Mestrado Integrado em Engenharia Química

Avaliação do grau de contaminação microbiológica em tintas através de um método de deteção rápida de partículas

Dissertação de Mestrado

de

Cândido Daniel Moreira da Rocha

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Barbot - Indústria de Tintas, S.A.



Orientador na FEUP: **Profª. Olga Pastor Nunes**

Orientador na Barbot: **Eng. Nuno Barbosa**



Departamento de Engenharia Química

março de 2018

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar aos orientadores deste projeto. À professora Olga Nunes, pela disponibilidade e pelo conhecimento e orientação sobretudo na fase final deste trabalho. Ao Engenheiro Nuno Barbosa, pela oportunidade e por acreditar nas minhas capacidades para a realização do mesmo.

À Carla Pinto e ao pessoal do laboratório E-009B, o meu profundo agradecimento por toda a ajuda e disponibilidade na realização deste trabalho. Sem dúvida que sem ela este trabalho não teria sido possível.

À Barbot – Indústria de Tintas S.A., por me disponibilizar os meios necessários ao desenvolvimento deste trabalho. A toda a equipa da empresa, que me fez sentir em casa durante a realização do mesmo.

À Cristiana Faia, por ter sido a melhor companheira de estágio que alguém poderia ter. Começamos como colegas, acabamos como amigos.

À Isabel Melo, obrigado por tudo. Não são precisos mais detalhes.

Agradeço aos meus pais e irmã, porque sem eles não seria quem sou hoje, e pelo apoio incondicional que me deram ao longo de todo o meu percurso académico.

À Marta de Brito, pelas infinitas horas de conversa que tantas vezes me ajudaram a esquecer as preocupações rotineiras vividas ao longo deste projeto. Não tens ideia do quanto foi crucial.

À Ana Rita Ferreira, por estar sempre presente quando mais necessitei, fosse para me ouvir ou para me fazer acreditar em mim mesmo. És a melhor, por isto e por tudo o resto.

Agradeço também à Maria João Fernandes, pela ajuda e pela companhia nos momentos de *stress*, e por contribuir com as suas aptidões em *design* gráfico.

Deixo o meu agradecimento à minha família, amigos e colegas de curso que não mencionei de diretamente nestes agradecimentos, mas que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

A todos os que aqui mencionei, de forma direta ou indireta, o meu mais profundo e sincero obrigado.

Resumo

O objetivo do trabalho foi a avaliação do grau de contaminação microbiana em tintas e matérias-primas utilizadas na sua produção. Dada a coloração presente nas tintas e algumas das matérias-primas utilizadas, bem como a elevada viscosidade característica deste tipo de produtos, impõe-se a necessidade de utilização de técnicas alternativas para a determinação e avaliação do grau de contaminação microbiológica, tendo em conta que métodos tradicionais utilizados em laboratório tais como espalhamento em placa ou membrana filtrante se tornam difíceis de reproduzir e visualizar. Para tal, foi utilizado um método de deteção rápido de partículas, uma tecnologia recente no mercado que utiliza em simultâneo dois métodos de deteção, fluorescência e impedância, e que representa uma alternativa viável relativamente às técnicas tradicionais utilizadas para a contabilização de microrganismos.

Foi realizado primeiramente um ensaio em ambiente laboratorial, utilizando espalhamento em placa com *Plate Count Agar* (PCA) como método de contagem de microrganismos. Também foram utilizados *Dip Slides* como indicadores de contaminação microbiológica, prática corrente da empresa aquando do início do projeto em questão.

A eficiência de biocidas adicionados em tintas para conservação do produto em lata foi testada com o objetivo de otimizar a sua formulação, não só para garantir uma melhor qualidade do produto final, mas também com o objetivo de redução dos custos de produção e cumprimento das normas e diretrizes para a sua aplicação na indústria das tintas.

Verificou-se que os produtos finais (tintas) e as resinas usadas na sua produção apresentaram os níveis de contagem mais elevados, seguido das suspensões de dióxido de titânio e por fim as suspensões de carbonato de cálcio

O biocida que apresentou maior potencial foi o C, contudo nada se pode afirmar concretamente acerca da sua eficiência.

Palavras Chave: contaminação, tintas, fluorescência, impedância, biocidas.

Abstract

The objective of the work was to evaluate the degree of microbial contamination in paints and raw materials used in their production. Given the coloration of the paints and some of the raw materials used, as well as the high viscosity characteristic of this type of products, it is necessary to use alternative techniques for the determination and evaluation of the degree of microbiological contamination, taking into account that traditional methods used in the laboratory such as plate spreading or filtering membrane are difficult to reproduce and visualize. To this end, a rapid particle detection method was used, a recent technology on the market that simultaneously uses two methods of detection, fluorescence and impedance, which represents a viable alternative to the traditional techniques used for the enumeration of microorganisms.

Before using the alternative technique, the degree of contamination of several raw materials and products was assessed using the spread plate method. Dip Slides were also used as indicators of microbiological contamination, current practice of the company at the beginning of this study.

The efficiency of biocides added to paints for in-can protection has been tested with the aim of optimizing their formulation, not only to ensure a better quality of the final product, but also with the aim of reducing production costs and complying with standards and guidelines for their application in the paint industry.

The final products (paints) and resins used in their production were found to have the highest counts, followed by titanium dioxide suspensions and finally the calcium carbonate suspensions.

The biocidal product with the highest potential was C, however, nothing can be said concretely about its efficiency.

Keywords: contamination, paints, fluorescence, impedance, biocides.

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.



Porto, 14 de março de 2018

Índice

1 Introdução 1

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto 1

1.2 Apresentação da Empresa 2

1.3 Contributos do Trabalho 3

1.4 Organização da Tese 3

2 Contexto e Estado da Arte 5

2.1 Contexto 5

2.1.1 As tintas – definição e composição 5

2.1.2 Contaminação microbiana – causas e efeitos 9

2.1.3 A necessidade de preservação – monitorização e controlo 10

2.2 Estado da Arte 11

3 Descrição Técnica 15

3.1 Validação do equipamento CellFacts II® 17

3.2 Espalhamento e contagem em placa 17

3.3 Placas de contacto 17

3.4 Equipamento CellFacts II® 18

3.4.1 Limpeza diária 18

3.4.2 Calibração do equipamento 19

3.4.3 Protocolo de tintas em emulsão 19

3.4.4 Protocolo de suspensões de carbonato de cálcio 19

3.4.5 Protocolo de suspensões de dióxido de titânio 20

3.5 Estudo da influência de amostragem em diferentes pontos de um mesmo tanque 20

3.6 Análise da água de processo e avaliação da eficiência de lâmpadas UV na sua desinfeção 20

3.7 Avaliação da eficácia dos produtos biocidas 21

4 Resultados e Discussão 23

4.1 Validação do equipamento CellFacts II® 24

4.2 Avaliação do grau de contaminação microbiológica 24

4.2.1 Estudo da influência de amostragem em diferentes pontos de um mesmo tanque 29

4.2.2 Análise da água de processo e avaliação da eficiência de lâmpadas UV na sua desinfeção 30

4.3 Avaliação da eficácia dos produtos biocidas 31

5 Conclusões 33

6 Avaliação do trabalho realizado 35

6.1 Objetivos Realizados 35

6.2 Limitações e Trabalho Futuro 35

6.3 Apreciação Final 35

Anexo A Figuras Ilustrativas 41

Anexo B Apresentação de resultados no CellFacts II® 45

Anexo C Gráficos 3D 47

Lista de Figuras

Figura 1 - Principais componentes de uma tinta.....5

Figura 2 - Equipamento CellFacts II®..... 13

Figura 3 - Representação esquemática do princípio de medição do CellFacts II® 14

Figura 4 - Esquema simplificado da planta da unidade industrial, com referência dos três locais de amostragem 16

Figura 5 - Esquema simplificado da instalação das unidades de desinfeção por lâmpadas UV no tanque de armazenamento de água de processo..... 21

Figura 6 - Contagem total de organismos viáveis nas matérias-primas em TQE e TQI 26

Figura 7 - Percentagem de atividade celular em cada amostra nos locais TQE e TQI 27

Figura 8 - Contagem total de organismos viáveis nos produtos finais em TQD 28

Figura 9 - Percentagens de atividade celular em cada amostra no local TQD 28

Figura 10 - Contagem total de organismos viáveis nos diferentes pontos de amostragem no tanque TQD 11..... 29

Figura 11 - Percentagens de atividade celular nos diferentes pontos de amostragem no tanque TQD 11 30

Figura 12 – Placa de contacto Contact Slide 2 da Liofilchem® 41

Figura 13 - Escala de unidades fornecida pelo fabricante para as placas de contacto 41

