fases e a sedimentação, o que afeta negativamente a estabilidade do armazenamento e a aplicação do produto. Um outro efeito altamente indesejável pode ser a decomposição dos ingredientes ativos e co-formulantes. O crescimento microbiano pode causar recipientes inchados devido à geração de gás, que geralmente apresenta um odor desagradável [5].

Anteriormente a utilização de formaldeído nas formulações prevenia o crescimento microbiológico nos produtos, no entanto a sua utilização foi proibida ou restringida na maior parte das indústrias devido às preocupações de saúde associadas ao seu uso. Esta proibição deixou a indústria sem um substituto eficaz para a prevenção de crescimento microbiológico e assim deu lugar a tratamentos de prevenção mais complexos, focados na prevenção do crescimento microbiológico nos equipamentos e co-formulantes.

Na Ascenza Agro S.A. foi detetada a presença de contaminação microbiológica nos produtos através de queixas de clientes relacionadas com bilhas inchadas, odor desagradável e produto não conforme.

De forma a limitar o impacto destas contaminações nos produtos e no funcionamento da fábrica, foi solicitada a ajuda de uma empresa especializada na área (THOR) e deste trabalho de forma a desenvolver uma estratégia preventiva e curativa para estas contaminações. Esta começa pela adição do biocida ACTICIDE® DBW 20, nas lavagens de equipamentos de formulação e enchimento após a produção/enchimento de produtos que possam ter criado contaminação.

2.1 Contaminação microbiológica – Tipos de microorganismos

Os microrganismos que podem potencialmente causar contaminação dos produtos pertencem a dois reinos biológicos distintos: bactérias e fungos.

Além da contaminação dos produtos, estas culturas microbiológicas podem alojar-se nos equipamentos (depósitos de formulação, filtros, esferas de moagem, bombas, etc.) e apartir daí contaminar produções seguintes.

Teremos que primeiro entender como funcionam os contaminantes, para melhor perceber como combatê-los.

2.1.1 Bactérias

As bactérias são organismos pequenos, tipicamente unicelulares. Elas não são visíveis a olho nu e requerem um microscópio. Normalmente, as bactérias têm um comprimento / diâmetro de alguns microns. Dependendo da espécie, a forma varia de esferas, varas, espirais, com ou sem flagelo ou pilus para locomoção. As bactérias geralmente ligam-se a superfícies para formar estruturas complexas conhecidas como biofilmes[6]. Exemplos de algumas espécies bacterianas comuns encontradas nesta indústria incluem Bacillus e Pseudomonas. As bactérias podem ser encontradas em quase todos os lugares. Na proteção de culturas à base de água, elas podem estar presentes em matérias-primas, água de processo e componentes da embalagem, bem como dentro e fora do equipamento do processo, no ar, nas paredes, pisos e tetos das unidades de produção, paletes etc[7].

As bactérias reproduzem-se por fissão binária, ou seja, a célula reproduz-se e divide-se em duas células geneticamente idênticas. Quatro fases podem ser reconhecidas na curva de crescimento (ciclo de vida) de bactérias, descritas na Figura 1[8]:

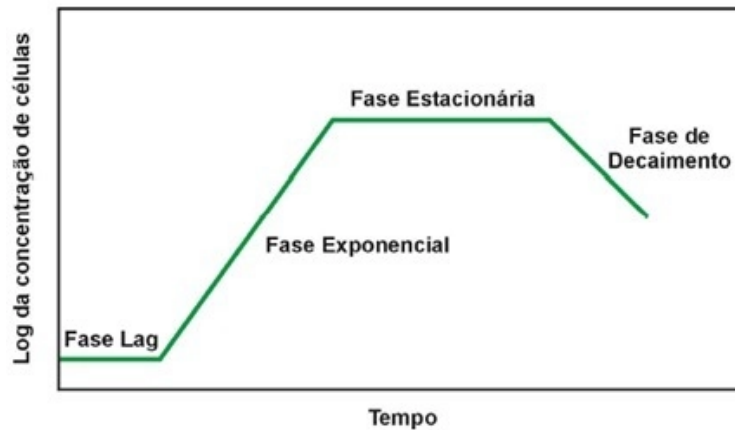


Figura 1 Fases do crescimento bacteriano [5].

- A fase Lag: Durante esta fase, as bactérias recém-introduzidas só retomarão uma taxa de crescimento máxima e divisões celulares após adaptação aos novos nutrientes disponíveis, muitas vezes diferentes e às condições ambientais alteradas.
- A fase exponencial ou logarítmica: Uma vez que as bactérias apresentem uma taxa de crescimento constante, elas entram na fase exponencial ou logarítmica. Durante esta fase, todas as células são viáveis e duplicam-se a uma taxa muito alta. A taxa de reprodução é específica da espécie e depende do ambiente real. Sob condições ideais, o número de células bacterianas duplica em menos de 20 a 30 minutos. Esta multiplicação explosiva de células pode fazer com que os problemas associados à contaminação apareçam rapidamente.
- A fase estacionária: A contagem de células viáveis permanece constante nesta fase. Embora a divisão celular continue durante esta fase, devido ao aumento do número de células mortas o crescimento populacional pára. Esta fase pode durar horas, até dias.
- A fase de morte: Quando os nutrientes ou fatores ambientais se tornam fatores limitantes, a população entra na fase da morte. Este é um processo exponencial com alto índice de mortalidade. No entanto, um pequeno número de sobreviventes persiste geralmente por meses ou até anos e potencialmente estabelece uma nova população, principalmente quando as espécies contaminantes formam endosporos[9].

A modificação da composição genética de bactérias é causada por mutações (erros na duplicação do material genético, DNA). Isso pode ajudar as bactérias a responder às mudanças ambientais que retardam o crescimento da população, por exemplo, falta de nutrientes, presença de biocidas[10].

Sob condições ambientais desfavoráveis, certos gêneros de bactérias, por exemplo, *Bacillus*, *Clostridium*, formam endósporos dormentes de alta resistência que podem permanecer inativos por longos períodos de tempo. Durante esta fase, os processos metabólicos estão em espera. Os endósporos são cercados por uma camada impermeável e rígida e podem, como consequência, sobreviver sob ambientes físicos e químicos extremos: luz UV, calor, congelamento, pressão, dessecação, desinfetantes, detergentes e solventes orgânicos. Existe o perigo de os endósporos se tornarem transportados pelo ar e isso poderia desencadear uma ampla distribuição em todo o ambiente da operação[11]. A contaminação potencial por endósporos exige séria consideração no desenvolvimento de estratégias para higiene e design de fábricas[12].

2.1.2 Fungos

Os fungos encontrados no ambiente de operação podem ser classificados em dois grupos: leveduras e bolores. Também neles podem ocorrer mutações permitindo adaptações às mudanças ambientais. A taxa de crescimento pode ser alta, dependendo das condições nutricionais e ambientais corretas[13]. Os fungos podem ser separados em leveduras e bolores.

As leveduras são pequenos organismos unicelulares do tamanho de um micrão e tipicamente de 3 a 4 micrões de diâmetro, embora algumas espécies atinjam um diâmetro de 40 micrões. As leveduras reproduzem-se por um processo chamado brotamento. As células recém-formadas são libertadas no ambiente como célula única, mas em algumas espécies elas podem permanecer anexadas à célula "pai"[14].

Os bolores são fungos que crescem formando hifas tubulares multicelulares que formam uma rede denominada micélio. Às vezes, os micélios formam grandes mantas (colônias) na superfície de formulações à base de água e estas são visíveis a olho nu. Dependendo das condições ambientais, especialmente quando está quente e húmido, os bolores produzem esporos que podem ficar no ar. Esses esporos distribuem-se livremente no ambiente com o possível resultado da contaminação de produtos, matérias-primas, equipamentos de operação, etc[15].

2.1.3 Biofilmes

Um biofilme é um grupo de microrganismos nos quais bactérias - ou bactérias e fungos (e às vezes algas) aderem umas às outras e colam a uma superfície ou no caso de um substrato plástico podem crescer no polímero. Normalmente, superfícies ásperas, rachaduras e depósitos são os primeiros pontos de fixação de micróbios. As células microbianas são incorporadas dentro de uma matriz autoproduzida contendo DNA extracelular, enzimas, outras proteínas, polissacarídeos, metabólitos e água. Frequentemente, a matriz também contém o produto químico que está a ser produzido no equipamento infestado que pode servir como fonte de nutrientes. Os microrganismos dentro de um biofilme são muito mais difíceis de controlar do que os micróbios que flutuam ou nadam no ambiente líquido externo. Durante os estágios iniciais do seu desenvolvimento, os biofilmes não podem ser vistos a olho nu, no entanto a detecção da camada de lodo inicialmente transparente na superfície é possível pelo simples contato com os dedos. Estágios de crescimento posteriores são detectáveis visualmente. Normalmente, o teste da zaragatoa é o método mais confiável para confirmar a presença de biofilmes, especialmente num estágio inicial de crescimento [16].

2.2 Condições para o crescimento microbiano

Condições ótimas ou quase ideais para o crescimento microbiano estão frequentemente presentes nas instalações de operação de produtos de proteção de colheitas à base de água. Conhecimento dos requisitos de crescimento dos microrganismos são essenciais para desenvolver uma estratégia de defesa [17].

2.2.1 Água

Para microrganismos, a água na fase líquida nem sempre é necessária para apoiar o crescimento. Com algumas espécies encontradas no ambiente de operação, o crescimento microbiano pode ocorrer com água na fase de vapor. Pode, por exemplo, ocorrer em produtos sólidos dentro de unidades de produção[18].

2.2.2 Condições atmosféricas

Existem três tipos de microorganismos:

- Organismos aeróbicos : crescem em uma atmosfera oxigenada.
- Anaeróbios: não precisam de oxigênio para sustentar o crescimento.
- Anaeróbios facultativos: usam oxigênio quando disponível, mas são capazes de mudar para fermentação ou respiração anaeróbica se a concentração de oxigênio diminuir[19].

2.2.3 Nutrientes

As bactérias e fungos responsáveis pelas contaminações microbianas dependem de material extracelular (nutrientes) para o seu metabolismo. Necessitam de carbono e azoto disponíveis em quantidades relativamente grandes para sustentar o crescimento, enquanto fósforo e enxofre são necessários em quantidades menores. Os vários oligoelementos estão normalmente presentes em quantidades suficientes como contaminantes dos produtos de proteção de colheitas[20].

2.2.4 Temperatura

Os equipamentos de formulação são tipicamente operadas em uma faixa de temperatura entre os 10°C e 40°C. Essas temperaturas fornecem condições favoráveis para o crescimento e reprodução dos microrganismos comumente encontrados nas instalações. O limite inferior para o crescimento de micróbios é geralmente ligeiramente abaixo de 0°C. No entanto, muitos microrganismos podem sobreviver congelados por períodos prolongados, embora todos os processos metabólicos sejam encerrados nessas condições. O limite superior do crescimento é determinado pela termoestabilidade das proteínas e ácidos nucleicos no citoplasto. Essas

moléculas são destruídas principalmente entre 60°C e 90°C. Exposição a temperaturas acima da faixa de crescimento causa morte celular rápida. Isso forma a base para a esterilização por calor. Uma causa para preocupação vem dos micróbios formadores de esporos, especialmente endósporos, que podem sobreviver a temperaturas muito mais altas que as células vegetativas[21].

2.2.5 pH

Leveduras e bolores apresentam ótimo crescimento num ambiente com pH variando de ligeiramente ácido a neutro[22].

Em geral, os fungos crescem melhor em valores mais baixos de pH do que as bactérias. A maioria das bactérias é relativamente insensível à concentração externa de H⁺ e OH⁻ e muitas espécies podem crescer bem em qualquer valor de pH entre 6,0 e 9,05. Em conclusão, os valores de pH da maioria dos produtos de proteção à base de água caem dentro de uma faixa que pode sustentar o crescimento de bactérias e fungos comuns nos locais de produção [23].

2.3 Tipologia de formulações

Tendo em conta as condições para o crescimento de microrganismos apresentados anteriormente e o conhecimento adquirido no contacto com a operação, o trabalho vai incidir nas áreas de formulação e embalagem de líquidos (de herbicidas e inseticidas/fungicidas), e mais especificamente nas formulações que tenham base aquosa, visto a sua presença ser o fator mais importante para o crescimento microbiológico sendo estas áreas referidas com a sigla referente ao tipo de produto (inseticida/herbicida), o tipo de ação efetuada (formulação ou embalagem), como IFL (inseticidas formulação de líquidos), IEL (Inseticidas Enchimento de Líquidos), HFL (Herbicidas Formulação de Líquidos) e HEL (Herbicidas Enchimentos de Líquidos).

Dentro das áreas de formulação dos produtos líquidos encontramos vários tipos de formulações que respondem às várias necessidades da proteção de culturas.

Encontramos então Suspensões Concentradas/Flows (SC's), Concentrados para Emulsão (EC's), Suspensões de Cápsulas (CS's) e Soluções Concentradas (SL's).

De forma a melhor entender cada tipo de formulação e quais os riscos de contaminação ou crescimento microbiológico associado, é necessária uma descrição do funcionamento de cada tipo de formulação [24]:

2.3.1 Suspensão Concentrada (SC)

As formulações de suspensão concentrada (SC) são um ingrediente ativo sólido disperso em água e moído para reduzir o tamanho médio de partícula. Para formular um SC estável, o ingrediente ativo deve permanecer insolúvel em todas as condições de temperatura.

Normalmente têm uma viscosidade mais alta (são "mais grossos") do que a água sozinha, devido à presença de espessantes / modificadores reológicos[25].

2.3.2 Concentrado para Emulsão (EC)

Um concentrado para emulsão é um sistema baseado em solvente (óleo) que contém ingredientes ativos dissolvidos em um solvente e emulsificantes. É projetado para formar uma emulsão de óleo em água após diluição.

Como os EC's são à base de solvente, as propriedades físicas podem variar amplamente, dependendo do sistema de solvente usado. O tipo de solvente pode afetar as qualidades do produto, como odor, viscosidade, inflamabilidade e potencial de fitotoxicidade. Após a diluição em água, o solvente ou fase oleosa forma uma emulsão em água que eventualmente se separará. A formação desta emulsão é muitas vezes referida como creme[26].

2.3.3 Suspensão de Cápsulas (CS)

A formulação de suspensão de cápsulas (CS) é uma combinação de um ingrediente ativo encapsulado em uma concha de polímero suspensa em água com um dispersante e um agente molhante. As formulações de CS são um dos tipos de formulação mais avançados para proteção de culturas em todo o mundo. Quando as formulações de CS são diluídas com água no tanque de pulverização, elas formam uma suspensão espontânea, com partículas na faixa de tamanho de 0,1 a 20 μm . Quando pulverizada, a emulsão diluída oferece uma aplicação uniforme e precisa do ingrediente ativo na cultura, o que é essencial para um controle eficaz de pragas. É

possível usar formulações de CS para dar libertação controlada ou retardada de pesticidas, bem como fornecer melhor proteção contra ingredientes ativos tóxicos ou prevenir a degradação do material [27].

2.3.4 Solução Concentrada (SL)

Geralmente à base de água são produtos que contêm um ingrediente ativo dissolvido (normalmente um sal). Este é um dos tipos de formulação que realmente contém moléculas dissolvidas, não partículas suspensas. SL's tendem a ter viscosidades mais baixas do que SC's (mais perto da água). Eles misturam-se facilmente na água e requerem agitação mínima após a diluição, embora alguns ativos sejam densos o suficiente para se depositarem com o tempo.

Com o conhecimento dos tipos de formulações é possível perceber que as formulações afetadas pelos crescimentos microbiológicos seriam as suspensões, concentradas e de cápsulas (SC's e CS's), devido a estarem suspensas em água e não dissolvidos nela, deixando assim apenas água nas embalagens e formulações, que pode servir de base para o crescimento microbiano[28].

2.4 Descrição dos processos

Sabendo quais as soluções mais afetadas pela contaminação, cabe-nos também estudar os processos de formulação utilizados para os produzir.

2.4.1 Suspensões Concentradas

A formulação de Suspensões Concentradas ou Flows utiliza poucos equipamentos e é fácil de descrever, os co-formulantes são adicionados a um depósito de formulação com agitador, quando a mistura está uniforme, a carga é passada por um moinho de esferas (Dyno-Mill) de forma a que as partículas fiquem com o tamanho desejado e por fim a carga é passada para um depósito de acabamento para em agitação receber a solução espessante [29].

2.4.2 Suspensões de Cápsulas

Na microencapsulação são utilizados maioritariamente tanques de mistura, bombas e mangueiras de forma a preparar uma fase aquosa, uma fase orgânica e por último um tanque para misturar e agitar as duas fases anteriores, o risco associado de contaminação microbiológica é igual ao de outras formulações : acumulação de produto residual em paredes ou cantos dos tanques, ou a introdução de contaminação através de algum co-formulante [30][31].

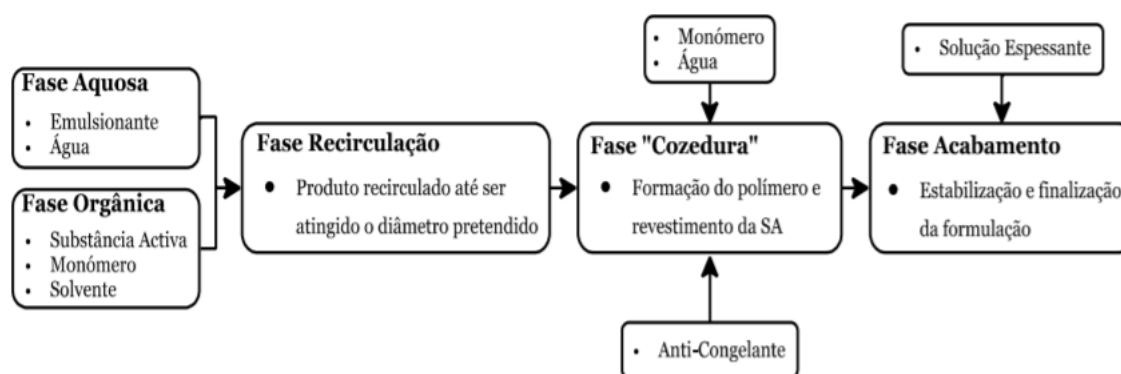


Figura 2 Fluxograma de produção de microencapsulados.

2.5 Histórico Microbiológico

Para melhor perceber como analisar a contaminação microbiológica, temos que primeiro perceber a sua origem e todo o historial de combate à contaminação já existente na Ascenza Agro.

Este histórico tem como partes principais a restrição do uso de formaldeído (Janeiro/2018), o recebimento de devoluções (de Janeiro de 2018 para a frente) por contaminação microbiológica, o estudo das causas (do recebimento de devoluções até agora e futuramente) e dos produtos contaminados e por fim a aplicação de medidas curativas e preventivas (após o estudo de causas e contínuo de aí até agora).



Figura 3 Fluxograma de histórico microbiológico.

2.5.1 Adição de formaldeído

Até à proibição do uso do formaldeído, o seu uso era a solução para a contaminação microbiológica, sendo adicionado ao produto final como biocida, eliminava qualquer contaminação no produto final, assim não existia também uma preocupação com a proteção dos equipamentos em relação à contaminação, pois o produto final estaria sempre protegido, apenas com a sua proibição/restrrição foram desenvolvidas estratégias de prevenção e proteção.

Devido à sua classificação como um produto tóxico, o seu uso foi banido ou limitado em muitas indústrias, não sendo permitida uma concentração acima dos 0.2% no produto final, nas indústrias onde pode ser utilizado [32].

A indústria agroquímica foi uma das indústrias afetadas por esta proibição e como tal o seu uso como biocida foi parado [33].

2.5.2 Contaminação/Devoluções

Após o término da utilização do formaldeído como biocida, ele foi substituído por outro biocida, menos eficaz, a fábrica começou a receber devoluções de produtos vendidos, estes produtos estariam a chegar aos clientes com bilhas inchadas, rebentadas e mau odor, após a confirmação de que isto estava de facto a acontecer, foi fácil perceber que se tratava de um resultado de contaminação microbiológica nos produtos finais, sendo que a respiração aeróbia dos microrganismos estaria a causar o inchamento e rebentamento das bilhas.

De seguida é apresentada uma tabela com os números em Litros, tanto das devoluções recebidas como das quantidades totais produzidas, de produtos críticos na fábrica, em dois períodos (18/19, 19/20) sendo que de um período para o outro foram introduzidas medidas corretivas e preventivas de contaminação microbiológica.

Tabela 1 Devolução de produtos críticos.

	Devoluções	Produção	%Devolução
	L	L	
18/19	10 602	450 289	2,4
19/20	3440	695 945	0,5

Como é visível pela análise tanto das quantidades devolvidas como da percentagem que essas quantidades representam na produção total de produtos críticos, as implementações de medidas de controlo microbiológico tiveram um grande impacto na contaminação dos produtos, levando a uma redução de ~1/3 na quantidade de produto devolvido.

No entanto continua a existir um nível considerável de contaminação, que é evitável, se a estas medidas forem adicionadas outras, esta contaminação poderá ser reduzida ainda mais. Reduzindo o impacto ambiental e custos adicionais associados à contaminação microbiológica.

2.5.3 Estudos anteriores

Tendo em conta a situação de devoluções e contaminação na fábrica foi contratada a ajuda de uma empresa especializada em biocidas e na eliminação de contaminações microbiológicas em ambiente industrial, a THOR. Esta empresa deslocou então especialistas à fábrica que fizeram análises microbiológicas aos equipamentos e produtos da fábrica, através de amostras de superfície ou líquidas, que depois foram passadas para meios de cultura de forma a perceber quais as bactérias presentes e quais as superfícies e equipamentos contaminados.

Nestes estudos foram avaliadas possíveis fontes de contaminação e utilizados vários meios de cultura, analisando o crescimento de microrganismos nestes meios de cultura podemos perceber que tipo de microrganismos crescem nos produtos.

Foram então testados produtos finais, paredes de equipamentos, bicos de enchimento, matérias-primas, co-formulantes, águas de formulação entre outros.

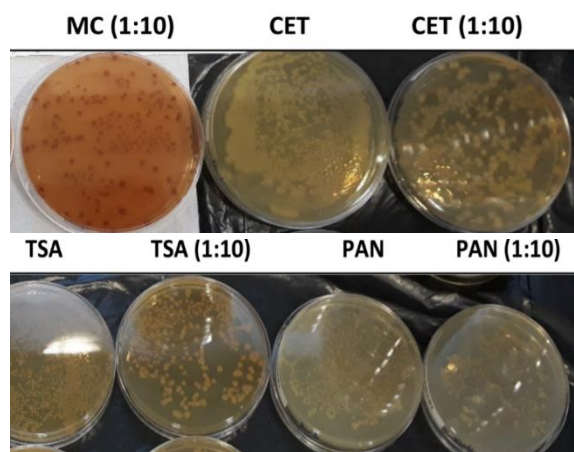


Figura 4 Resultados da cultura de amostras em vários meios de cultura.

A existência de colónias nas placas de Cetrimida (CET) indica a presença de bactérias *Pseudomonas aeruginosas*, visto que este meio de cultura é isolador desta bactéria [34].

Esta é uma espécie bacteriana bastante comum, estando presente em quase todo o lado, conhecida por ser resistente a um número imenso de fármacos. Dada a sua prevalência, presença em todo o tipo de ambientes e resistência a químicos é natural que seja um contaminante nas produtos e instalações de imensas indústrias [35].

Sendo que dificilmente teremos duas bactérias diferentes a crescer no mesmo produto, pois iriam competir pelos mesmos nutrientes, pela análise das placas também é possível ver que todas as culturas que cresceram nelas têm todas a mesma cor e forma, não tendo sido identificada outra bactéria, esta bactéria pode ter crescido em todos os meios de cultura que apresentaram crescimento.

2.6 Produtos Críticos

Dentro da formulação e embalamento de líquidos foram identificados um conjunto de produtos, denominados críticos, que consistentemente desenvolvem crescimento microbiológico e recebem reclamações dos consumidores devido a bilhas inchadas ou produto não-conforme.

A diferença entre a contaminação destes produtos pode ser confirmada através da análise do registo de amostras das águas de lavagem de produção/enchimento.

1. Produto A - (Herbicida/SC)
2. Produto B - (Inseticida/CS)
3. Produto C (Inseticida/CS)
4. Produto D – (Inseticida/SC)
5. Produto E (Inseticida/SC)

3. Análise de Causas de Contaminação

3.1 Comparação de métodos operatórios e matérias-primas de produtos críticos

Após a análise dos componentes e métodos operatórios dos produtos considerados críticos, é possível perceber que não comparando os métodos e componentes daqueles que são da mesma família (Produto B/C e Produto D/E), todos possuem componentes, métodos e equipamentos de produção diferentes, com a exceção da utilização de Anti-Espumante e Solução Espessante em todos eles (procedimento normal para todas as suspensões concentradas, pois a viscosidade é um fator importante para a criação de uma suspensão).

Desta maneira podemos assumir que a contaminação, se for gerada na formulação dos produtos e assumindo que a fonte de contaminação será a mesma em todos os produtos que estejam contaminados, apenas poderia ter origem nestes dois componentes.

Além disso podemos considerar que apenas existindo 4 matérias ativas em causa nestes 5 produtos a contaminação pode ser introduzida por elas.

Podemos também considerar, que tendo em conta que existem outros produtos da mesma tipologia que são formulados nos mesmos equipamentos que estes e até com alguns do co-formulantes iguais, pode existir uma razão a nível molecular que torne estas matérias-ativas mais suscetíveis a contaminação, ainda assim a contaminação teria de ser introduzida neles de algum modo, sendo que estes produtos seriam melhores meios de incubação para estes microrganismos do que os outros, e apresentando assim maior contaminação.

3.2 Causa-Efeito de Contaminação

Após o estudo dos fatores que podem gerar a contaminação microbiológica e a observação dos métodos operatórios na fábrica, tanto de formulação como de embalagem, foi elaborado um diagrama de possíveis causas de contaminação, com o objetivo de avaliar todos estes fatores de forma a perceber quais deles são fontes de contaminação e quais não apresentam um risco [36-39].

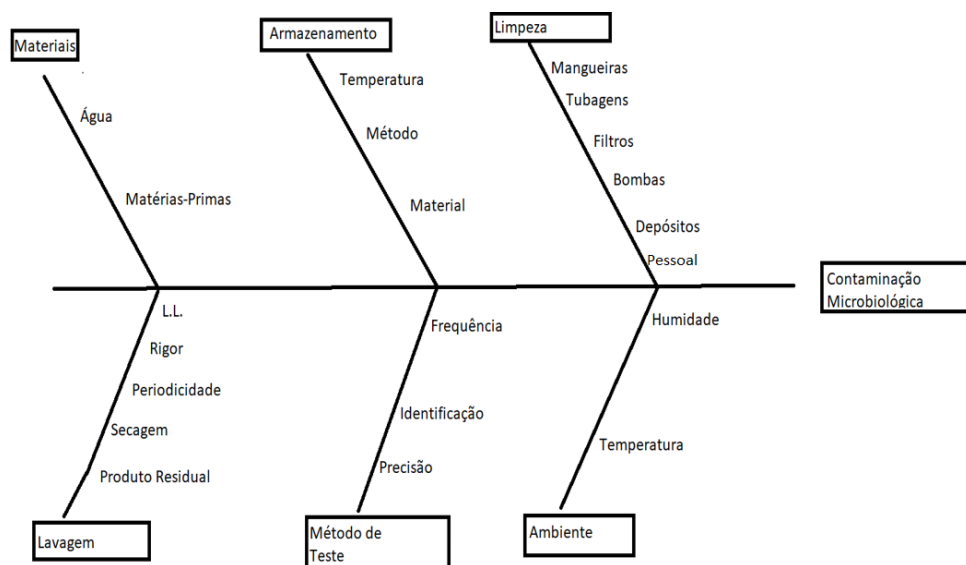


Figura 5 Diagrama Causa-Efeito de contaminação.

Para facilitar esta avaliação foram estudadas as condições ótimas para a prevenção de crescimento microbológico para cada um dos fatores através de guias e diretrizes de boas práticas de segurança e higiene para a prevenção de crescimento microbológico, tendo estas condições para cada um dos fatores foram então comparados com o que acontece na fábrica de forma a perceber quais destes fatores não estão a funcionar em condições ótimas para a prevenção de crescimento microbológico.

O layout da fábrica, a qualidade do ar, da água utilizada no processo, as matérias-primas e a limpeza das instalações, juntos com outros fatores são determinantes para o potencial crescimento de culturas microbianas.

No entanto existem fatores como os do ambiente de produção (temperatura, pH e humidade) que não são alteráveis, pois são necessários para a correta formulação dos produtos.

Destes os fatores de limpeza e lavagem serão os mais importantes, dadas as condições em que o crescimento microbiano ocorre.

3.2.1 Critérios de qualidade da água

A água utilizada no processo é a matéria-prima mais crítica para a prevenção do crescimento microbiano, sendo que é o meio onde mais facilmente as bactérias se desenvolvem, como tal, a qualidade da água utilizada no processo tem de estar assegurada.

É essencial que a água do processo, geralmente a matéria-prima com o maior conteúdo no produto final, esteja livre de bactérias e fungos. No entanto, a menos que seja utilizada água estéril no processo de fabricação, a água do processo não será totalmente livre de microrganismos.

3.2.2 Matérias-Primas

Os microrganismos podem ser introduzidos no ambiente de fabricação através de matérias-primas contaminadas. O estado microbiológico de uma matéria-prima depende sua natureza, origem e processo de fabricação, bem como transporte, e condições de armazenamento. O contato com a água e o ar é especialmente importante.

3.2.3 Condições de armazenamento

O armazenamento de matérias-primas, produto acabado e materiais de embalagem deve ser feito num armazém com um ambiente seco, com limpezas periódicas para limitar a possível contaminação microbiológica aérea.

Como o armazenamento de líquidos deve ser sempre feito em contentores selados, a contaminação microbiológica por fatores externos é menos provável.

Contentores com concentrados de base aquosa devem ser mantidos selados exceto quando esses concentrados são usados.

3.2.4 Reutilização

Para a reutilização de equipamento e material de armazenamento a regra deve ser o conhecimento do seu estado de contaminação, tirando amostras e analisando para garantir que esses equipamentos não estão contaminados

Para a reutilização de líquidos de lavagem deve ser feito o mesmo processo, sendo que contendo água estão mais sujeitos a contaminação. De forma a prevenir a contaminação do líquido de lavagem e garantir a possibilidade da sua reutilização (que reduz imenso o desperdício e os a utilização de água na instalação) podem-se tomar algumas medidas como a adição de biocida nos contentores de armazenamento, de forma a prevenir o crescimento microbiano.