Figura 14 - Bijou de 7 mL 42

Figura 15 - Equipamento CellFacts II® instalado na Barbot – Indústria de Tintas S.A..... 42

Figura 16 - Espectrofotómetro Helios Unicam γ 43

Figura 17 - Agitador vortex VWR® Analog Mixer 43

Figura 18 - Microcentrífuga Micro Star 12 44

Figura 19 - Exemplo de apresentação de resultados do equipamento CellFacts II®..... 45

Figura 20 - Gráfico 3D obtido para a amostra de controlo 47

Figura 21 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida A na concentração de 5 ppm 48

Figura 22 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida A na concentração de 10 ppm ... 48

Figura 23 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida B na concentração de 100 ppm .. 49

Figura 24 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida B na concentração de 150 ppm .. 49

Figura 25 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida C na concentração de 10 ppm ... 50

Figura 26 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida C na concentração de 30 ppm ... 50

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Efeitos da degradação microbiológica nos componentes da tinta 9

Tabela 2 - Aditivos biocidas pertencentes ao stock da empresa..... 21

Tabela 3 - Concentrações testadas na avaliação de eficácia para cada biocida 22

Tabela 4 - Contagens totais de organismos viáveis obtidas na validação do equipamento CellFacts II® 24

Tabela 5 - Resultados das contagens em placa para o espalhamento direto das amostras, após 72 h de incubação 25

Tabela 6 - Resultados obtidos na análise da água de processo e avaliação da eficiência de lâmpadas UV 31

Tabela 7 - Resultados obtidos na avaliação da eficácia dos produtos biocidas 32

Notação e Glossário

$DO_{610\ nm}$ Densidade ótica medida a 610 nanómetros

Lista de Siglas

3D	Três dimensões
ATP	Adenosina trifosfato
BIT	Benzil-isotiazolinona
CAF	Cloranfenicol
CF II	CellFacts II®
CMIT	Clorometil-isotiazolinona
DB	Diogo Barbot
DBNPA	Dibromo-nitrilopropionamida
DO	Densidade ótica
IN	Entrada
LD	Limite de deteção
MIT	Metil-isotiazolinona
NA	Não-analisado
OUT	Saída
PB	Pigmento azul
PCA	Plate Count Agar
PR	Pigmento vermelho
PY	Pigmento amarelo
T	Tinta
TQD	Zona de enchimento dos produtos finais
TQE	Zona de armazenamento exterior de matérias-primas
TQI	Tubagens onde circulam as matérias-primas no interior da fábrica
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
TVC	*Total Viable Count*
UFC	Unidades formadoras de colónias
UK	Reino Unido
UV	Ultravioleta
VBNC	*Viable But Non-Culturable*

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O objetivo do trabalho é a avaliação do grau de contaminação microbiana em tintas e matérias-primas utilizadas na sua produção. As contaminações microbianas representam uma forte preocupação para as indústrias produtoras de tintas, principalmente na produção de tintas de base aquosa. As perdas económicas geradas por situações em que ocorre contaminação microbiana das tintas é considerável, mas o maior impacto que estas situações têm é na imagem da empresa. É desagradável para um cliente que compre uma lata de tinta, a abra e venha a descobrir que o produto está deteriorado, com mau odor e inutilizável. Para evitar este tipo de ocorrências, revela-se importante para a empresa a monitorização do grau de contaminação microbiana quer nas matérias-primas utilizadas, quer no produto final (tintas). Simultaneamente, a empresa deve tomar algumas medidas preventivas, tais como a higienização regular dos espaços de trabalho e a adição de biocidas no sentido de prevenir possíveis contaminações e assim garantir a qualidade do produto à saída da fábrica. Dada a coloração presente nas tintas e algumas das matérias-primas utilizadas, bem como a elevada viscosidade característica deste tipo de produtos, impõe-se a necessidade de utilização de técnicas alternativas para a determinação e avaliação do grau de contaminação microbiológica, tendo em conta que métodos tradicionais utilizados em laboratório tais como espalhamento em placa ou membrana filtrante se tornam difíceis de reproduzir e visualizar. Para tal, foi utilizado um método de deteção rápido de partículas, uma tecnologia recente no mercado que utiliza em simultâneo dois métodos de deteção, fluorescência e impedância, e que representa uma alternativa extremamente viável relativamente às técnicas tradicionais utilizadas para a enumeração de microrganismos.

Foi realizado primeiramente um ensaio em ambiente laboratorial, em parceria com a instituição de ensino, utilizando espalhamento em placa com *Plate Count Agar* (PCA) como método de contagem de microrganismos e como primeira avaliação do grau de contaminação microbiana na empresa. Também foram utilizadas placas de contacto como indicadores de contaminação microbiológica, prática corrente da empresa aquando do inicio do projeto em questão.

Os biocidas adicionados em tintas para a preservação e conservação do produto em lata foram testados com o objetivo de avaliar a sua eficácia e, no caso desta, otimizar a sua formulação, não só para garantir uma melhor qualidade do produto final, mas também com o objetivo de redução dos custos de produção e cumprimento das normas e diretrizes para a sua aplicação na industria das tintas.

1.2 Apresentação da Empresa

A Barbot, fabricante de tintas e vernizes, nasce no Porto em 1920, no rescaldo da I Guerra Mundial, com uma fábrica localizada em Santo Ildefonso (Porto), pelas mãos de Diogo Barbot. Surgia assim uma empresa de cariz familiar, com uma imagem tradicional, para a qual o rigor, a segurança e a qualidade eram características fundamentais. Todo o material gráfico e embalagens da época eram marcados com as iniciais do seu fundador – DB.

Nos anos seguintes, a Barbot iria afirmar-se no mercado. Em 1958, sob a responsabilidade de Carlos Aires Pereira, é construída uma nova fábrica em Laborim e quatro anos depois, em 1962, já sob a administração de Zaida Barbot, filha do fundador, nasce a mais conhecida tinta da marca e atual líder de vendas, a Barbot Dioplaste.

O violento incêndio de 1981, que destruiu toda a fábrica de Santo Ildefonso, iria marcar indiscutivelmente a história da marca. É neste momento que se inicia um novo ciclo, não só ao nível da administração, que passa a ser liderada por Carlos Barbot, filho de Zaida Barbot, como também a nível estrutural. A Barbot dá inicio à sua expansão, com a transferência em 1982 das instalações do Porto para Vila Nova de Gaia, e desenvolve uma política de aquisições e parcerias que contribuíram para fortalecer a marca e alargar a sua oferta.

Em resultado dessa estratégia, em meados dos anos 80, a empresa apresentava uma equipa comercial reforçada, capaz de cobrir o país de Norte a Sul (a primeira delegação Barbot surgiu em Évora em 1987), uma frota logística própria e uma maior capacidade produtiva.

Ao longo da década de 1990, a Barbot continuou a expandir-se, lançando continuamente novos produtos. Este alargamento culminou com a quadruplicação dos armazéns e abertura de uma nova fábrica em Canelas em 2002 possibilitando à Barbot um campo de abrangência de nível nacional composto por infraestruturas modernas, equipadas com a mais avançada tecnologia, e uma elevada capacidade de resposta e competitividade.

Atualmente, a Barbot está presente de Norte a Sul do país, com duas fábricas localizadas no concelho de Vila Nova de Gaia, uma rede alargada de revendedores e 21 pontos de venda próprios. Mas nem só do mercado nacional vive a marca. Hoje o Grupo Barbot comercializa os seus produtos não só em Portugal, como também Espanha, França, Suíça, Bélgica, Holanda, Angola, Cabo Verde, Moçambique e Mali. O sucesso da marca traduz-se num volume de vendas anual que ronda os 50 milhões de euros, fruto do trabalho conjunto de um grupo com cerca de 200 colaboradores de diversas áreas de atuação (administração, investigação e desenvolvimento, *marketing*, operários, analistas, comerciais, entre outros) e de uma vasta gama que conta com cerca de 150 produtos a serem atualmente comercializados para diversos fins, sejam decorativos, soluções industriais e até pavimentos [1].

1.3 Contributos do Trabalho

O trabalho desenvolvido permitiu a introdução e validação de uma nova metodologia interna de avaliação do grau de contaminação microbiana no produto final (tintas) e matérias-primas. Através desta metodologia, foi também possível avaliar a eficiência dos aditivos biocidas utilizados pela empresa. A validação do método permitiu que a metodologia possa vir a ser usada em análises futuras.

1.4 Organização da Tese

A tese encontra-se dividida em 6 capítulos. O presente capítulo (Introdução – capítulo 1), apresenta-se o enquadramento do projeto e alguns dados relativos à empresa onde este foi desenvolvido. No capítulo 2, dividido em dois subcapítulos, é inicialmente apresentado o Contexto do trabalho, onde se encontram informações relativas às tintas, em termos de composição e dos seus principais constituintes, as causas e efeitos da contaminação microbiana nas mesmas e a necessidade da sua preservação. No segundo subcapítulo encontra-se o Estado da arte, com informação relativa às metodologias utilizadas na avaliação da presença/ausência de contaminações microbianas.

No capítulo 3 é apresentada a Descrição técnica dos métodos utilizados na realização deste trabalho. Os Resultados e sua discussão, encontram-se no capítulo 4, onde se apresenta a validação do método de avaliação em estudo, o grau de contaminação das amostras estudadas, bem como os testes de *performance* dos biocidas utilizados na empresa onde o trabalho foi desenvolvido. As Conclusões destes mesmos resultados são por fim apresentadas no capítulo 5 e no capítulo 6 encontra-se a Avaliação do trabalho realizado.

São ainda apresentadas as referências bibliográficas indispensáveis à realização deste trabalho. Em anexo, constam informações suplementares que servem de apoio ao trabalho realizado, tais como figuras ilustrativas, exemplo de apresentação de resultados e gráficos 3D.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Contexto

2.1.1 As tintas – definição e composição

A tinta é definida como uma composição pigmentada líquida, pastosa ou sólida que, quando aplicada em camada fina sobre uma superfície apropriada, no estado em que é fornecida ou após diluição, dispersão em produtos voláteis ou fusão, é convertível ao fim de certo tempo, numa película sólida, contínua, corada e opaca. Estas películas são normalmente dotadas de propriedades protetoras, decorativas ou até mesmo de propriedades específicas dependendo do tipo de superfície onde é aplicada ou da função pretendida aquando da sua aplicação. Terão também que apresentar boas características de resistência ao meio a que vão ser expostas e em muitos casos terão de possuir outras características especiais tais como propriedades anti-vegetativas, ignífugas, refletoras, isolamento acústico, etc. [2]

A formulação de uma tinta recorre a uma enorme diversidade de matérias-primas. Tendo em conta os objetivos específicos do produto a ser desenvolvido, um conjunto de matérias-primas será escolhido por um formulador com alguma experiência que os vai combinar em determinadas proporções. Para além das funções específicas a que o produto formulado se destinará e das restrições legais ao uso de determinadas matérias-primas, o formulador do produto terá de considerar outros aspetos igualmente importantes, tais como, por exemplo, os custos de produção e qual a qualidade pretendida para o produto final. A consideração de todos estes aspetos irá condicionar a escolha e a quantidade dos constituintes a serem usados [2].

A figura 1 resume os principais componentes de uma tinta [2]:

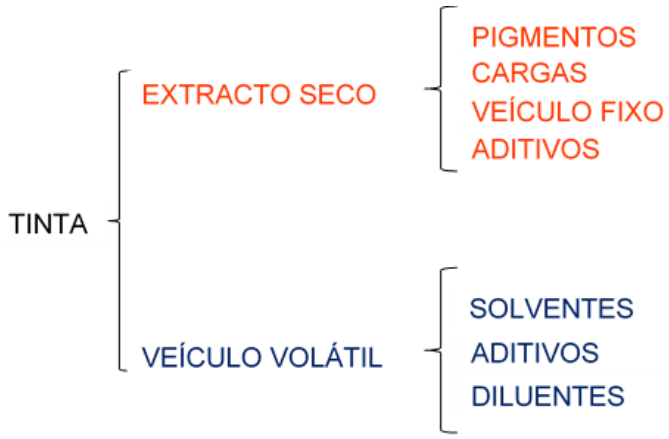


Figura 1 - Principais componentes de uma tinta [2]

Os componentes da tinta não atuam de forma independente, interagem quer fisicamente, quer quimicamente. De seguida é apresentada uma breve explicação da função de cada um destes

componentes, para que se possa compreender melhor a sua interação de modo a se obterem as características desejadas aquando da formulação de um novo produto [2].

2.1.1.1 Pigmentos

Os pigmentos são substâncias sólidas, em geral finamente divididas, praticamente insolúveis no veículo, usadas na preparação de tintas com o fim de lhes conferir cor e/ou opacidade, uma vez que as tintas são, na quase totalidade dos casos, utilizadas para obliterar as superfícies sobre as quais são aplicadas [2].

Em termos químicos, os pigmentos podem ser classificados como orgânicos, cuja molécula é orgânica, ou inorgânicos, cuja molécula é constituída por um óxido metálico ou por um sal metálico de um ácido inorgânico [2]. De modo geral, os pigmentos inorgânicos têm maior opacidade e consequentemente maior poder de cobertura face aos pigmentos orgânicos, isto porque os segundos têm por norma mais brilho e transparência [3]. A título de exemplo, como pigmentos inorgânicos tem-se o amarelo óxido (PY 42) e o vermelho óxido (PR 101), ambos provenientes de óxido de ferro. Para além dos pigmentos provenientes do óxido de ferro temos o pigmento branco mais utlizado e importante no fabrico de tintas que é dióxido de titânio. O magenta de quinacridona (PR 122) e o azul de ftalocianina (PB 15:3) são exemplos de pigmentos orgânicos [2].

2.1.1.2 Cargas

As cargas são substâncias que sob a forma de partículas mais ou menos finas (de 0,5 a 6 μm de diâmetro), de fraca opacidade, insolúveis nos veículos, são empregues como constituintes de tintas com o fim de lhes conferir determinadas propriedades, entre as quais: permeabilidade da película, resistência química, brilho, sedimentação, resistência à abrasão, comportamento anticorrosivo e viscosidade. Os tipos de cargas que se empregam mais correntemente são o carbonato de cálcio (branco de Paris) e a dolomite (carbonato de cálcio e magnésio) [2].

2.1.1.3 Veículo fixo

Denomina-se por "veículo fixo" o conjunto de componentes das tintas, vernizes ou produtos similares que permitem a formação da película sólida [2]. No que diz respeito ao veículo ("*vehicle*"), de acordo com "*Coatings Encyclopedic Dictionary*" [4], este corresponde à porção líquida da tinta, na qual o pigmento é disperso, sendo composta pelo ligante ("*binder*") e por um diluente ("*thinner*").

O ligante ("*binder*") é definido como a porção não volátil do veículo líquido de um revestimento. Ele vai ligar ou cimentar as partículas de pigmento entre si, bem como o próprio filme de tinta ao material sobre o qual é aplicado. É o componente que é responsável pelas forças adesivas que mantêm os restantes componentes juntos.

O diluente ("*thinner*") é definido como sendo uma porção da tinta, verniz ou produto similar, que volatiliza durante o processo de secagem. É qualquer líquido volátil usado para reduzir a viscosidade de componentes ou composições de um revestimento. Pode ser constituído por um único solvente ou diluente ou por uma mistura de solventes e/ou diluentes [5].

2.1.1.3.1 Resinas

As resinas são substâncias orgânicas sólidas, semi-sólidas ou líquidas, amorfas, termoplásticas ou termoendurecíveis, más condutoras da eletricidade, em geral insolúveis na água, mas solúveis em certos dissolventes orgânicos [2].

A parte mais importante do veículo fixo de uma tinta é sem dúvida constituída pelas resinas que o compõem e as suas características são, também, fundamentalmente determinadas por essas mesmas resinas. Como exemplos de resinas tem-se as resinas acrílicas, resinas epóxi, resinas estireno-acrílicas e resinas alquídicas [2].

2.1.1.3.2 Solventes

Os solventes são líquidos voláteis nas condições normais de secagem, capazes de dissolver o veículo fixo de tintas e vernizes. Os solventes raramente são usados isoladamente, dado que uma tinta apresenta requisitos em termos de solubilidade e de taxa de evaporação que dificilmente são satisfeitos por um único solvente. Dessa forma, é necessário utilizar uma mistura de solventes [2]. São exemplos de solventes os hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, os álcoois, os ésteres e as cetonas.

As tintas à base de água, apesar de terem a água como solvente principal, podem conter solventes auxiliares em percentagens de 2 a 15 %, dependendo do ligante utilizado. Estes solventes são miscíveis em água ou tornam-se miscíveis em água na presença de um ligante [6].