3.2.5 Produto Residual

Uma fonte comum de microrganismos é o produto residual deixado no equipamento de produção. Se ocorreu crescimento microbiano no produto final e parte desse produto permanece para trás no equipamento de processo, contaminará o próximo lote com microrganismos. Como esses microrganismos já estão adaptados para crescer no produto, eles vão crescer prontamente no produto fresco que está a ser produzido.

3.2.6 Mangueiras

As mangueiras utilizadas para introduzir a água no processo podem ser uma fonte de crescimento microbiano se for permitido que tenham água parada no interior entre utilizações.

Como tal devem ser limpas entre utilizações e idealmente penduradas verticalmente para que a água saia.

3.2.7 Limpeza da instalação

A função da limpeza é garantir que as unidades de produção e os seus equipamentos atendem a todos os padrões de prevenção e higiene de contaminação. Como tal podem ser tidos em consideração os seguintes fatores:

As tubagens devem ser drenadas, limpas e secas após a produção. Água parada na tubagem fornece um ambiente ideal para o crescimento bacteriano.

A limpeza da parte externa da tubulação deve fazer parte da limpeza de rotina. Os óculos laterais devem ser desmontados e limpos imediatamente após o término de cada produção.

Os filtros feitos de metal devem ser limpos regularmente (por exemplo, entre lotes) e, se armazenados, devem ser secos. Filtros (bolsas ou cartuchos) de plástico devem ser substituídos. Se não forem limpos ou substituídos podem acumular microrganismos e inocular repetidamente o produto à medida que ele passa.

3.2.8 Pessoal

Os microrganismos podem ser introduzidos nas formulações pelos operadores, pessoal de manutenção, visitantes, que devem evitar o contato com produtos e material de produção. Assim sendo a higiene pessoal e da roupa utilizada na produção tem de ser uma prioridade. Além disto é também prioritário o bom tratamento dos equipamentos de proteção individual (EPI's) de forma a que estes não sejam fontes de contaminação.

3.3 Reflexão destes factores na instalação

Fotografias ilustrativas dos fatores analisados encontram-se no Anexo B.

3.3.1 Qualidade da água

A água utilizada no processo e na limpeza provém das Águas do Sado.

É captada a elevada profundidade e desinfetada com hipoclorito de sódio e executa o exigente Programa de Controlo de Qualidade da Água (PCQA), aprovado pela Entidade Reguladora de Água e Resíduos (ERSAR).

No entanto qualquer irregularidade com a qualidade da água pode ser geradora e propagadora de contaminação na formulação de produtos.

3.3.2 Matérias-Primas

Não existe uma amostragem frequente das matérias-primas que chegam à fábrica, qualquer contaminação que esteja presente nas matérias-primas irá ser passada para os produtos formulados.

3.3.3 Condições de armazenamento

Todas as matérias-primas e produtos acabados são armazenados em ambiente seco e em contentores selados em armazéns separados da produção e embalagem.

No entanto co-formulantes produzidos na formulação como espessantes são armazenados na secção correspondente, onde as condições são menos favoráveis (temperatura, humidade) e podem assim criar contaminação que é passada para os produtos formulados.

3.3.4 Reutilização

O material de plástico reutilizado para carregar produtos líquidos é limpo em estações de limpeza instaladas na formulação, no entanto por vezes esta limpeza não é feita de forma imediata após a sua utilização ou nem entre formulações, isto acontece com as barricas de pesagem, utilizadas para fazer a pesagem das pré-misturas e co-formulantes utilizados.

Alguns contentores intermédios (IBC's) utilizados para processos intermédios da formulação, muitas vezes como pulmão para passagem do produto de um equipamento para outro, são também reutilizados durante este processo, por vezes com algumas horas de intervalo, sendo que nesse intervalo podem criar contaminação e passá-la para o produto

Isto também acontece com outros equipamentos de plástico utilizados na formulação (funis, torneiras)

As estações de limpeza nas secções da formulação são também por vezes negligenciadas em alturas de produção elevada e contínua, deixando os equipamentos utilizados para a limpeza com incrustações que podem gerar contaminação e propagá-la para formulações seguintes.

No que toca a líquidos de lavagem a sua não reutilização constitui um desperdício e um gasto adicional de utilidades, mas a reutilização dos mesmos constitui um perigo microbiológico,

pois contendo água e sendo armazenados em contentores de plástico durante algum tempo, existe uma elevada probabilidade de crescimento microbiológico neles, que após ser testada foi confirmada, muitos deles possuíam crescimento microbiológico ao fim de algum tempo de armazenamento, sendo que ficam inviabilizados para reutilização e tornam-se assim também um desperdício.

De forma a contrariar esta situação foi pensada a adição de biocida a estes líquidos de lavagem, de forma a contrariar o crescimento microbiológico e viabilizar de novo a reutilização destes líquidos, os resultados desta experiência estão descrito na tabela a baixo:

Produto	Identificação		Resultado amostragem		Tempo (dias)					
	Lote	Paleta	Após 24h	Após 48h	0	30	60	90	120	275
J	X	BA-123	ND	Presença de fungos	ND	ND	ND	ND	ND	ND
I	Y	BC-124	Presença De bactérias		ND	ND	ND	ND	ND	ND
K	Z	CB - 125	ND		ND	ND	ND	ND	ND	ND
L	O	BD-126	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Figura 6 Resultados da adição de biocida a líquidos de lavagem. Legenda: AM - análises microbiológicas; AMB - análises microbiológicas com biocida; AR - aguarda resultados; ND - não detetado; 24 - bactérias detetadas às 24h; 48 - bactérias detetadas às 48h. Nomes dos produtos rasurados por motivos de confidencialidade

Tempo(dias)

Adicionou-se o Acticide DBW20 a todos os lotes, é possível verificar que 2 apresentavam crescimento bacteriano e que após a adição do Acticide a contaminação foi eliminada

Sendo feito este teste, o método de proteção dos líquidos foi viabilizado e a sua reutilização pode assim começar a ser efetuada.

3.3.5 Produto Residual

Idealmente o produto residual seria limpo imediatamente após a produção de forma a não existir crescimento bacteriológico, muitas vezes isto não é possível devido ao funcionamento contínuo da fábrica, no entanto é sempre efetuada a lavagem antes do começo de uma nova campanha de produção no mesmo equipamento.

No entanto isto pode gerar incrustações difíceis de remover que por essa razão permanecem nos equipamentos e podem ser fonte de contaminação microbiológica.

3.3.6 Mangueiras

As mangueiras utilizadas na formulação, muitas vezes não são esvaziadas e guardadas de forma a não deixar água parada dentro das mesmas, de igual forma também não existe uma secagem após a utilização, existindo assim um risco de crescimento microbiológico vindo das mangueiras.

3.3.7 Limpeza da Instalação

Como visto anteriormente, tanto na formulação como no embalamento, quando existe uma mudança do produto embalado/formulado existe uma limpeza do circuito para a prevenção de contaminação cruzada, quando se trata de produtos críticos, esta limpeza inclui uma lavagem com a adição de biocida, constituindo assim um método eficaz de prevenção de contaminação no circuito, no entanto não existe um processo de secagem, que em caso de não ser usado biocida na lavagem, seria um complemento final à eficácia da lavagem.

A parte externa das tubagens não recebe uma limpeza regular, podendo assim criar incrustações e até deteriorar as tubagens.

Filtros, esferas de moagem são limpos e substituídos com regularidade e não constituem um perigo de contaminação.

3.3.8 Pessoal

É utilizada roupa de proteção em todas as fases de produção e embalamento, são disponibilizadas várias destas roupas e existe uma lavandaria dentro da instalação. No entanto a higiene pessoal e a lavagem regular do equipamento continua a ser da responsabilidade do operador. Muitas vezes os EPI's são abandonados em locais da instalação em momentos de pausa ou almoço, estando assim expostos ao ambiente e a possíveis contaminações, sendo que depois desses momentos são utilizados de novo sem preocupação.

3.4 Matriz GUT

Sendo que nem todos estes fatores se encontram em estado ótimo, especialmente os fatores relacionados à limpeza, identificada anteriormente como uma das áreas mais importantes, foi elaborada uma tabela GUT (Gravidade, Urgência, Tendência) para avaliar a prioridade de resolução de cada um dos fatores.

- **Gravidade:** Para este conceito, é preciso definir o quanto as consequências do problema afetarão a produção.
- **Urgência:** O que ocorrerá se o problema não for resolvido imediatamente? É possível esperar, ou as operações serão paralisadas? Há um plano de contingência? Consideram-se esses fatores para definir a velocidade com que o problema deve ser resolvido.
- **Tendência:** Qual a probabilidade de o problema ficar cada vez pior se não for resolvido logo? A tendência é tornar a operação cada vez mais difícil?

Com base nesses critérios, atribua notas seguindo esta escala:

1. Não é um problema urgente e nem grave, não causa danos imediatos.
2. Pouco urgente, pouco grave será pior apenas a longo prazo
3. Urgente e grave e vai se agravar em médio prazo.
4. Muito grave e também muito urgente, deve piorar em curto espaço de tempo.
5. Extremamente urgente e grave na mesma medida. Precisa ser solucionado antes que piore.

As notas são colocadas na matriz e multiplicadas (GUT) de forma a saber qual a ordem de resolução de problemas que deve ser aplicada [40].

Tabela 2 Matriz GUT.

Problema	Gravidade	Urgência	Tendência	GUT
Mangueiras	3	2	2	18
Reutilização de Plásticos	4	3	4	48
Produto Residual	3	3	3	27
Limpeza da Instalação	3	2	4	24
Pessoal	3	2	2	12

Assim sendo a ordem de importância de resolução deve ser Reutilização de Plásticos -> Produto Residual -> Limpeza da Instalação -> Mangueiras -> Pessoal

Em relação às classificações atribuídas é importante dar algum contexto para a racionalização das mesmas:

Mangueiras – Apesar de as mangueiras não estarem normalmente bem assentes de forma a escoar água residual ou não terem secagem, estas são trocadas sempre que existem rasgões ou furos, o que acontece com alguma frequência, dessa forma a Urgência e Tendência da resolução deste problema recebem notas mais baixas

Reutilização de Plásticos – É um problema grave e com tendência a piorar, devido à fácil criação de incrustações no plástico onde se podem criar ou alojar microrganismos que serão difundidos para formulações posteriores

Produto Residual – É um problema com Gravidade, Urgência e Tendência médios, pois é pouco comum e normalmente apenas acontece em linhas onde esteja a ser formulado o mesmo produto em sequência, sendo assim por vezes descurada a limpeza, no entanto, a existência de microrganismos em um pedaço de produto residual em um equipamento pode contaminar toda a linha, formulações seguintes e se deixado tempo suficiente pode até permitir a criação de microrganismos que se propaguem pelo ar e contaminem outros equipamentos.

Limpeza da Instalação – É uma situação com tendência a piorar pois a acumulação de pós ou incrustações na parte de fora dos equipamento pode criar não só contaminação microbiológica como danos aos próprios equipamentos, no entanto, em ambiente fabril e especialmente na indústria agroquímica seria impossível ter um local de formulação acético ou sempre totalmente limpo, devido à própria natureza da indústria e a gravidade e urgência da situação refletem isso.

Pessoal- Tal como a limpeza da instalação é impossível garantir que os operadores das várias linhas não sejam fontes de contaminação microbiológica, a situação na Ascenza está bem-acondicionada, sendo disponibilizado equipamento de proteção e lavagem regular do mesmo. No entanto existe sempre a possibilidade de descuido ou erro humano e ser introduzida contaminação através de um operador, com esta possibilidade a ser aumentada com o pouco cuidado com os EPI's e a contaminação a que estão expostos.

4. Ações Corretivas e Preventivas

Após os estudos anteriores feitos em conjunto com a THOR, foram postas em prática medidas corretivas e preventivas de modo a prevenir a contaminação microbiológica dos produtos e do equipamento da operação são aplicados dois métodos:

4.1 Prevenção e Monitorização

Lavagem Mecânica - Depois do uso de qualquer equipamento é feita a lavagem do mesmo através da aplicação de água e em alguns casos esfregando os equipamentos para retirar remanescentes dos produtos ou matérias-primas utilizados

Lavagem com Biocida – Depois e antes da formulação ou embalagem de um produto denominado crítico ou depois de uma paragem de 7 dias de um equipamento, é efetuada uma lavagem do mesmo através da recirculação de água com biocida pelo circuito de forma eliminar bactérias que possam ter crescido nos equipamentos.

Quando um método de lavagem é utilizado para limpar um equipamento e a amostragem do laboratório determina que o método é eficaz para prevenir contaminação no equipamento, esse método é validado e será utilizado posteriormente para todas as lavagens que incluam o mesmo produto e equipamento, essa validação tem ela própria uma validade, após a qual o método tem de ser revalidado.

Além destas amostras, são retiradas outros dois tipos de amostras nas lavagens dos equipamentos, referenciadas como amostra de monitorização e amostra microbiológica.

A amostra de monitorização é retirada sempre um equipamento não é utilizado há mais de 7 dias, nessa situação o equipamento recebe uma lavagem anterior há utilização da qual é retirada uma amostra do líquido de lavagem após a mesma. Isto acontece também antes e depois da formulação ou enchimento de um produto denominado crítico (amostra microbiológica).

Estas amostras são retiradas levadas para o laboratório de controlo de qualidade onde é utilizado um kit de cultura microbiológica que permite em 48 horas perceber se a amostra está contaminada com algum microrganismo.

De forma a uniformizar este processo foram criadas a Checklist de Limpeza e Instruções Operatórias para a prevenção de crescimento microbiológico que são apresentadas abaixo.

4.2 Checklist de Limpeza

A verificação dos processos de limpeza é feita recorrendo a CheckList de Limpeza e Verificação de Equipamentos [41].

Foram definidos processos de limpeza que se encontram descritos em Instruções Operatórias e que contém informação relativa aos produtos de limpeza, a sequência das lavagens de todas as unidades das linhas, as quantidades de produto a utilizar e o número e as condições das lavagens (tempo, temperatura, agitação).

O fluxograma dos processos de validação das limpezas encontra-se descrito na imagem seguinte:

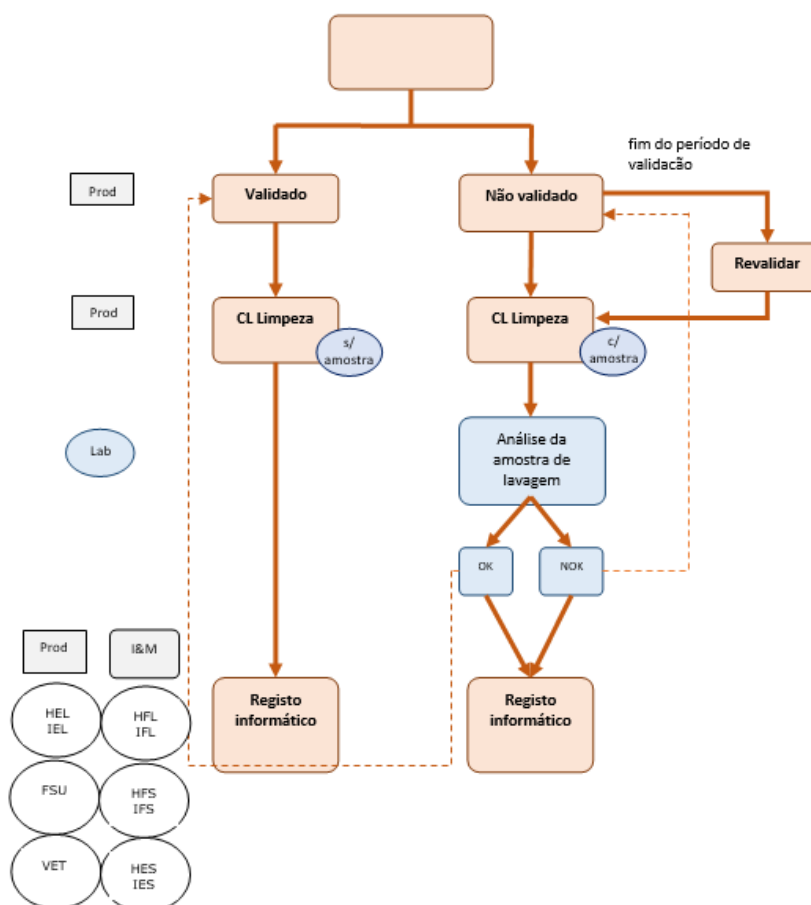


Figura 7 Circuito de método de limpeza e validação.