2.1.1.3.3 Diluentes

Os diluentes são líquidos voláteis, parcial ou totalmente miscíveis com o veículo, que adicionados a uma tinta ou verniz, durante o processo de fabrico ou no momento da aplicação, lhe reduzem a viscosidade. O diluente é adicionado tendo em vista a obtenção do nível ótimo de fluidez na aplicação da tinta, correspondendo geralmente a uma mistura de solventes. Este pode ser usado, ou não, na fase de utilização final da tinta, caso o pintor que a vai aplicar considere que é necessário ajustar a viscosidade do produto para uma melhor aplicação. Podem ser dados como exemplos de diluentes os mesmos que foram dados como solventes, sendo que a grande distinção entre ambos é a compatibilidade com o ligante. Um solvente verdadeiro de uma resina é aquele que é completamente compatível tanto em altas como em baixas concentrações, e que é capaz de a dissolver. No caso dos diluentes, estes são usados para reduzir a concentração de uma matéria ativa, não tendo, contudo, poder solvente sobre a tinta [2].

2.1.1.4 Aditivos

Os aditivos são substâncias incorporadas em pequena percentagem nas tintas, vernizes e produtos similares com o fim de lhes alterar acentuadamente determinadas características.

Os aditivos são usualmente agrupados pela função que cumprem e não pela composição química ou forma física de apresentação. Esta prática advém do facto de que num aditivo a sua função é a única característica que é realmente importante. Alguns dos mais utilizados são [2]:

- Bactericidas;
- Fungicidas e algicidas;
- Secantes;
- Espessantes;
- Estabilizadores;
- Molhantes e dispersantes;
- Agentes tixotrópicos, anti-sedimento e coalescentes;
- Agentes antiespuma.

2.1.1.4.1 Biocidas

Os biocidas representam um grupo de aditivos de extrema importância na formulação de tintas, sobretudo em tintas decorativas de base aquosa, uma vez que previnem a proliferação de microrganismos evitando assim a decomposição e a biodegradação da matriz de uma tinta, garantindo a qualidade do produto e aumentando o seu tempo de vida em prateleira.

Os biocidas constituem um grupo heterogéneo de agentes químicos com diversos mecanismos de ação antimicrobiana; microbiostáticos (inibindo o crescimento microbiano) e microbicidas (causando danos irreversíveis ou irreparáveis à célula microbiana) [7,8].

Os biocidas devem fornecer tanto uma proteção *in-can* (em lata), como proteção da própria camada de tinta uma vez aplicada na superfície [9].

As mudanças nos princípios ativos dos biocidas têm visto a substituição de compostos altamente tóxicos (pentaclorofenol e mercúrio utilizados durante os anos de 1960 e 1970 e compostos orgânicos, como formaldeídos e fenóis, na década de 1980) para compostos como as isotiazolinonas, menos tóxicas e agressivas no meio ambiente [10]. No entanto, estes biocidas ainda não oferecem a mesma eficácia que os compostos mercuriais ofereciam na preservação adequada de tintas e pinturas. Em termos legislativos, a entidade que aprova ou não a utilização de uma substância ativa como biocida, bem como a concentração a que esta pode ser usada sem que represente um perigo para a saúde pública, tem vindo a ser cada vez mais rígida e limitativa quanto ao uso destes princípios ativos, deixando a indústria das tintas com cada vez

menos opções no que diz respeito ao uso de biocidas para a preservação dos seus produtos [11,12].

2.1.2 Contaminação microbiana – causas e efeitos

Os microrganismos estão presentes em diversos ambientes do planeta graças à sua capacidade de sobreviverem até nas mais extremas condições. Consequentemente, as tintas não são exceção. As tintas decorativas, as superfícies revestidas e alguns substratos revestidos são vulneráveis a deterioração ou desfiguração por microrganismos tais como bactérias, fungos e algas. A deterioração pode também ser resultado de um ataque por subprodutos ácidos gerados pela atividade microbiana [13].

As tintas compreendem materiais inorgânicos e orgânicos na sua composição e, consequentemente, são suscetíveis a contaminação microbiana durante os diversos passos de fabricação e de produção da tinta e/ou durante o seu armazenamento como produto embalado. As tintas à base de água parecem ser mais suscetíveis à biodeterioração do que as tintas à base de solvente. Tal seria de esperar uma vez que sem água não há vida e para os microrganismos, ainda que tolerantes a condições extremas, esta regra também se aplica [2,14,15]. Os efeitos da biodeterioração da tinta são facilmente detetáveis (mau cheiro, perda de viscosidade, …) e resultam da degradação de diversos componentes presentes na formulação das tintas. Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos dos efeitos da degradação microbiológica nos componentes de uma tinta.

Tabela 1 - Efeitos da degradação microbiológica nos componentes da tinta (adaptado de [14])

Componentes	*Consequência(s) da ação microbiana*
Espessantes celulósicos	perda de viscosidade, produção de gás, alteração de pH
Dispersantes	alteração de cor, precipitação de pigmentos, gelificação
Agentes coalescentes	redução de brilho, baixa estabilidade ao congelamento-descongelamento, farinação, filme poroso, má adesão
Antiespuma	espuma, filme poroso
Pigmentos	desvanecimento da cor, irregularidade de coloração, aglomeração de pigmentos

A contaminação microbiana de uma tinta pode ocorrer durante o seu fabrico, com a maioria dos contaminantes presentes na fonte de água, nas matérias-primas e também nos próprios equipamentos e linhas de canalização (tanques e tubagens) [16]. Certos microrganismos produzem biofilmes que podem aderir às superfícies dos sistemas de canalização que contêm água, nos tanques de processamento e noutros ambientes da fábrica. Estes biofilmes, devido à

forte adesão às superfícies e à sua espessura, são geralmente muito resistentes ao tratamento com biocidas [17].

A biodeterioração de tintas por agentes fúngicos e bacterianos presentes no produto embalado e mesmo após a pintura já foi várias vezes descrita na literatura [18,19].

Tendo em conta a degradação que pode ser provocada pela presença de microrganismos nas tintas, revela-se a necessidade de tomar medidas para prevenir a degradação do produto final e preservar a qualidade do mesmo.

2.1.3 A necessidade de preservação – monitorização e controlo

O uso, no passado, de produtos mercuriais como agentes biocidas proporcionou excelentes propriedades de preservação em matérias-primas e tintas. Os produtos mercuriais foram provavelmente os mais eficazes, duradouros e com espectro de atuação mais largo de todos os bactericidas conhecidos até hoje. Contudo a toxicidade do mercúrio e a sua não biodegradabilidade levaram a que tenha sido completamente banido o seu uso [2].

Uma vez que os biocidas mercuriais permaneciam ativos mesmos nas películas de tintas secas, o seu uso permitia manter os locais de fabrico estéreis, isto devido à concentração residual de mercúrio proveniente da própria produção. Este facto foi muitas vezes a causa para que houvesse um descuido nas boas práticas de limpeza desses locais sem que isso se traduzisse em contaminação dos produtos aí fabricados [2].

Os biocidas que se utilizam hoje em dia apresentam uma toxicidade inferior à dos biocidas mercuriais, porém, não são tão ativos nem apresentam um espectro de atuação tão alargado. Estes também não permanecem ativos nas películas secas e por isso estas constituem uma fonte de alimentação para os microrganismos [2].

Se se permitir que populações de microrganismos cresçam em contacto com as tintas antes de se juntar o bactericida, ou se se adicionar uma quantidade insuficiente para matar toda a colónia, poderá estar-se a criar populações suficientemente resistentes para que seja mais difícil proceder à desinfeção necessária. Nestas condições poderá ser obrigatório o uso de quantidades cada vez maiores de biocida para este ser eficaz, ou ter mesmo de mudar de princípio ativo para conseguir obter a desinfeção completa [2].

As fontes potenciais de contaminação numa fábrica são tantas, que é impossível nomeá-las a todas, do mesmo modo que é impossível remover todos os microrganismos ou eliminar todas as fontes de contaminação numa área fabril. Porém existem sempre algumas boas práticas que podem ajudar a manter as instalações em bom estado, tais como manter os equipamentos de produção tão limpos quanto possível, usar sempre que possível material feito em aço inox pois é mais fácil de ser limpo, garantir que as matérias-primas e produtos intermédios se encontram tapados para evitar contaminação atmosférica, impedir o consumo de bebidas e alimentos na

área fabril, entre outras [2]. Em resumo, pode dizer-se que o foco das boas práticas apresentadas se centra na higiene e na limpeza dos espaços fabris.

Novos princípios ativos são raramente encontrados atualmente, apenas se fazem ligeiras modificações e combinações sinérgicas com as substâncias já conhecidas. A avaliar pela situação apresentada, a monitorização e controlo do grau de contaminação microbiano na produção de tintas, quer nas matérias-primas utilizadas, quer no produto final, revela-se de extrema importância para uma ação adequada no sentido de prevenir a propagação da contaminação, bem como garantir a qualidade do produto final.