Procedimentos de prevenção de contaminação Bacteriológica

Formulação de Líquidos

Planta Esquemática da Instalação

Herbicidas

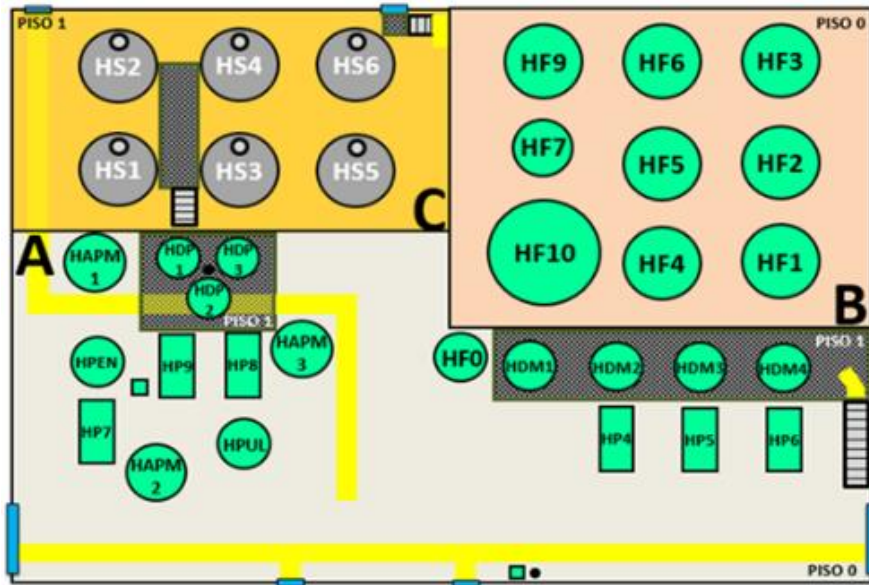


Figura 8 Equipamentos da formulação de herbicidas líquidos.

Inseticidas

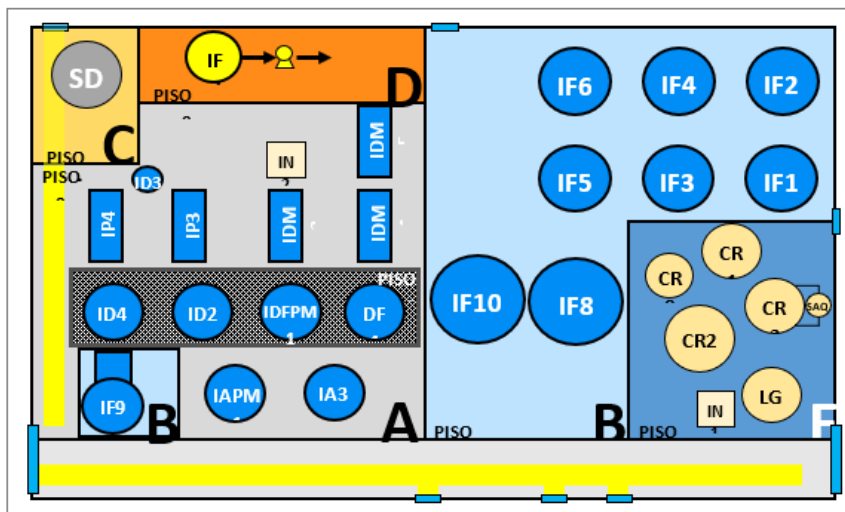


Figura 9 Equipamentos da formulação de inseticidas líquidos.

Diagrama de Processo

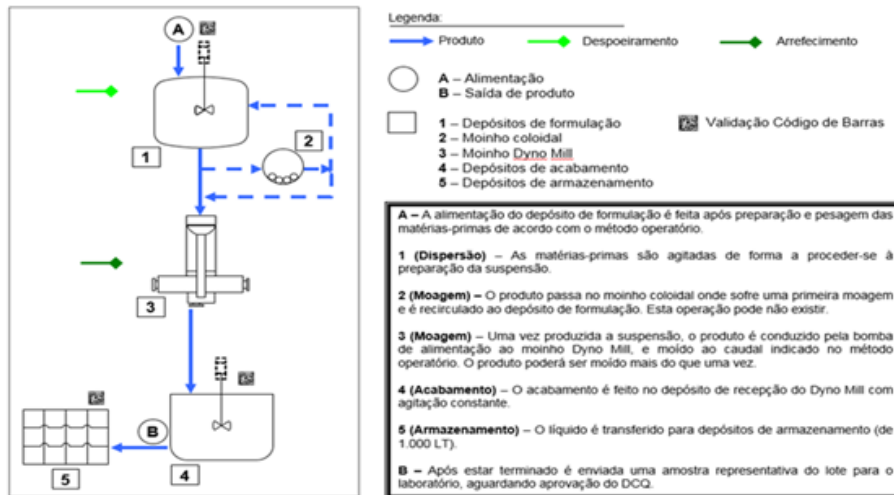


Figura 10 Diagrama de processo de formulação de líquidos.

Instruções de Limpeza

1. Solicitar Checklist de limpeza onde deverão constar os dados necessários à lavagem MB
2. Se necessária monitorização (equipamento parado mais de 7 dias) seguir procedimento descrito dos pontos 4 a 8, caso contrário iniciar formulação;
3. Para formulação de produtos críticos (anexo 1) a lavagem (sem e com biocida) deve ser efetuada antes da formulação do produto e no final da sua produção. Seguir pontos do procedimento seguintes (pontos 4 a 11);
4. Manter o sistema com as bombas e ligações usadas na formulação;
5. Instalar a recirculação (a);

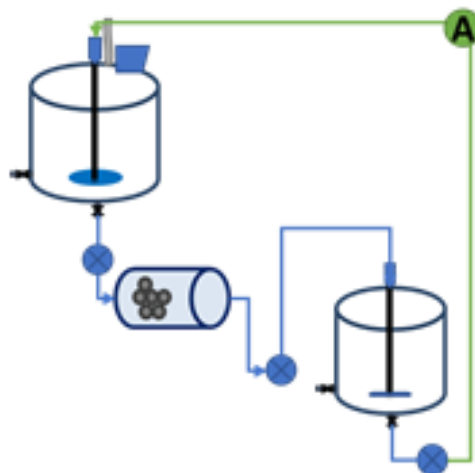


Figura 11 Circuito de lavagem de equipamentos de formulação.

6. Encher o depósito de formulação com a quantidade de líquido de lavagem indicado na Check list de limpeza;
7. Recircular durante 30 min em todo o circuito sem biocida;
8. Retirar amostra e identificá-la de acordo com a IO 66 (“A.M. (i- início; f- final produção; 7D; MP: mudança de produto) / Equipamento”);



Figura 12 Etiquetagem de frasco de amostra de lavagem sem biocida.

9. Adicionar 0.2% de biocida da quantidade de líquido de lavagem, indicar quantidade utilizada no campo das observações da Checklist de limpeza;
10. Efetuar nova recirculação durante 30 min em todo o circuito;
11. Retirar amostra e identificá-la de acordo com a IO 66 (“A.M.B(i- início; f- final produção; 7D; MP: mudança de produto) / Equipamento”).
12. Retirar LL e identificá-lo de acordo com os procedimentos em vigor.



Figura 13 Etiquetagem de amostra de lavagem com biocida.

Mudança de Produto

- Enviar amostra de monitorização
- Tempo a que o equipamento está parado < 7 dias (equipamentos parados):
Prosseguir para a formulação

- Produto crítico: efetuar lavagem antes da formulação do produto e no fim da sua produção (segundo pontos 4 a 11)
- Tempo a que o equipamento está parado > 7 dias (equipamentos parados): Efetuar lavagem de monitorização, de acordo com os pontos 4 a 8.

Área de aplicação Enchimento de Líquidos

Planta Esquemática da Instalação

Herbicidas

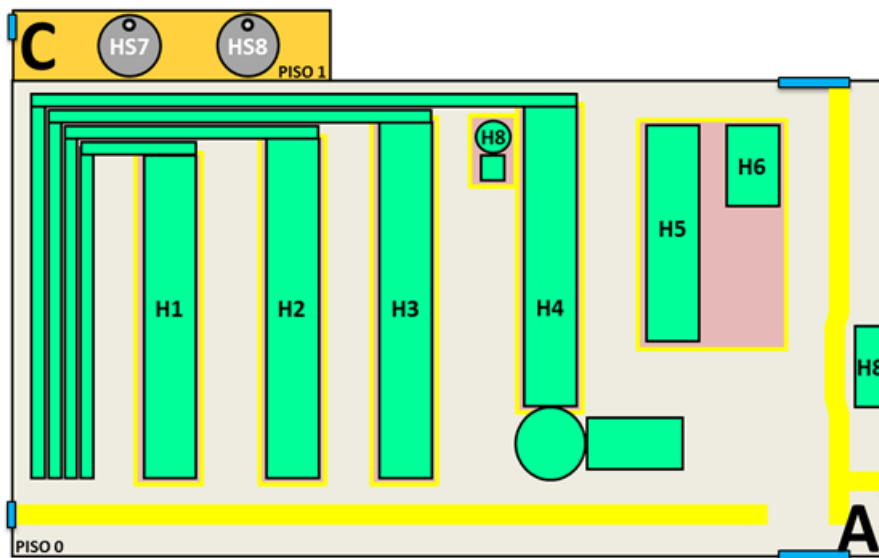


Figura 14 Diagrama das linhas de enchimento de herbicidas.

Inseticidas

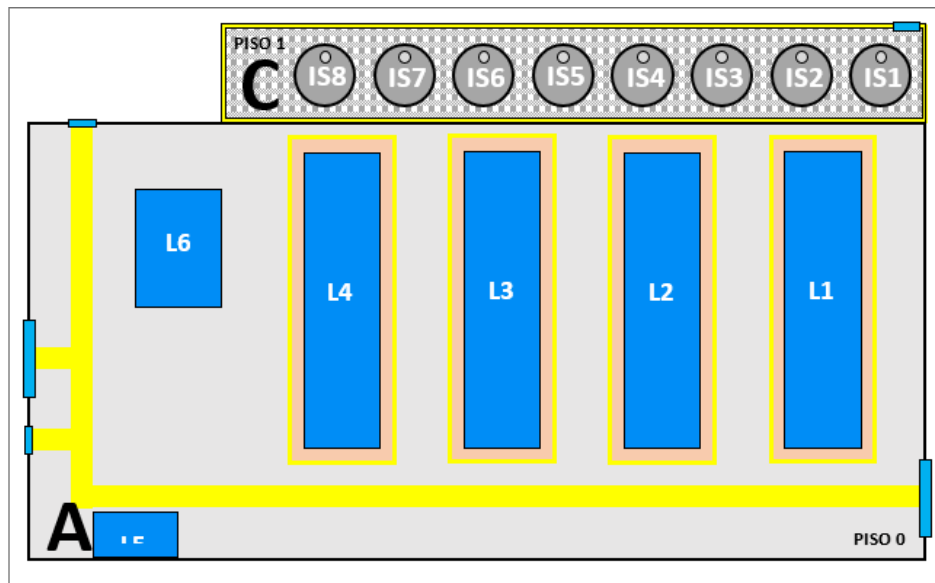


Figura 15 Diagrama das linhas de enchimento de inseticidas.

Diagrama de Processo

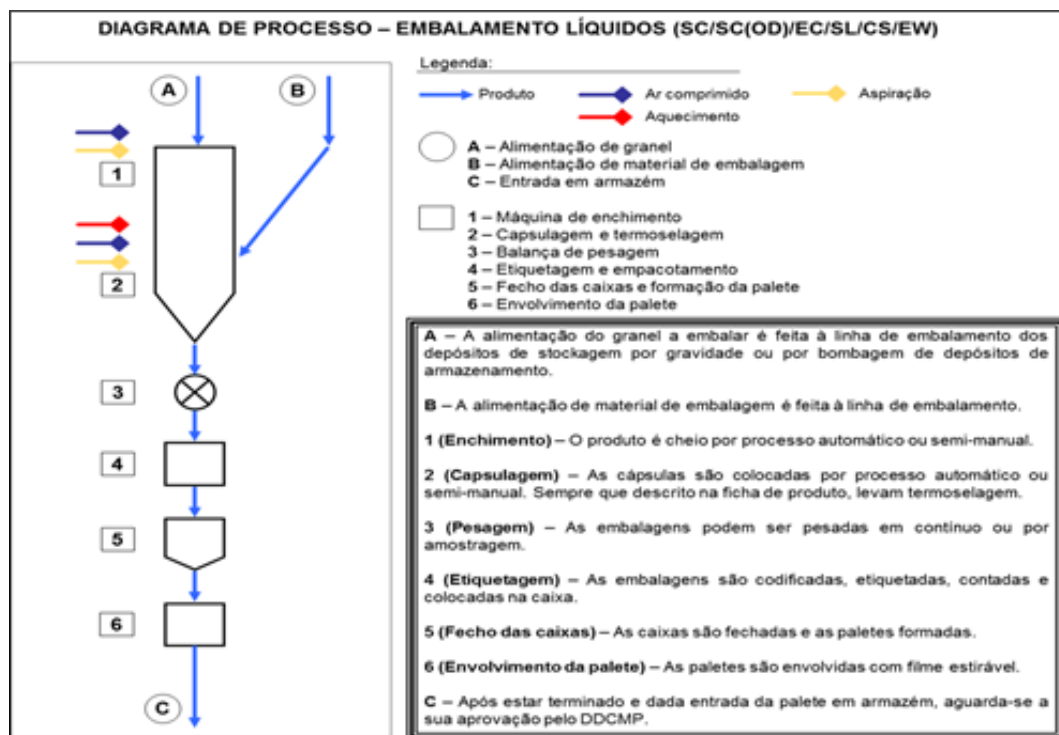


Figura 16 Diagrama do processo de enchimento.