2.2 Estado da Arte

Existem alguns estudos científicos publicados sobre os microrganismos presentes em tintas e a sua preservação e/ou desinfeção, pelo que se sabe um pouco sobre a diversidade microbiana presente neste ambiente. Algumas espécies de *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Escherichia* e *Bacillus* foram identificadas e descritas como sendo capazes de degradar e modificar as características das tintas [16]. No entanto, a composição das comunidades microbianas não é estática e a diversidade microbiana é influenciada por fatores ambientais tais como a temperatura e a humidade (o que pode ser encontrado no Verão, não será provavelmente o que se encontrará no Inverno e vice-versa). Assim sendo, a constante monitorização da microbiota presente na produção de tintas durante as várias épocas de produção é uma ferramenta indispensável aos produtores de modo a garantir a qualidade dos seus produtos.

Tradicionalmente, métodos de contagem em placa são os mais utilizados quer para enumeração, quer para saber se existe uma contaminação ou não. Indiscutivelmente, métodos de cultura convencionais como o método de contagem em placas só é capaz de detetar bactérias que formam colónias visíveis em meios de cultura (seletivos ou não) e não conseguem detetar espécies bacterianas que, por uma variedade de razões, são não cultiváveis. Além disso, a resposta deste método é dependente do tempo que os microrganismos demoram a ter um crescimento visível num determinado nutriente para permitir a sua contagem em placas, relatando retrospetivamente a situação microbiana do ponto de amostragem em algum momento do passado, em vez da situação atual.

O termo "viabilidade" e "culturabilidade" são muitas vezes usados por engano como sendo sinónimos [21]. Estudos científicos verificaram que após a adição de biocidas, os microrganismos são capazes de superar este *stress* fisiológico pela persistência no chamado "estado latente" (“*dormant state”)*. Este estado de "não-crescimento" é adotado pelas bactérias como uma resposta ao *stress* devido a uma variedade de condições ambientais adversas [22]. O estado latente é caracterizado por ter uma atividade metabólica muito baixa ou até mesmo nenhuma atividade das células, acompanhado de uma falta de proliferação. Esta condição de

sobrevivência é distinta da resposta de fome e às vezes é referido como o estado "Viável, mas não cultivável" ("*Viable-But-Non-Culturable*" (VBNC)) [23]. No entanto, sob certas condições a "ressuscitação" e a reversão da cultura são possíveis [24].

Enquanto que os métodos clássicos de monitorização microbiológica, tais como a contagem em placas, fornecem resultados retrospetivos, a determinação precoce de uma contaminação microbiana através de métodos mais rápidos e sem a necessidade de incubação oferece a possibilidade de um tratamento reativo com biocida. Assim, a frequência de dosagem de biocida é reduzida, impedindo o desenvolvimento de células persistentes e desafiando as células durante a fase de crescimento exponencial mais sensível ao biocida [25].

O método do ATP é fácil e rapidamente aplicável. Este mede a quantidade de luz que é emitida quando a enzima luciferase entra em contacto com ATP molecular e que é diretamente proporcional à quantidade de ATP [26]. Contudo, não é possível determinar a contagem total de organismos viáveis (TVC – *Total Viable Count*), mas apenas uma tendência. As tintas, no entanto, são um meio difícil para a medição de ATP em células bacterianas. A turbidez e a coloração mascaram a emissão de luz de um ensaio de ATP, levando a erros de medição significativos. Para poder evitar esses efeitos, a amostra teria que ser tão fortemente diluída que o número de células seria inferior ao alcance mensurável desta técnica. Além disso, a presença de iões, o pH, a temperatura, os produtos químicos e as próprias enzimas podem influenciar a medição [27].

Outro método que poderia ser utilizado para a determinação do grau de contaminação microbiológico é a medida do potencial RedOx. Este método baseia-se nas típicas reações de oxidação-redução que ocorrem em sistemas biológicos, realizadas por microrganismos. A obtenção de energia, necessária ao crescimento microbiano, baseia-se na oxidação biológica do nutriente usado como fonte de energia do crescimento microbiano, com consequente redução dos produtos do metabolismo, acumulados no meio ambiente. No caso de organismos aeróbios, o oxigénio é reduzido a água. Esta redução causa uma variação elétrica no meio que pode então ser medida [28]. No entanto, tal como com o método ATP, não é possível determinar as contagens, mas apenas as tendências. Contudo, deve ser lembrado aqui que mesmo um resultado obtido através de uma tendência deve ser usado com o maior cuidado. Um potencial RedOx fortemente negativo é considerado um indicador de forte crescimento de microrganismos. Porém, um potencial RedOx fortemente negativo é, no entanto, apenas causado por algumas bactérias redutoras de sulfato e alguns outros anaeróbios. Além disso, deve-se lembrar que a indústria das tintas usa biocidas na formulação dos seus produtos, biocidas esses que por si só possuem um potencial RedOx fortemente negativo [27].

O sistema CellFacts II® (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*) fornece uma solução robusta e rápida de análise microbiológica para aplicação em indústrias de fabrico e de processo. Em vez

de incubar placas de agar ou placas de contacto durante um período de dias, o analisador CellFacts II® conta, mede e analisa cada micróbio na amostra à medida que passa pelo instrumento. Este processo leva uma questão de minutos, de modo que os resultados podem ser obtidos em tempo real em comparação com os três ou mais dias habituais para os métodos clássicos de cultivo [29].

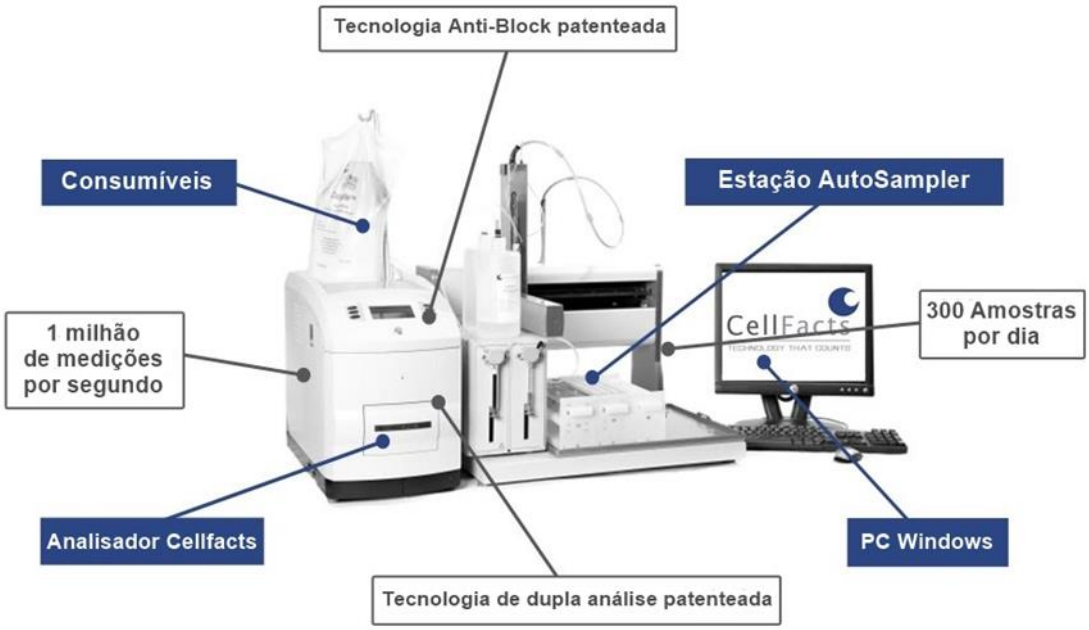


Figura 2 - Equipamento CellFacts II® (adaptado de [29])

Uma variedade de aplicações está disponível para o instrumento CellFacts II® e cada um deles foi especialmente projetado para trabalhar com amostras desafiantes e com grande carga de partículas, tais como suspensões de carbonato de cálcio, tintas, pigmentos e corantes, óleos solúveis, leite em pó e produtos de sumos de frutas [29]. Cada aplicativo CellFacts® é personalizado para amostras específicas, garantindo que cada dispositivo CellFacts® seja adaptado aos requisitos da indústria em questão e aos objetivos que esta deseja alcançar.

O CellFacts II® usa tecnologia patenteada que integra impedância de fluxo elétrico e fluorescência para determinar o número, tamanho (diferenciando, por exemplo, bactérias de leveduras) e características de fluorescência (como por exemplo viabilidade ou estado fisiológico) de partículas individuais ou células num líquido condutor. O equipamento foi otimizado e a metodologia de preparação de amostras foi desenvolvida para detetar e enumerar células totais e viáveis (e portanto, também as não-viáveis por diferença) em amostras fluidas com variado conteúdo particular [30].