Instruções de Limpeza

1. Solicitar Checklist de limpeza, onde deverão constar os dados necessários à lavagem MB
2. Se necessária monitorização (equipamento parado mais de 7 dias) seguir procedimento descrito dos pontos 4 a 8, caso contrário iniciar enchimento;
3. Para enchimento de produtos críticos (anexo 1) a lavagem (sem e com biocida) deve ser efetuada antes do enchimento do produto e no final da sua produção. Seguir pontos do procedimento seguintes (pontos 4 a 11);
4. Instalar a recirculação (a);

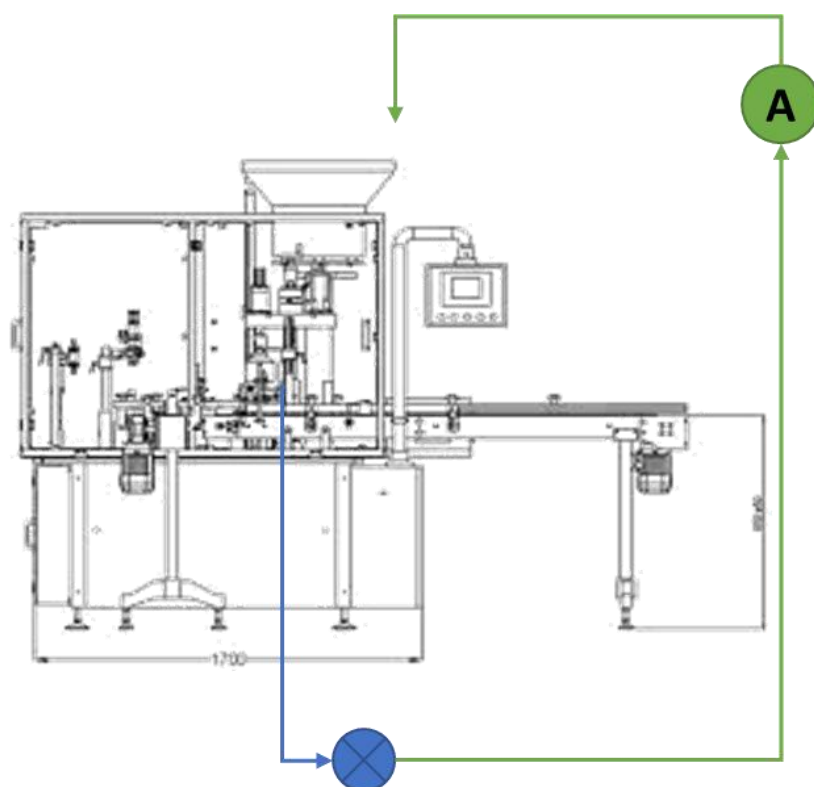


Figura 17 Diagrama da recirculação de líquido de lavagem em uma máquina de enchimento

5. Encher o depósito da máquina de enchimento com a quantidade de líquido de lavagem indicado na checklist de limpeza;
6. Recircular durante 10 min em todo o circuito sem biocida;
7. Retirar amostra e identificá-la de acordo com a IO 66 (A.M. (i- início; f- final produção; 7D) / Produto Anterior/ Lote de Embalamento/ Equip.)
8. Adicionar 0.2% de biocida da quantidade de líquido de lavagem, indicar quantidade utilizada no campo das observações da Checklist de limpeza;
9. Efetuar nova recirculação durante 10 min em todo o circuito;

10. Retirar amostra e identificá-la de acordo com a IO 66 (A.M.B(i- início; f- final produção; 7D) / Produto Anterior/ Lote de Embalamento/ Equip.)
11. Retirar LL e identificá-lo de acordo com os procedimentos em vigor.

Periodicidade de Limpeza

- Tempo a que o equipamento está parado < 7 dias:
Equipamento parado: prosseguir para a enchimento
- Produto crítico: efetuar lavagem antes do enchimento do produto e no fim da sua produção (segundo pontos 4 a 11)
- Tempo a que o equipamento está parado > 7 dias:
Enviar amostra de monitorização
Equipamento parado: efetuar lavagem de monitorização, de acordo com os pontos 4 a 7.

As amostras microbiológicas com biocida (AMB) e sem biocida (AM) são enviadas para o laboratório de controlo de qualidade e confirmada a ausência de contaminação microbiológica, o produto é libertado para transporte.

4.3 Circuito de Limpeza e amostragem

O seguimento fluxograma representa o circuito de limpeza e amostragem em ambas as formulações de líquidos na fábrica (inseticidas e herbicidas)

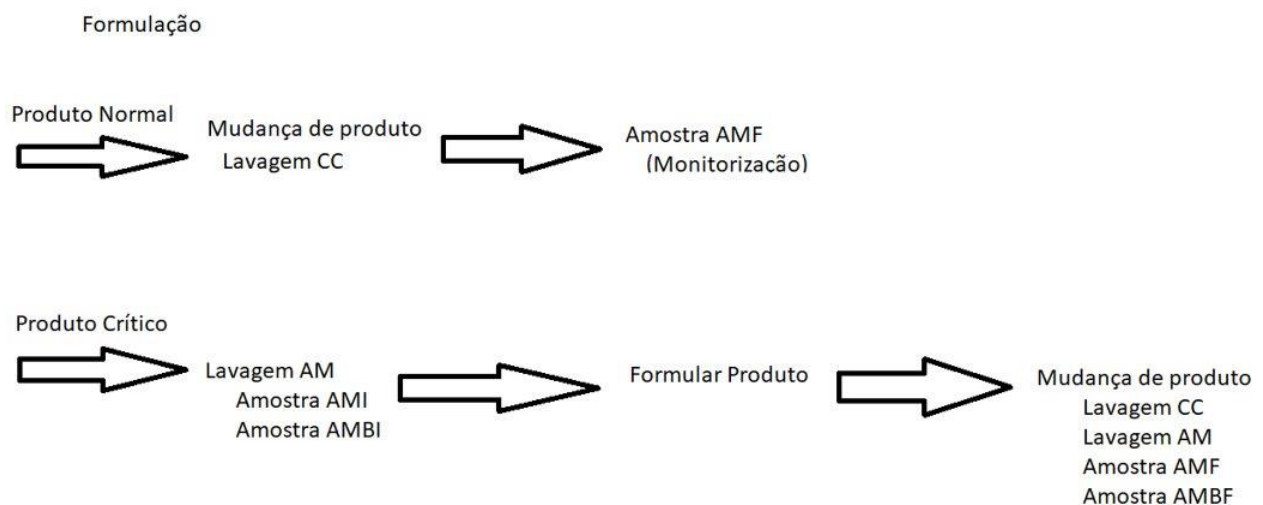


Figura 18 Fluxograma do circuito de Lavagem e amostragem na formulação.

Analogamente, no fluxograma seguinte demonstra-se o circuito de limpeza e amostragem em ambas as secções de enchimento da fábrica (inseticidas/herbicidas)

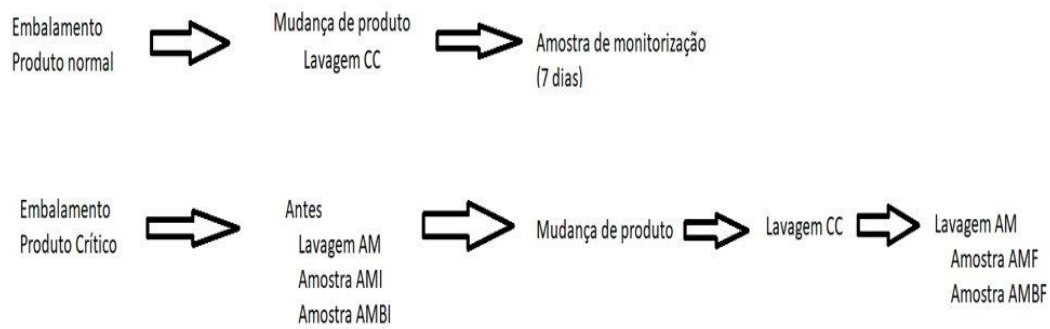


Figura 19 Fluxograma do circuito de Lavagem e amostragem no enchimento.

5. Métodos de análise

5.1 Meios de cultura para o crescimento de microrganismos

Com história a datar do século XIV e com relevância mundial nas descobertas de Louis Pasteur, este é o método mais conhecido e mais standardizado para o crescimento de culturas de microrganismos.

Um meio de cultura precisa apenas de carbono, uma fonte de nitrogénio, água e alguns sais minerais para fazer crescer diversos tipos de bactérias para que estas possam ser estudadas.

A partir deste conhecimento a tecnologia foi melhorando e através do melhor entendimento de vários tipos de bactérias foi possível perceber como criar meios de cultura seletivos, ou seja, mexer nas propriedades do meio de cultura de forma a condicionar o crescimento de alguns microrganismos e ao mesmo tempo promover o crescimento de outros. Desta forma podemos criar meios de cultura que são seletivos apenas para um tipo de bactérias, e incubá-los com amostras à nossa escolha e testá-las para a existência de um tipo específico de microrganismo [42].

Estes meios de cultura foram usados nas situações descritas no sub-capítulo 2.5.3 de forma a identificar a bactéria presente nas amostras retiradas.

5.2 Kit de deteção de microrganismos

Como único método de detetar a presença de microrganismos nos produtos formulados, nas águas de lavagem e produtos formulados é utilizado o kit de teste *Microbiology Cult Dip combi* © da Merck Chemicals.

Este kit tem dois lados com meios de cultura diferentes, de um dos lados do kit podem crescer quase todos os tipos de bactérias, e do lado oposto crescem quase todos os tipos de fungos e leveduras.



Figura 20 Imagem ilustrativa do kit Microbiology Cult-Dip combi.

As amostras são retiradas na formulação e embalagem após as lavagens (de análise microbiológica ou monitorização), de seguida são levadas para o laboratório, o kit é molhado na amostra e colocado numa incubadora entre os 27-30°C, após 24 horas podem ser lidos os resultados no lado onde crescem bactérias e após 48 horas podem ser lidos os resultados no lado onde crescem fungos e leveduras [43].

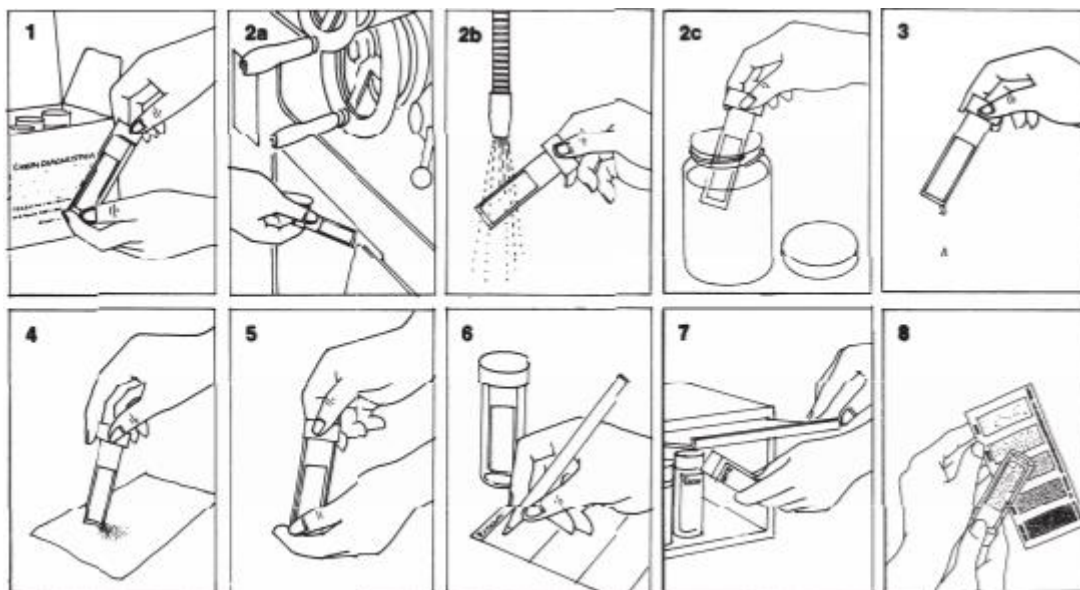


Figura 21 Instruções de utilização do kit de amostra

Além da deteção da presença de microrganismos o kit permite também uma contagem (com precisão moderada) da quantidade de microrganismos presentes na amostra, através da

observação da quantidade de culturas presentes no kit e seguindo as instruções presentes no folheto que o acompanha.

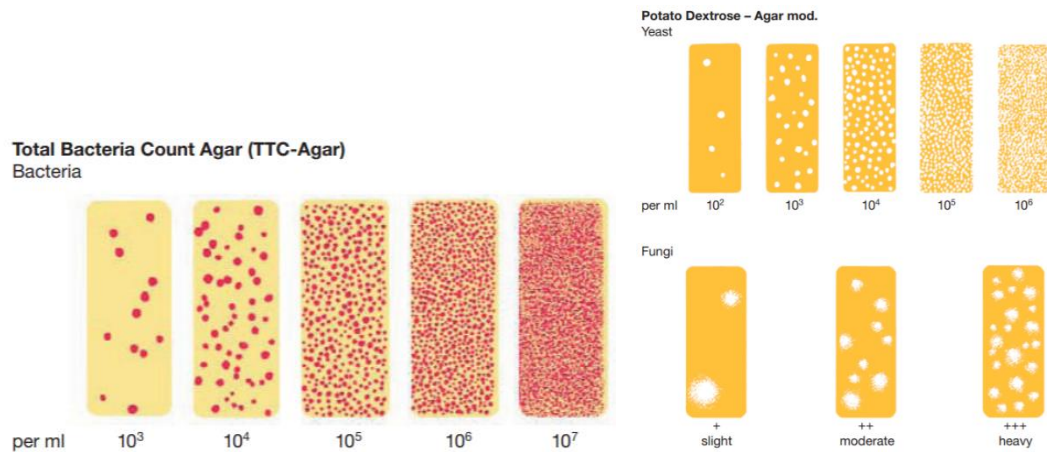


Figura 22 Instruções para a contagem de culturas no kit de amostra.

Se a presença de microrganismos for detetada nas águas de lavagem, são de seguida testados os produtos formulados nesse mesmo equipamento desde essa amostra, de forma a perceber quais deles se encontram também contaminados e precisam ser reprocessados ou tratados.

Apesar de não permitir uma contagem com alta precisão da contaminação ou uma identificação dos microrganismos presentes nas amostras, o método de teste é adequado às necessidades da operação, uma deteção rápida da presença de microrganismos nos produtos e equipamentos, que assim podem ser solucionadas antes que esses produtos saiam das instalações para os consumidores ou os equipamentos sejam utilizados para formular/encher de novo.

5.3 Biocida

O biocida utilizado nas lavagens de equipamentos da fábrica como prevenção para a contaminação biológica é proveniente da THOR, ACTICIDE DBW 20, uma dispersão em fase aquosa de DBNPA (2,2-Dibromo-3-nitrilo-propionamide) com 9 meses de vida média e livre de compostos orgânicos voláteis, conhecido pela sua elevada rapidez na eliminação de microrganismos em baixa concentração em soluções, espectro elevado de atividade

antibacteriana, não persistência química e baixo impacto ambiental, com as características ideais para ser usado em junto com água na lavagem de equipamentos [44-45].

6. Apresentação e Discussão de Resultados

6.1 Análise Estatística de amostras

Existindo já um histórico de amostragem das lavagens efetuadas, que inclui quais as máquinas usadas para formulação/enchimento dos produtos formulados anteriormente a essa lavagem, é também de interesse analisar esse histórico de forma a comprovar que os produtos críticos realmente apresentam mais contaminação que outros produtos, e permite também uma análise das máquinas, possibilitando perceber se alguma delas apresenta uma percentagem de contaminação significativamente mais elevada do que as restantes, e se essa maior contaminação se deve ao facto de nesse equipamento serem formulados mais produtos críticos.

Para tal, será feita uma contabilização das amostras contaminadas em função das amostras totais, e ainda uma análise retirando da contagem as amostras de lavagem de produtos críticos.

Nestas tabelas serão expostos vários fatores:

- **Número de amostras:** representa o número de amostras que foi retirado no total, ou num equipamento específico.
- **Amostras que são produtos críticos (%):** Percentagem das amostras que provém da lavagem de um equipamento após a passagem de um produto crítico.
- **Contaminação (%):** Percentagem das amostras que apresentaram contaminação.
- **Produtos críticos contaminados (%):** Percentagem de amostras de lavagem de produto crítico que apresentou contaminação.
- **Produtos críticos nas amostras contaminadas (%):** Percentagem das amostras contaminadas que provém de uma lavagem de produto crítico.
- **Contaminação sem produtos críticos (%):** Percentagem de contaminação se forem retiradas da contagem as amostras de lavagem de produto crítico.

Estas amostras estão agrupadas em: amostras de enchimento, formulação e por secção (inseticidas /herbicidas) e foram retiradas ao longo de um ano (Setembro 2019 - Setembro 2020). Linhas com menos de 5 amostras retiradas não estão representadas na tabela 3.

Tabela 3 Tabela de resultados de amostras retiradas nas secções de enchimento.

	L1	L2	L3	L4	H2	H3	Total
Número de amostras	53	24	70	46	34	37	266
Amostras que são produtos críticos (%)	36,0	33,0	47,0	46,0	44,0	43,0	41,0
Contaminação (%)	15,1	16,7	10,0	10,9	47,1	45,9	21,3
Produtos críticos contaminados (%)	21,1	25,0	15,2	19,0	46,7	56,3	27,7
Produtos críticos nas amostras contaminadas (%)	50,0	50,0	71,4	80,0	43,8	52,9	53,4
Contaminação sem produtos críticos (%)	11,8	12,5	5,4	4,0	47,4	38,1	16,9

L1-L4 – Linhas de enchimento de inseticidas

H2-H3 – Linhas de enchimento de herbicidas

Os produtos críticos representam 41% das amostras retiradas, variando entre 33% e 47% do total das amostras nas diferentes linhas. No entanto, apresentam um peso na contaminação que varia entre 43,8% (linha H2) e 80% (linha L4)

Não estão incluídas na tabela, as linhas que não tiveram enchimento de produto crítico, sendo que não possuíam um número relevante de amostras e não apresentavam contaminação (H1=5 amostras e H6 = 1 amostra)

Em termos da contaminação total de amostras retiradas nas secções de enchimentos, 21,3% apresentava contaminação, sendo que os produtos críticos representam 50% das amostras contaminadas. (Tabela 3).

Separando as amostras entre as duas secções de enchimento (inseticidas/herbicidas) podemos ver o número de amostras e amostras contaminadas em cada uma delas. Desta forma poderemos analisar os enchimentos no geral e por secção.

Tabela 4 Amostras de enchimentos

	Enchimento inseticidas	Enchimento Herbicidas
Nº de amostras	193	71
Amostras contaminadas	23	33

Temos bastante mais amostras no enchimento de inseticidas, no entanto este enchimento apresenta menos amostras contaminadas que o de herbicidas.

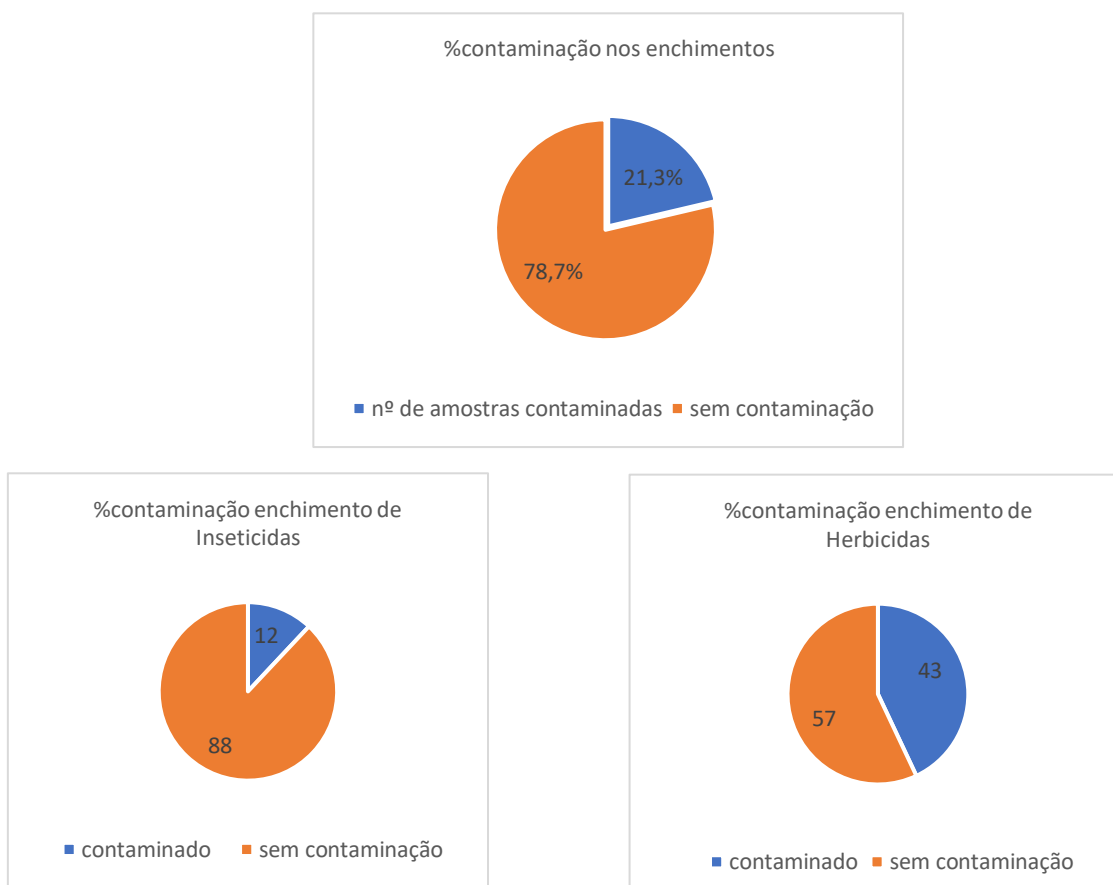


Figura 23 Percentagens de contaminação nos enchimentos.

Na Figura 23 podemos ver o total de contaminação em ambas as secções de enchimento e separados individualmente (inseticidas/herbicidas). É possível verificar qual delas é mais afetada pela contaminação, sabendo à priori, que existem quatro produtos críticos na secção de inseticidas e apenas um na secção de herbicidas. Neste caso, seria de prever que os inseticidas apresentassem mais contaminação, no entanto a contaminação no enchimento de herbicidas é 3 vezes superior, em termos de percentagem. Isto poderá ser explicado pela diferença no número de amostras retiradas, isto é um maior número de amostras retiradas no enchimento de inseticidas, que poderá diluir a percentagem de contaminação.

De seguida, passar-se-á à análise de amostras retiradas nas secções de formulação.

Na Tabela 5 são apresentados os dados das amostras retiradas na formulação de inseticidas.

Tabela 5 Tabela de resultados de amostras na formulação de inseticidas

Formulação Inseticidas	Total	IDM 3	IDM 4	IDM 5	DF1	DF4	IA3	CR0	CR2	CR3
Nº de amostras	65	23	24	24	18	34	22	9	9	9
Amostras que são produtos críticos (%)	52,3	17,4	41,7	8,3	44,4	29,4	36,4	100,0	100,0	100,0
Contaminação (%)	44,6	43,5	25,0	41,7	38,9	38,2	36,4	55,6	88,9	88,9
Produtos críticos contaminados (%)	52,9	75,0	40,0	0,0	50,0	40,0	50,0	55,6	88,9	88,9
Produtos críticos nas amostras contaminadas (%)	62,1	30,0	66,7	0,0	57,1	30,8	50,0	100,0	100,0	100,0
Contaminação sem produtos críticos (%)	29,0	36,8	14,3	45,5	30,0	37,5	28,6	0,0	0,0	0,0

IDM- Dyno Mill Inseticidas; DF- Depósito de formulação; IA- Inseticidas acabamento; CR- Recirculação de suspensão de cápsulas.

Na formulação de inseticidas, a contaminação observada nas amostras, é consideravelmente mais acentuada. Isto pode ser explicado pelo fato de nesta formulação existirem quatro produtos críticos ao contrário da formulação de Herbicidas onde existe apenas um produto crítico. Isto significa que na formulação de inseticidas existe mais amostragem de lavagens de produtos críticos. Assumindo que estes produtos geram mais contaminação, é esperado que nesta formulação exista mais contaminação.

Os equipamentos nos quais não ocorre a formulação de produtos críticos, não apresentam contaminação ou apresentam contaminação ligeira, apesar de terem poucas amostras.

Como anteriormente, passar-se-á a uma análise mais detalhada dos fatores mais importantes relacionados com a contaminação. Onde se pode observar que cerca de metade (53%) das amostras de produtos críticos que passaram nesta formulação apresentaram contaminação.

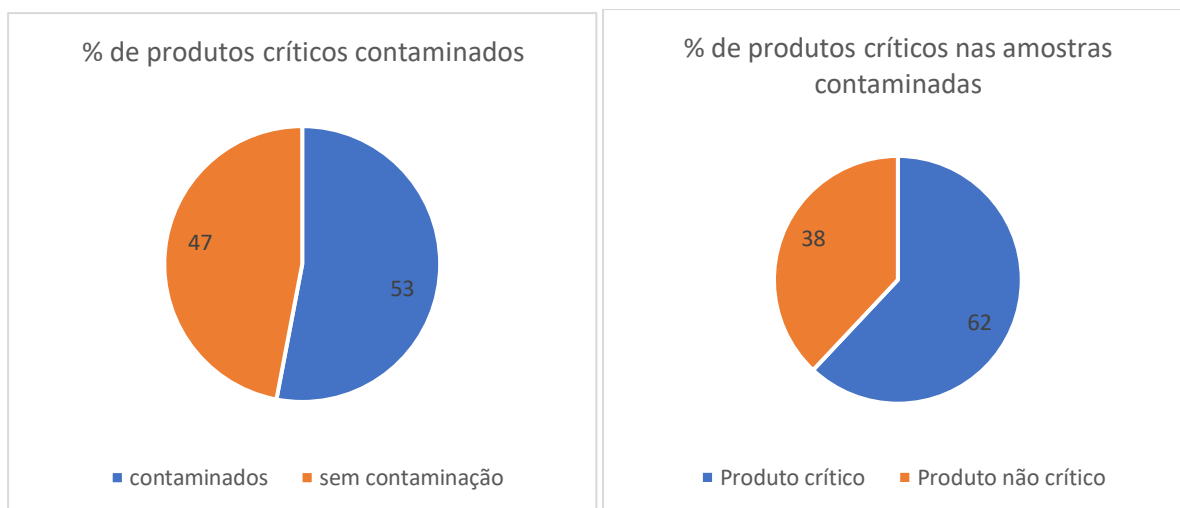


Figura 24 Percentagens de contaminação na formulação de inseticidas

Além disso, na formulação de inseticidas, os produtos críticos representam 62% do total da contaminação observada apesar de representarem 52% do total de amostras.

Na Tabela 6 é apresentada a análise referente às amostras referentes à formulação de herbicidas, separadas em total de amostras e por equipamento usado na formulação da qual foi retirada a amostra.

Tabela 6 Tabela de resultados de amostras na formulação de herbicidas.

Formulação Herbicidas	Total	DM1	DM2	DM3	DM5	DM6	HDM 1	HDM 2	HDM 4	HDP 3
Nº de amostras	39	15	8	7	7	7	9	10	11	8
Nº de amostras sem críticos contaminadas	10	4	2	1	2	2	2	2	3	2
% de amostras que são produtos críticos	20,5	26,7	12,5	28,6	0,0	14,3	33,3	40,0	27,3	12,5
% de contaminação	35,9	46,7	25,0	28,6	28,6	28,6	44,4	40,0	45,5	25,0
% de produtos críticos contaminados	50,0	75,0	0,0	50,0	0,0	0,0	66,7	50,0	66,7	0,0
% de produtos críticos nas amostras contaminadas	28,6	42,9	0,0	50,0	0,0	0,0	50,0	50,0	40,0	0,0
% de contaminação sem produtos críticos	32,3	36,4	28,6	20,0	28,6	33,3	33,3	33,3	37,5	28,6

DM- Dyno-Mill; DP- Dispermix

Na formulação de herbicidas existe apenas um produto crítico (Produto A). No entanto as lavagens relativas à formulação de Produto A são uma pequena percentagem das amostras de lavagens totais, e mesmo assim representam uma quantidade elevada da contaminação geral dos equipamentos, tendo na maioria das vezes um peso superior a 50% na contaminação

Nas figuras seguintes pode encontrar-se as percentagens de contaminação não contando com os produtos críticos, e a percentagem de produtos críticos presente em todas as amostras de forma a avaliar o impacto deste produto crítico na contaminação geral da secção.

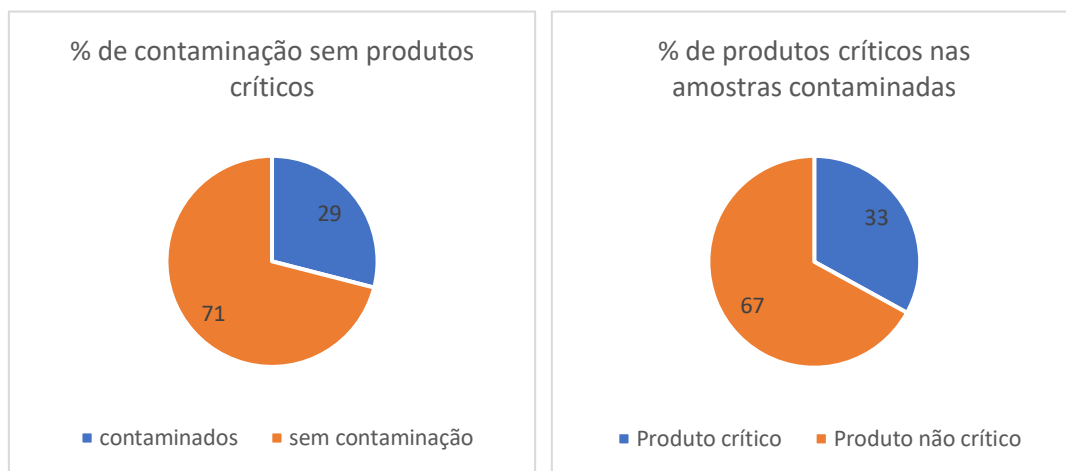


Figura 25 Percentagens de contaminação na formulação de herbicidas

Nesta secção, ao contrário do que se tinha observado anteriormente, verificou-se a existência de contaminação em equipamentos nos quais não foram formulados quaisquer produtos críticos.

Contrariamente ao observado nas secções anteriores, onde os produtos críticos representam mais de 50% da contaminação, nesta secção o produto crítico apenas representa 28,6% da contaminação total. A percentagem total de contaminação seria até superior em vários equipamentos se não existissem amostras de produtos críticos, tal como se pode observar na tabela 6.

Esta situação pode indicar que existem mais produtos semelhantes aos críticos na formulação de herbicidas, ou que nesta secção existem mais falhas de limpeza do equipamento ou escorrimento de mangueiras.

Além do número de amostras é ainda possível analisar a evolução da contaminação ao longo do tempo por secção (enchimento, formulação de inseticidas, formulação de herbicidas), sendo que o número de amostras mensais não é elevado, foi realizada uma divisão de períodos de forma a que os dados estatísticos sejam assim mais relevantes. Os períodos escolhidos foram então, Setembro-Dezembro 2019, Janeiro-Abril 2020 e Maio-Setembro 2020. Tendo em conta que, a temperatura é um dos fatores mais importantes para o crescimento microbiológico, estes períodos também representam mudanças de temperatura, tanto na temperatura ambiente como na temperatura da água na região de Setúbal. Sendo o primeiro período representativo de uma baixa de temperatura, o segundo período correspondente a uma temperatura baixa constante e o terceiro uma subida de temperatura.