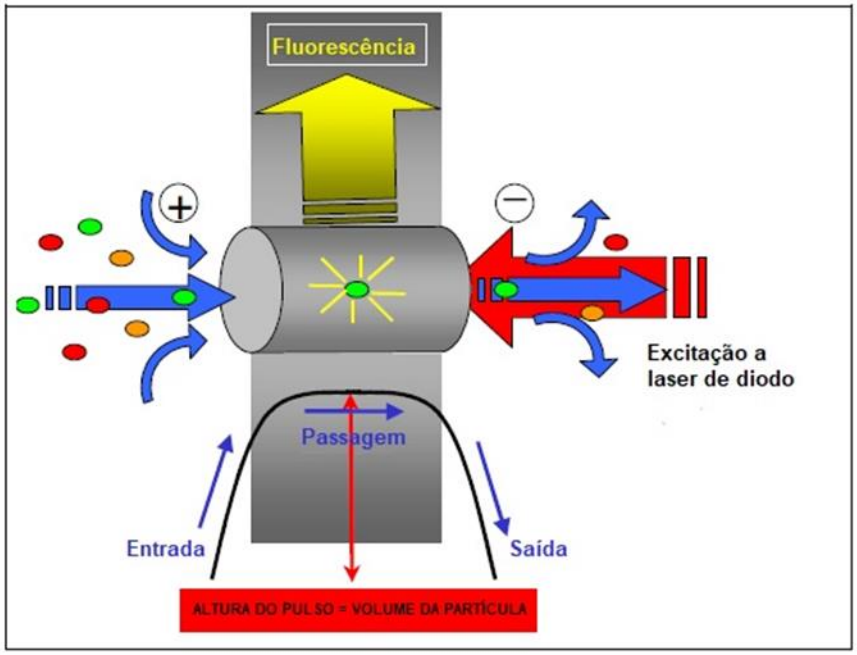


Figura 3 - Representação esquemática do princípio de medição do CellFacts II® (adaptado de [30])

A alteração da impedância é medida quando uma partícula, como por exemplo, uma célula, passa através de um orifício e em que o deslocamento do volume gerado pelo eletrólito é equivalente ao volume da partícula [31]. No caso particular das células, além de permitir a sua enumeração, é possível ainda distinguir procariotas (0,1 – 5,0 µm de diâmetro) de eucariotas (10 – 100 µm de diâmetro) por em geral, diferirem em termos de dimensões [32].

Adicionalmente, esta metodologia usa um sistema de corantes fluorescentes duplo. Um dos corantes (*Cell Stain™ 2*) difunde-se através da membrana celular e emite fluorescência após a ligação a ácidos nucleicos. O segundo corante (*Cell Stain™ 1*) é lipofílico e sensível ao potencial de membrana; acumula-se nas membranas hiperpolarizadas e intercala-se com a membrana somente se uma carga elétrica estiver presente, ou seja, se a célula estiver ativa [31]. Os dados de fluorescência são adquiridos excitando as amostras através de um laser vermelho de díodo (comprimento de onda de 638 nm), sendo o sinal posteriormente detetado.

3 Descrição Técnica

Neste trabalho foram utilizadas várias técnicas para a avaliação do grau de contaminação microbiológico nas diversas amostras de tintas e matérias-primas utilizadas na sua fabricação. Recorreu-se à técnica de espalhamento e contagem em placa, ao uso de placas de contacto e à avaliação através do equipamento CellFacts II®.

Relativamente ao espalhamento e contagem em placa, esta foi utilizada por ser uma técnica tradicionalmente usada em microbiologia para a enumeração de microrganismos cultiváveis [33,34]. O uso de placas de contacto, apesar de não muito distinto da técnica anteriormente descrita, foi tido em conta como método comparativo e de suporte à avaliação efetuada com o CellFacts II®, e também por se tratar do único método de avaliação interno existente na Barbot até à data de início do projeto.

A avaliação efetuada através do equipamento CellFacts II® teve como principal objetivo testar a viabilidade do equipamento como um novo método de avaliação interno, bem como reduzir substancialmente o tempo de espera entre a análise e a obtenção de resultados.

As recolhas das amostras analisadas pelas três metodologias supracitadas foram efetuadas em três locais de amostragem: 1) zona de armazenamento exterior de matérias-primas (TQE), 2) tubagens onde circulam as matérias-primas no interior da fábrica (TQI) e 3) zona de enchimento dos produtos finais (TQD). Na figura 4 é apresentado um esquema simplificado da planta da unidade industrial, onde se encontram assinalados os três locais de amostragem. As amostras foram sempre recolhidas em frascos de armazenamento estéreis de 60 mL (Deltalab©), sob condições de assepsia e processadas dentro de 2 a 3 horas.

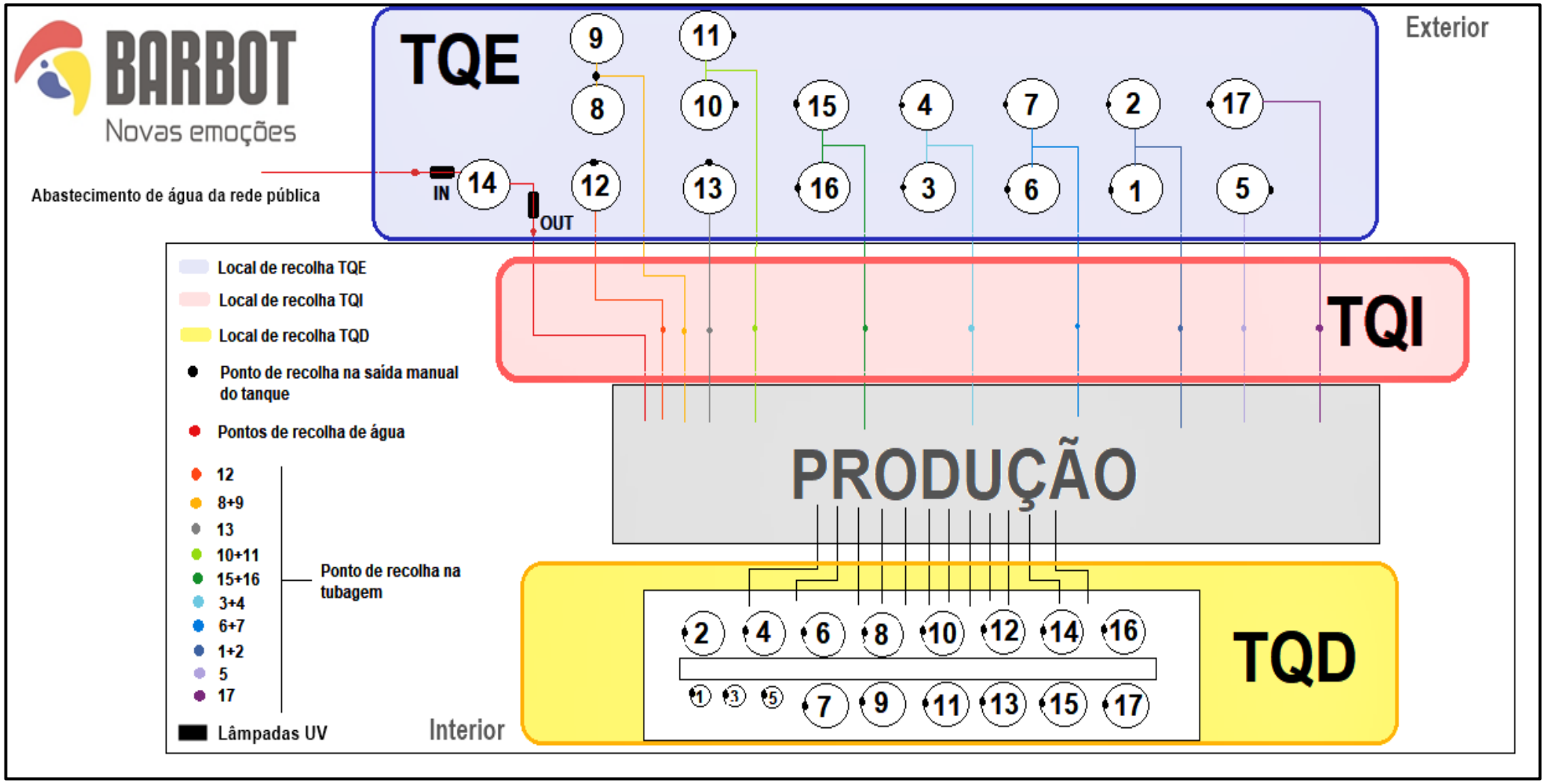


Figura 4 - Esquema simplificado da planta da unidade industrial, com referência dos três locais de amostragem