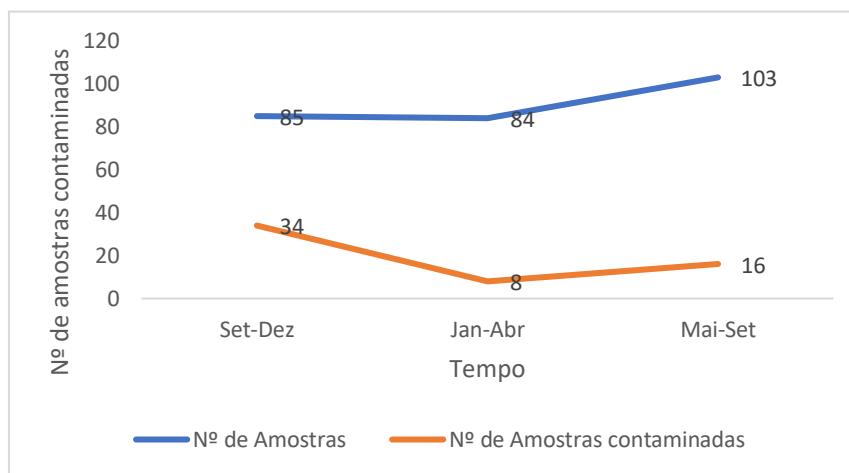


Figura 26 Contaminação e número de amostras ao longo do tempo no enchimento

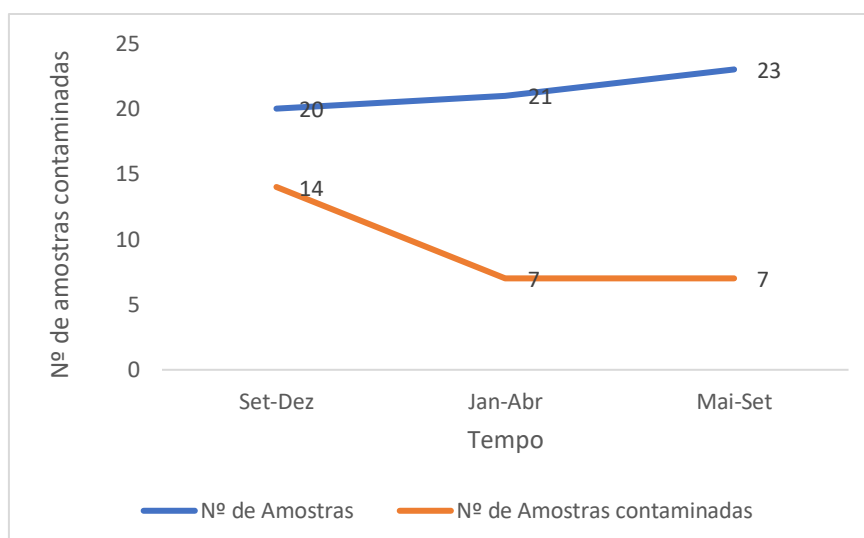


Figura 27 Contaminação e número de amostras ao longo do tempo na formulação de inseticidas.

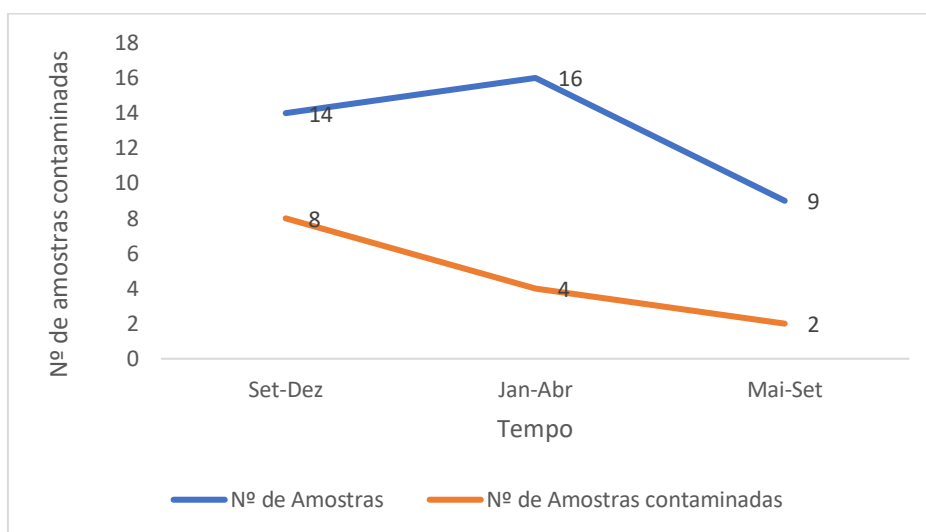


Figura 28 Contaminação e número de amostras ao longo do tempo na formulação de inseticidas.

Como é visível em todas as secções, existe uma descida do grau de contaminação no primeiro período, seguido de uma estagnação no segundo período e no caso dos enchimentos e da formulação de inseticidas, uma subida ligeira no terceiro período, no caso dos herbicidas líquidos a descida continua após o período de estagnação.

Nestes mesmos períodos pode-se constatar que a quantidade de amostras retiradas é proporcional à variação no número de amostras contaminadas, ou seja, não é o número de amostras que está a influenciar estas subidas e descidas.

Além disso, como referido anteriormente, o aumento e diminuição de temperatura tanto ambiente, como da água na região, seguem também este padrão de aumento e diminuição, o que pode indicar que a variação na contaminação possa ser influenciada por este parâmetro, o que está de acordo com a literatura dado este ser um fator importante para o crescimento microbológico.

Tabela 7 Temperatura ambiente mínima, máxima e média em Setúbal ao longo de um ano.

	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
T média (°C)	11.7	12.4	13.8	15.4	17.8	20.5	22.9	23.3	21.9	18.8	14.7	12.2
T min (°C)	8.4	9	9.9	11.3	13.1	15.5	17.3	17.6	16.9	14.7	11.3	9.1
T max (°C)	15	15.9	17.7	19.6	22.5	25.6	28.6	29	27	23	18.1	15.3

Tabela 8 Temperatura da água mínima, máxima e média em Setúbal ao longo de um ano.

	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
T min (°C)	14.9	14.4	14.5	15.2	15.9	17.3	18.2	18.5	18.7	18.3	16.6	15.8
T média (°C)	15.4	14.7	14.8	15.6	16.6	17.9	18.4	18.8	18.9	18.6	17.4	16.2
T max (°C)	15.8	14.9	15.1	16.1	17.2	18.6	18.8	19.2	19.1	18.8	18.3	16.6

6.2 Amostragem

Apesar de alguns fatores apresentados anteriormente não estarem devidamente resolvidos, não explicam a diferença entre a frequência de contaminação entre os produtos considerados críticos e os outros produtos da mesma tipologia produzidos na mesma instalação com os mesmos equipamentos e co-formulantes e inclusive com a mesma água.

Desta forma, a contaminação nestes produtos ser mais elevada terá de ter outra explicação.

Assim, foi decidido retirar amostras dos formulantes dos processos destes produtos críticos, para entender em que parte dele os microrganismos são introduzidos.

Foram escolhidos os seguintes formulantes para amostra, com a razão para a escolha de cada um, descrita junto ao mesmo:

Água de formulação: Apesar de estar presente em muitos dos produtos e apenas estes demonstrarem contaminação frequente, pode ser a água a introduzi-la e de alguma forma os microrganismos crescerem melhor nestas formulações críticas. As amostras de água estarão divididas entre amostras das duas secções de formulação de líquidos (Herbicidas e Inseticidas) e também entre o primeiro andar e R/C de cada uma destas secções, para além de serem usadas em coisas diferentes (no 1º andar para formulação, e no R/C para passos intermédios de formulação mas também para encher depósitos para utilizar nas lavagens das secções de enchimentos), assim também poderemos localizar alguma diferença que seja causada pelo equipamento (mangueiras, tubagens).

Solução Espessante: A solução espessante utilizada para aumentar a viscosidade das suspensões é feita a partir da Solução Rhodopol 23, um modificador reológico feito à base de

goma de Xantano, um polissacarídeo, sendo assim uma excelente fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos.

Esta solução é preparada e armazenada em IBC's (contentor intermédio) de 1000 LT e usada em quantidades entre os 80-450 Kg por lote nos produtos críticos, sendo que a quantidade utilizada depende do produto que esteja a ser produzido. Não é produzida apenas quando é necessária e pode por vezes ficar dias na secção onde foi produzida até ser utilizada de novo, e só é produzida de novo quando o IBC de 1000 LT anterior for totalmente utilizado. É também um dos únicos co-formulantes comuns a todos os produtos críticos.

Esta solução também terá uma amostra tirada em cada secção, visto serem armazenadas de forma diferente em cada uma delas.

Além de amostras à solução espessante de cada uma das secções será também feita a análise de produtos finais aos quais esta solução espessante especifica tenha sido adicionada.

Matérias-Primas: Como forma de prevenção será também feita a análise das matérias-primas dos produtos críticos, sendo que estes são os únicos co-formulantes testados que são exclusivos de cada produto crítico, ou seja, são apenas usados nestes produtos e em nenhuns outros. É excluída da amostragem à matéria-prima do Produto C e do Produto B, devido à dificuldade de manuseamento da mesma, que requiere equipamento de proteção devido à sua toxicidade. Devido ao facto de serem produtos em pó, não são compatíveis com o kit de teste presente no laboratório no local e desse modo a sua análise terá de ser feito num laboratório do grupo, exterior à fábrica.

Em relação às amostras que podem ser analisadas no laboratório presente na fábrica (Solução Espessante e águas), os resultados podem ser vistos na tabela abaixo.

Tabela 9 Resultados das amostras microbiológicas a co-formulantes de produtos críticos.

DATA	Produto	BACTÉRIAS		FUNGOS	
		24 h	48 h	24 h	48 h
06/OUT	Água IFL R/C	ND	ND	ND	ND
06/OUT	Água HFL R/C	ND	ND	ND	ND
06/OUT	Água IFL 1º Andar	ND	ND	ND	ND
06/OUT	Água HFL 1º Andar	Detetado	Detetado	ND	ND
06/OUT	Sol. Espessante 1	ND	ND	ND	ND
06/OUT	Sol. Espessante 2	ND	ND	ND	ND

Apenas a água retirada da torneira presente no 1º Andar da secção de formulação de herbicidas líquidos apresentou contaminação. As amostras foram todas retiradas no mesmo dia, visto que a fonte de água é a mesma, isto pode indicar que a contaminação seja proveniente de uma tubagem ou mangueira usada para passar a água para esta parte da secção.

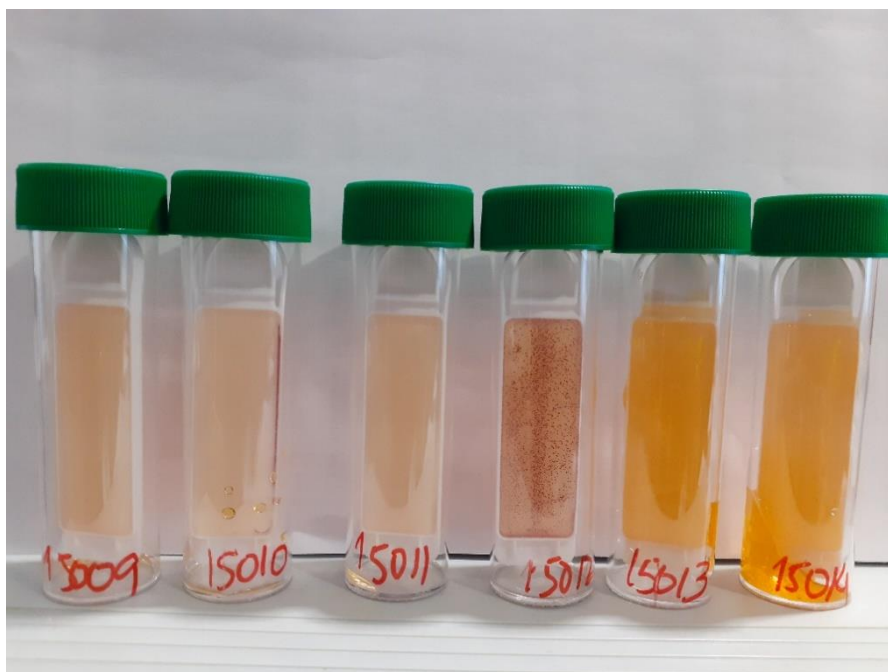


Figura 29 Fotografia dos kits de amostra utilizados.

A água da mangueira que apresentou contaminação foi posteriormente analisada de novo para confirmação e não demonstrou contaminação, permitindo assim perceber que a fonte de contaminação nessa amostra seria proveniente de água parada na mangueira de onde a amostra foi retirada.

De seguida procedeu-se à análise de dois lotes de produto na sua totalidade, analisando o produto final e todos os co-formulantes, de forma a “fechar” a análise do lote e perceber qual a origem da contaminação.

Ambos os lotes tinham o seu produto final contaminado.

Analisando um lote de Produto A, produto crítico, nenhum dos co-formulantes apresentou contaminação antes da formulação, no entanto o produto final estava contaminado. Isto indica que a fonte de contaminação deste lote poderá estar no circuito em que ele foi formulado

(bactérias presentes nos equipamentos ou restos de produto anterior contaminado por exemplo).

Já no lote de Produto X, um dos co-formulantes (um agente molhante/dispersante) apresentou contaminação e assim podemos assumir que a fonte de contaminação foi este co-formulante, que contaminou toda a formulação até ao produto final.

Todos os circuitos foram lavados e desinfetados após a produção destes dois produtos que apresentaram contaminação.

7. Conclusões e Perspetivas de Futuro

7.1 Conclusões

Neste momento, tendo já reunido o conhecimento acerca da contaminação e o contato com a operação da fábrica, foi possível identificar as áreas de risco a serem melhoradas, e posteriormente, foram realizadas análises a matérias-primas e produtos finais.

De acordo com o estudo teórico do desenvolvimento de microrganismos, e dos casos práticos observados, sabe-se que existem vários parâmetros a considerar na prevenção da contaminação. Como tal, para diminuir a incidência de contaminação não existe apenas uma solução. É necessário aplicar um conjunto de medidas de prevenção, que juntas serão eficazes. Algumas destas já se encontram em prática tal como: identificação de produtos críticos, lavagens periódicas e obrigatórias com biocida, e regular amostragem de águas de lavagem e produtos finais.

A possibilidade de co-formulantes ou matérias-primas já virem contaminadas e contaminarem toda a formulação, a não secagem/escorrimento de mangueiras após a utilização e possíveis falhas humanas no cumprimento de protocolos de limpeza, surgem como responsáveis pela contaminação nos dois lotes analisados, e da água de formulação. Sendo uma representação adequada das causas de contaminação abordadas ao longo do trabalho e focadas tanto na matriz causa-efeito do ponto 3.1 ou na matriz de resolução do ponto 3.4

Já considerando os objetivos traçados para o trabalho é possível afirmar que a contaminação representa 0,5% do produto crítico devolvido à fábrica pelos clientes, representando assim uma melhoria substancial face aos 2,4% do mesmo período do ano anterior, no entanto entre 10 e 50% dos produtos que passam pelas linhas de enchimento apresenta contaminação. Destes dados podemos retirar duas conclusões:

- Já estão em prática boas medidas de deteção e reprocessamento de produto contaminado, visto apenas 0,5% de produto crítico contaminado ser enviado para clientes apesar de um mínimo de 10% dos produtos que passam nas linhas de enchimento estarem contaminados

- É possível afirmar que existe ainda uma grande margem de melhoria nos processos de prevenção de contaminação, de forma a reduzir o grau de contaminação observado, sendo possível dependendo das medidas implementadas, reduzir estas contaminações para que sejam apenas eventos ocasionais.

Sendo este um problema multifatorial, a solução para o mesmo passa pela aplicação de diversas medidas que atuem nestes fatores.

Deste modo será apresentada de seguida uma descrição sumária das medidas a implementar.

7.2 Perspetivas de futuro

7.2.1 Inclusão de biocida na produção

Dado que o formaldeído foi restringido na indústria, as técnicas de prevenção de contaminação microbiológica tendem a evoluir para inertizar os circuitos onde a formulação ocorre, e limitar a possibilidade de bactérias serem introduzidas nesses circuitos.

A utilização de biocidas nas lavagens do circuito foi um passo importante nessa direção, no entanto, atualmente já é possível desenvolver biocidas que possam ser introduzidos na formulação dos produtos sem alterar a composição ou o seu efeito. Desta forma, diminui-se em grande medida a possibilidade de virem a estar presentes microrganismos na produção que está a ser feita no momento, e ao mesmo tempo, o circuito de produção é desinfetado pelo biocida presente na formulação. É também possível introduzir um biocida na formulação que se degrade ao fim de alguns dias, deste modo não existe qualquer problema com a alteração da toxicologia do produto.

Já existindo uma parceria no âmbito da prevenção microbiológica entre a Ascenza e a THOR, seria possível ter um biocida deste género adicionado às formulações, existindo estudos e contatos entre as duas empresas neste sentido.

Utilizando o mesmo conceito, o biocida também pode em alternativa ser adicionado ao produto final, desta forma mesmo que existam microrganismos no produto, eles serão eliminados.

A inclusão de biocida na formulação de produtos, em conjunto com as medidas já existentes, reduziria na totalidade a incidência de contaminação biológica.

7.2.2 Mais equipamento de plástico

A reutilização de material de plástico pode ser geradora de contaminação, especialmente se tivermos em conta que em alturas de produção intensiva, frequentemente a limpeza de pequenos equipamentos de plástico utilizados nas formulações pode ser descuidada. Assim sendo, e existindo a necessidade de utilização destes equipamentos, uma possível solução passaria pela disponibilização de mais equipamentos desta natureza, bem como pela criação de um protocolo de limpeza dos mesmos em alturas específicas de cada turno, podendo assim existir rotatividade na utilização deles sem o risco da contaminação.

A disponibilização de mais equipamento de plástico e a sua correta limpeza e rotatividade reduziria a incidência de contaminação em 10% em alturas de produção elevada.

7.2.3 Água de formulação e mangueiras

Tendo conhecimento do risco de introdução de contaminação através da água de formulação e tendo em conta os exemplos práticos do potencial de contaminação de águas paradas em mangueiras, é necessário o desenvolvimento de um protocolo de escorrimento e secagem das mangueiras após a utilização. Isto passará também pela disponibilização de mais mangueiras na operação e a criação de um local onde as mangueiras que não estejam a ser utilizadas possam ser penduradas verticalmente de forma a escorrer a água residual. Assim, será necessária a criação de uma Instrução Operatória de forma que este procedimento não seja esquecido e assim origine contaminação evitável.

Em alternativa, embora menos prático, a água usada para formulação pode ser tratada antes de ser introduzida, sendo preparada a água necessária à formulação e misturando-a com biocida ou hipoclorito de sódio (NaOCl), garantindo assim a sua segurança para utilização na formulação.

Esta preparação de água de formulação pode ainda adicionalmente ser feita em depósitos que estejam equipados com luz UV, permitindo assim dependendo do equipamento uma preparação e tratamento de maior quantidade de água a um custo reduzido.

O tratamento de água de formulação e o correto escoamento de mangueiras reduziria a incidência de contaminação em 50% ou até de forma superior em alturas em que a temperatura ambiente seja mais elevada.

7.2.4 EPI's

De forma a reduzir a possibilidade da introdução de contaminação pelos operários da fábrica e pelos EPI's por eles usados, em particular as luvas, duas medidas devem ser aplicadas:

- Garantir que existem EPI's suficientes para que ao final da semana de trabalho o trabalhador possa colocar os EPI's que usou nessa semana para lavar, e ter disponível EPI's lavados ao início da semana seguinte. Será necessário também tornar esta prática um procedimento obrigatório para os trabalhadores.
- Criar nas zonas de operação um local designado para o armazenamento de luvas dos trabalhadores durante pausas e almoços. Este local pode tratar-se de um simples armário com uma gaveta para as luvas de cada trabalhador e deve ser desinfetado diariamente durante o processo de limpeza de cada secção.

O correto armazenamento e lavagem de EPI's reduziria a incidência de contaminação até 10%.

7.2.5 Solução Espessante

Como já referido anteriormente, a solução espessante utilizada no acabamento dos produtos é uma fonte de nutrientes para microrganismos e um componente com o qual é preciso ter especial cuidado, pois representa sempre um grande perigo como gerador de contaminação. De momento na formulação de solução espessante já é incluído biocida, o que reduz imenso o potencial de contaminação, no entanto existem duas situações, já referenciadas anteriormente, que podem aumentar o risco de contaminação nesta solução.

A produção de solução espessante é feita em depósitos de 1000 L e esta é utilizada conforme a necessidade, o que implica que em algumas situações, podem ser produzidos 1000 L de solução espessante, pois são necessários 200 L para a formulação de um produto, e os restantes 800 L sejam armazenados para uso futuro, que em situações de produção mais reduzida podem ficar armazenados durante vários dias. Esta situação pode criar um degradingamento do biocida da mistura e o aparecimento de microrganismos.

Juntamente com esta situação existe também a questão do armazenamento desta solução, sendo armazenada de maneiras diferentes nas duas secções de formulação, ambas com algumas falhas, também já referidas anteriormente.

De modo a resolver estas duas situações é sugerida a criação de uma pequena secção onde seja preparada solução espessante para as duas secções e onde se faça o armazenamento de forma adequada do espessante ainda não utilizado. Nesta pequena secção poderia também ser feito o planeamento semanal das quantidades de solução espessante necessárias a produção semanal, esta poderia ser produzida antecipadamente, prevenindo assim a sobreprodução e o armazenamento indefinido.

O correto armazenamento e gestão da produção de solução espessante reduziria a incidência de contaminação em 10%.

8. Bibliografia

- [1] About Us | Rovensa - Well Balanced Agriculture
<https://www.rovensa.com/about-us/> (acedido em 06-07-2020)
- [2] Ascenza.pt
<https://www.ascenza.pt/who-we-are/ascenza> (acedido em 06-07-2020)
- [3] Internacionalização - Sapec Crop Protection | Beyond Nature
<http://www.sapeccropprotection.com/pt/estrategia/internacional/> (acedido em 06-07-2020)
- [4] Sapec: fabricante portuguesa de agroquímicos já tem 65% das vendas no exterior
<https://www.dinheirovivo.pt/empresas/sapec-fabricante-portuguesa-de-agroquimicos-ja-tem-65-das-vendas-no-exterior-12630074.html> (acedido em 06-07-2020)
- [5] Croplife.org
https://croplife.org/wp-content/uploads/2018/02/Prev_Control_Micr_Cont_official_e-copy_Jan18_-HR.pdf (acedido em 06-07-2020)
- [6] Bacteria | What is microbiology?
<https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/bacteria.html> (acedido em 06-07-2020)
- [7] Chandra, P. & Ingle, R.W. & Tetali, S. (2016). Compatability of phosphate solubilizing microorganisms with different agrochemicals. 16. 229-232.
- [8] Binary Fission and other Forms of Reproduction in Bacteria | Department of Microbiology
<https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/binary-fission-and-other-forms-reproduction-bacteria/> (acedido em 06-07-2020)
- [9] Whiting, R., and M. Cygnarowicz-Provost. "A quantitative model for bacterial growth and decline." *Food Microbiology* 9 (1992): 269-277.
- [10] Levin BR, Perrot V, Walker N. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics*. 2000 Mar;154(3):985-97. PMID: 10757748; PMCID: PMC1460977.
- [11] Abel-Santos, E (editor) (2012). *Bacterial Spores: Current Research and Applications*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-908230-00-3.
- [12] Heyndrickx, Marc. (2011). The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. *Applied and Environmental Soil Science*. 2011. 10.1155/2011/561975.

- [13] Naranjo-Ortiz, M.A. and Gabaldón, T. (2019), Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biol Rev*, 94: 2101-2137.
- [14] Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell, Teun Boekhout, *The Yeasts (Fifth Edition)*, Elsevier, 2011, Pages 223-277, ISBN 9780444521491, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00165-8>.
- [15] Micscape Microscopy and Microscope Magazine
<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html>?<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjan99/mmould.html> (acedido em 06-07-2020)
- [16] Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000 May;182(10):2675-9. doi: 10.1128/jb.182.10.2675-2679.2000. PMID: 10781532; PMCID: PMC101960.
- [17] Rogers HJ. Bacterial growth and the cell envelope. *Bacteriol Rev*. 1970;34(2):194-214.
- [18] Zwietering, Marcel & Jongenburger, I & Rombouts, F.M. & Van, Talya. (1990). Modeling of Bacterial Growth Curve. *Applied and environmental microbiology*. 56. 1875-81. 10.1128/AEM.56.6.1875-1881.1990.
- [19] Oxygen Requirements for Microbial Growth - Microbiology | OpenStax
<https://openstax.org/books/microbiology/pages/9-2-oxygen-requirements-for-microbial-growth> (acedido em 07-07-2020)
- [20] Nutrition and Growth of Bacteria
<http://textbookofbacteriology.net/nutgro.html>
- [21] Ratkowsky, David & Olley, J & Mcmeekin, Tom & Ball, Andrew. (1982). Ratkowsky DA, Olley J, McMeekin TA, Ball A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol* 149: 1-5. *Journal of bacteriology*. 149. 1-5.
- [22] The Effects of pH on Microbial Growth
<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/the-effects-of-ph-on-microbial-growth/> (acedido a 07/07/2020)
- [23] E. Bååth, K. Arnebrant, Growth rate and response of bacterial communities to pH in limed and ash treated forest soils, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 26, Issue 8, 1994, Pages 995-1001, ISSN 0038-0717
- [24] Hort.cornell.edu
<http://www.hort.cornell.edu/turf/shortcourse/BacktoBasics.pdf> (acedido em 07-07-2020)
- [25] Pesticide Formulations - Kentucky Pesticide Safety Education
<http://www.uky.edu/Ag/Entomology/PSEP/3formulations.html>
- [26] Li Zheng, Chong Cao, Rong-Yu Li, Li-Dong Cao, Zhao-Lu Zhou, Ming Li, Qi-Liang Huang, Preparation, and characterization of water-in-oil emulsions of isoprothiolane, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 537, 2018, Pages 399-410, ISSN 0927-7757,

- [27] Crodacropcare.com – Capsule Suspension
<https://www.crodacropcare.com/en-gb/products-and-applications/capsule-suspension>
 (acedido em 07-07-2020)
- [28] Concentrations of Solutions
[https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_Kentucky/UK%3A_CHE_103_-_Chemistry_for_Allied_Health_\(Soult\)/Chapters/Chapter_8%3A_Properties_of_Solutions/8.1%3A_Concentrations_of_Solutions#:~:text=A%20concentrated%20solution%20is%20one,s mall%20amount%20of%20dissolved%20solute.](https://chem.libretexts.org/Courses/University_of_Kentucky/UK%3A_CHE_103_-_Chemistry_for_Allied_Health_(Soult)/Chapters/Chapter_8%3A_Properties_of_Solutions/8.1%3A_Concentrations_of_Solutions#:~:text=A%20concentrated%20solution%20is%20one,s mall%20amount%20of%20dissolved%20solute.) (acedido em 07-07-2020)
- [29] “Suspension Concentrates: Preparation, Stability and Industrial Applications” De Gruyter Textbook
- [30] Sinha, Tanushree & Bhagwatwar, Prachi & Krishnamoorthy, Chandan & Chidambaram, Ramalingam. (2019). Polymer Based Micro- and Nanoencapsulation of Agrochemicals. 10.1007/978-3-030-19416-1_2.
- [31] Das, Sanjoy & David, Sheba & Rajabalaya, Rajan & Mukhopadhyay, HIRAK & Halder, Tripti & Palanisamy, Mohanraj & Khanam, Jasmina & Nanda, Arunabha. (2011). Microencapsulation techniques and its practices. International Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 6. 1-23.
- [32] Echa.europa.eu
https://echa.europa.eu/documents/10162/13641/formaldehyde_review_report_en.pdf/551df4a2-28c4-2fa9-98ec-c8d53e2bf0fc (acedido em 07-07-2020)
- [33] Safety and health in the use of agrochemicals: A guide, Ilo.org
https://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_protect/---protrav/---safework/documents/instructionalmaterial/wcms_110196.pdf (acedido em 07-07-2020)
- [34] Cetrimide Selective Agar Manual
<https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU1292.pdf> (acedido em 08-07-2020)
- [35] Klockgether Jens, Cramer Nina, Wiehlmann Lutz, Davenport Colin, Tümmler Burkhard, Pseudomonas aeruginosa Genomic Structure and Diversity ,Frontiers in Microbiology, Vol.2 , 2011, DOI:10.3389/fmicb.2011.00150, ISSN:1664-302X
- [36] Croplife.org
https://croplife.org/wp-content/uploads/2018/02/Prev_Control_Micr_Cont_official_e-copy_Jan18_-HR.pdf
 (acedido em 08-07-2020)
- [37] Stavropoulou, E.; Bezirtzoglou, E. Predictive Modeling of Microbial Behavior in Food. *Foods* 2019, 8, 654.
- [38] Minimizing the risk of microbial contamination in primary production of berries, NESTLE, https://profel-europe.eu/_library/_files/Annex_1_Berry-specific_training_booklet_for_farmers_and_suppliers_Minimizing_the_risk_of_microbial_contamination_in_primary_production_of_berries-part_1.pdf (acedido em 09-07-2020)

- [39] Working Document to the Environmental Safety Evaluation of Microbial Biocontrol Agents, EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE- GENERAL,
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_ppp_app-proc_guide_fate_wd-env-sft-eval-mbca.pdf (acedido em 09-07-2020)
- [40] Braga, Isaías & Brandão, Francisco & Ribeiro, Francisco Roger & Diogenes, Aldecira. (2019). Application of GUT Matrix in the assessment of pathological manifestations in heritage constructions. *Revista ALCONPAT*. 9. 320. 10.21041/ra. v9i3.400.
- [41] Instruções Operatórias Internas da Ascenza Agro S.A.
- [42] Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* 2019 Nov 30; 34:100622. doi: 10.1016/j.nmni.2019.100622. PMID: 31956419; PMCID: PMC6961714.
- [43] Microbiology Cult-Dip combi: Instructions for Use,
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/100778?lang=pt®ion=PT>
- [44] THOR – Biocides – Minerals and Slurries
<https://www.thor.com/biocidesmineralsandslurries.html> (acedido em 09-07-2020)
- [45] Acticide DB20 Safety Data Sheet – THOR -Biocides
<https://www.thor.com/biocidesmineralsandslurries.html>

Anexos

O conteúdo deste anexo foi removido por razões confidenciais.