3.1 Validação do equipamento CellFacts II®

A validação do equipamento CellFacts II® foi efetuada através da análise de uma escala de diluições sucessivas de base dez em solução salina 0,9% NaCl, partindo de uma suspensão microbiana de concentração conhecida e diluindo a mesma de forma sucessiva até à diluição 10^{-5}. Para a preparação da suspensão inicial foi utilizado um microrganismo proveniente de uma das amostras de tinta da empresa, isolado em placa através de técnica de estriamento. Foi utilizada como referência para a preparação da suspensão a reta de calibração da *Escherichia coli*, em que o número de células por mililitro de suspensão é igual à densidade ótica (DO) medida a 610 nm, multiplicada pelo fator constante de 10^9. A reta de calibração é apresentada na equação 1.

$$\frac{Células}{mL} = DO_{610\,nm} \times 10^9 \quad (1)$$

A suspensão foi preparada em solução salina 0,9% NaCl, com uma DO = 0,108 (*Unicam Helios γ*) e que, segundo a reta de calibração usada, teria uma concentração de células/mL igual a 1,08 x 10^8. A fim de confirmar a concentração estimada pela reta de calibração, foram espalhadas em placas de PCA (*Liofilchem*®) as duas últimas diluições (10^{-4} e 10^{-5}), em duplicado, para posterior enumeração, de acordo com o procedimento descrito na secção 3.2.

3.2 Espalhamento e contagem em placa

Foi realizado um primeiro ensaio no laboratório da instituição de ensino, utilizando a técnica de espalhamento em placa. Este ensaio foi realizado com o objetivo de fazer uma primeira avaliação do grau de contaminação presente nas matérias-primas utilizadas pela empresa e nos produtos finais.

Foram realizados espalhamentos em placas de Petri com meio sólido geral *Plate Count Agar* (PCA) da *Liofilchem*®, em duplicado, das amostras não diluídas. Nos espalhamentos o volume de amostra espalhado em cada placa foi de 100 µL. A enumeração de bactérias heterotróficas totais foi realizada após 24 h, 48 h e 72 h de incubação em estufa a 30 ºC. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias (UFC) por mL de amostra.

3.3 Placas de contacto

As placas de contacto utilizadas *(Dip/Contact slides)*, da *Liofilchem® Contact Slide 2,* possuem dois meios de cultura distintos (Anexo A, figura 12), um para a enumeração de bactérias heterotróficas totais (PCA) e outro para a deteção de fungos e leveduras (*Rose Bengal CAF agar*). Ambos os meios possuem na sua constituição neutralizantes que eliminam a atividade bactericida de compostos quaternários de amónia contidos em desinfetantes. O meio PCA possui

ainda um indicador de crescimento RedOx, o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), que confere uma coloração avermelhada às colónias em crescimento para uma melhor visualização [35].

As amostras foram espalhadas em ambas as faces das placas com o auxílio de zaragatoas esterilizadas (Frilabo©) para minimização de contaminações externas. As observações foram registadas após períodos de incubação de 3 a 4 dias à temperatura ambiente (aproximadamente 25 ºC). O fabricante disponibiliza uma escala de unidades expressa em UFC por mL de amostra (Anexo A, figura 13), contudo, o registo efetuado apenas se baseia na observação da presença ou ausência de contaminação.

3.4 Equipamento CellFacts II®

As análises com o equipamento CellFacts II® foram efetuadas de acordo com os protocolos estipulados para o manuseamento do mesmo, sendo estes da autoria e responsabilidade do fabricante (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*). Para cada tipo de amostra, foi seguido um protocolo de preparação e análise específico, existindo um protocolo para a preparação e análise de amostras de resina e tintas acabadas (*Emulsion Paint Protocol*), outro para suspensões de carbonato de cálcio (*Calcium Carbonate Slurries Protocol*) e por fim um para suspensões de dióxido de titânio (*Titanium Dioxide Slurries Protocol*).

Cada aplicação é configurada com resultados simples que indicam ao operador se os níveis de contaminação se encontram aceitáveis ou muito elevados, através de um sistema ilustrativo de "semáforo", vermelho, amarelo e verde, que permite ao operador decidir rapidamente sobre o curso de ação apropriado face aos níveis de contaminação mais elevados. Este sistema ilustrativo é atribuído com base na contagem total de organismos viáveis (TVC) das amostras analisadas, regendo-se pela seguinte distribuição: vermelho quando log TVC/mL ≥ 6; amarelo quando 6 > log TVC/mL ≥ 5,7; verde quando log TVC/mL < 5,7. Outros dados relevantes que são igualmente apresentados no ecrã principal da aplicação são a contagem de células totais viáveis (TVC) e a percentagem do nível de atividade das células (alta, média e baixa) (figura 19, Anexo B). Além deste sistema, os dados do CellFacts® podem ser usados para analisar tendências, que naturalmente se formam ao longo do tempo à medida que os dados são adquiridos e os resultados são acumulados. Ao usar a análise de tendências, será alcançada uma maior compreensão da microbiologia do produto e do processo. Isto fornece a base para decisões inteligentes de modo a gerir proactivamente a contaminação, o que proporcionará um potencial de melhorias significativas para o processo de fabrico [29].

3.4.1 Limpeza diária

Para garantir o bom funcionamento do equipamento, o fabricante recomenda a execução de um protocolo diário de limpeza, antes do início de qualquer atividade, com uma solução de lavagem (*Cell-Wash*™). Periodicamente, antes da limpeza diária efetuada com a solução *Cell-*

Wash™, é recomendada a realização de uma primeira limpeza com o detergente *Cell-Clean*™. Refira-se que este procedimento é efetuado automaticamente, através do *software* de controlo do equipamento. Por sugestão do fabricante, esta foi realizada todas as segundas, quartas e sextas-feiras.

3.4.2 Calibração do equipamento

A calibração do equipamento efetuou-se no início do dia, após a respetiva limpeza diária. Para preparar a solução de calibração, colocou-se um volume conhecido da solução de eletrólitos *Cell-Lyte*™ e uma gota da solução de calibração *Calibration Beads*™ num bijou de 7 mL (anexo A, figura 14) e agitou-se vigorosamente num agitador *vortex* (Analog Vortex Mixer (*Model no.* 9453VWALEU) da VWR®).

3.4.3 Protocolo de tintas em emulsão

O protocolo *Emulsion Paint Protocol* (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*) compreende a preparação, apresentação e análise de amostras de produto final (tintas) e resinas. O primeiro passo de preparação de cada amostra consiste numa diluição na proporção de 1:10 em solução *Cell-Lyte*™, seguida de agitação em *vortex* por um período de tempo conhecido. Após agitação, pipeta-se um volume de amostra conhecido para um tubo *Eppendorf* e centrifuga-se (microcentrífuga MicroStar 12 da VWR®) a velocidade e tempo conhecidos. Num tubo *Eppendorf* sem tampa, adiciona-se um volume conhecido do corante *Cell Stain*™ *1*. Após centrifugação, pipeta-se o sobrenadante da amostra e adiciona-se ao tubo que contem o corante, promovendo a mistura do mesmo com a amostra. Coloca-se por fim a amostra no *AutoSampler* do equipamento para se proceder à análise, usando o aplicativo *Emulsion Paint* (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*). A preparação de amostras foi sempre efetuada em triplicado. De salientar que a cada três amostras colocadas no *AutoSampler* do equipamento, se intercalou com solução de lavagem *Cell-Wash*™ para limpeza e prevenção de contaminações cruzadas.

3.4.4 Protocolo de suspensões de carbonato de cálcio

O protocolo *Calcium Carbonate Slurries Protocol* (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*) compreende a preparação, apresentação e análise de amostras de suspensões de carbonato de cálcio. O primeiro passo de preparação de cada amostra consiste numa diluição na proporção de 1:10 em solução *Disruption Buffer*™, seguida de agitação em *vortex* por um período de tempo conhecido. No protocolo em questão, a adição de corantes é efetuada de forma automática pelo equipamento, sendo apenas necessária a preparação prévia dos mesmos. A mistura de corantes consiste na utilização das soluções padrão *Cell Stain*™ *1* e *Cell Stain*™ *2* na proporção de 5:2, respetivamente, diluídos posteriormente em água desionizada com um fator de diluição de 5%. Coloca-se por fim a amostra no *AutoSampler* do equipamento para se proceder à análise, usando o aplicativo $CaCO_3$ (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*).

3.4.5 Protocolo de suspensões de dióxido de titânio

O protocolo *Titanium Dioxide Slurries Protocol* (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*) compreende a preparação, apresentação e análise de amostras de suspensões de dióxido de titânio. O primeiro passo de preparação de cada amostra consiste numa diluição na proporção de 1:10 em solução *Disruption Buffer*™, seguida de agitação em *vortex* por um período de tempo conhecido. Num tubo *Eppendorf* coloca-se um volume conhecido do filtro químico *Cell-Dense*™, sobre o qual cuidadosamente se pipeta um volume conhecido da amostra diluída e previamente agitada. De seguida centrifuga-se a velocidade e tempo conhecidos e recolhe-se o sobrenadante, que é adicionado a um novo tubo *Eppendorf* contendo um volume conhecido de solução EDTA, deixando repousar em bancada por um curto período de tempo. Após o período de repouso adicionam-se os corantes *Cell Stain*™ *1* e *Cell Stain*™ *2* misturando bem. Efetua-se uma nova centrifugação a velocidade e tempo conhecidos, desta vez descartando o sobrenadante. Faz-se a suspensão do *pellet* obtido pela última centrifugação na solução *Re-suspension Buffer*™ colocando-se por fim a amostra no *AutoSampler* do equipamento para se proceder à análise, usando o aplicativo TiO_2 (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*). A preparação de amostras foi sempre efetuada em triplicado. De salientar que a cada três amostras colocadas no *AutoSampler* do equipamento, se intercalou com solução de lavagem *Cell-Wash*™ para limpeza e prevenção de contaminações cruzadas.

3.5 Estudo da influência de amostragem em diferentes pontos de um mesmo tanque

A fim de verificar se os níveis de contaminação microbiana poderiam ser influenciados pelo local onde se efetua a amostragem, estudou-se essa possibilidade escolhendo um tanque de um produto final e efetuando a recolha de amostras em diferentes pontos do mesmo para análise no equipamento CellFacts®. Foi escolhido o tanque do produto final TQD 11 e foram feitas recolhas (em triplicado) na cabeça de injeção para as latas de tinta, dentro do tanque e na saída manual do tanque (ponto de amostragem habitual). As amostras foram preparadas e analisadas de acordo com o protocolo de tintas em emulsão (capítulo 3, sub-secção 3.4.3).

3.6 Análise da água de processo e avaliação da eficiência de lâmpadas UV na sua desinfeção

A dada altura durante a realização deste trabalho, para minimizar possíveis focos de contaminação, a empresa adquiriu e instalou duas unidades de desinfeção por lâmpadas UV. Após a instalação das unidades de desinfeção, as amostras de água de processo passaram a ser recolhidas em três pontos, o primeiro ponto, onde passa água da rede de abastecimento, situado antes do tanque de armazenamento e das unidades de desinfeção (que serviu de

controlo), um à entrada do tanque de armazenamento e após a primeira unidade de lâmpadas UV (TQE 14 IN) e o outro à saída do tanque de armazenamento e após a segunda unidade de lâmpadas UV (TQE 14 OUT). Na figura 5 encontra-se um esquema simplificado desta instalação.

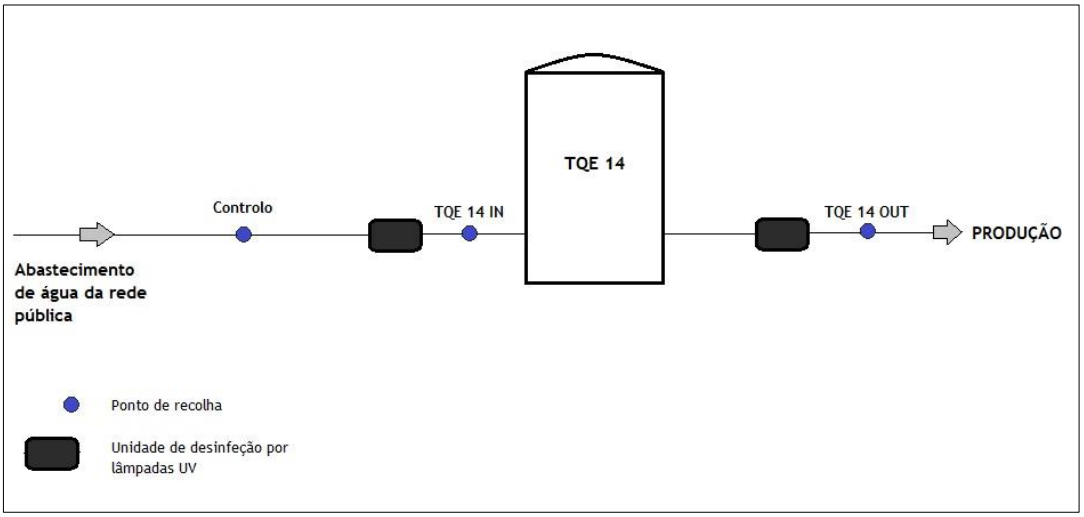


Figura 5 - Esquema simplificado da instalação das unidades de desinfeção por lâmpadas UV no tanque de armazenamento de água de processo

A preparação das amostras consistiu numa diluição na proporção de 1:10 em solução *Cell-Lyte*™, seguida de agitação em *vortex* por um período de um minuto e meio. Colocou-se a amostra no *AutoSampler* do equipamento Cellfacts II® para se proceder à análise, usando o aplicativo *Emulsion Paint* (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*). A preparação de amostras foi sempre efetuada em triplicado. De salientar que a cada três amostras colocadas no *AutoSampler* do equipamento, se intercalou com solução de lavagem *Cell-Wash*™ para limpeza e prevenção de contaminações cruzadas.

3.7 Avaliação da eficácia dos produtos biocidas

A empresa possui no seu *stock* de formulação três aditivos biocidas com princípios ativos distintos, dos quais se testou a sua eficácia numa tinta pertencente ao *top* de vendas da empresa (T 1167). Na tabela 2 estão representados os três biocidas, com os princípios ativos correspondentes e as respetivas percentagens de composição de cada princípio ativo.

Tabela 2 - Aditivos biocidas pertencentes ao *stock* da empresa

Biocida	Princípio(s) ativo(s)	Composição (%)
A	CMIT / MIT (3:1)	1,4
B	BIT / MIT (1:1)	5
C	DBNPA	20

Legenda Tabela 2:

- CMIT – Clorometil-isotiazolinona
- MIT – Metil-isotiazolinona
- BIT – Benzil-isotiazolinona
- DBNPA - Dibromo-nitrilopropionamida

Com base nos dados da tabela 2 foi testada a eficácia dos três biocidas em contacto com as amostras por um período de 4 horas, e a concentrações mais baixas que as correntemente utilizadas pela empresa na formulação de tintas. As amostras da tinta T 1167 foram preparadas de acordo com o protocolo de tintas em emulsão (capítulo 3, sub-secção 3.4.3), às quais foram adicionados os biocidas na fase final de preparação, separadamente e de acordo com as concentrações apresentadas na tabela 3. As amostras foram colocadas no *AutoSampler* do equipamento Cellfacts II® para se proceder à sua análise usando o aplicativo *Emulsion Paint* (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*). A preparação de amostras foi sempre efetuada em triplicado. De salientar que a cada três amostras colocadas no *AutoSampler* do equipamento, se intercalou com solução de lavagem *Cell-Wash*™ para limpeza e prevenção de contaminações cruzadas.

Tabela 3 - Concentrações testadas na avaliação de eficácia para cada biocida

Biocida	Princípio(s) ativo(s)	Concentrações testadas (ppm)
A	CMIT / MIT (3:1)	5
		10
B	BIT / MIT (1:1)	100
		150
C	DBNPA	10
		30

Utilizando o *software* complementar *CFII 3D View* (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*) foram representados os gráficos relativos à eficiência dos três biocidas no período de 4 horas de estudo (Anexo C).

Nota: Por motivos de acordo de confidencialidade entre a empresa e o fabricante do equipamento, os dados relativos a volumes de soluções, velocidades e tempos de centrifugação e tempos de agitação descritos no ponto 3.3 deste capítulo não puderam ser revelados de forma integral.

4 Resultados e Discussão

Dependendo do método usado para enumerar microrganismos, os valores finais das contagens por unidade de volume ou de área variam para uma mesma amostra. Os métodos de enumeração que não dependem do tipo geral de metabolismo ou estado fisiológico das células permitem contabilizar o número total de células numa dada amostra. Isto é, permitem contabilizar não só as células vivas (i.e., viáveis) mas também as mortas (i.e., não viáveis, desde que ainda mantenham integridade celular). São exemplos destes métodos a contagem das células após coloração com corantes fluorescentes que atravessam as membranas e intercalam o DNA em citómetros de fluxo ou por microscopia de fluorescência [36]. Uma vez que a presença de células mortas pode não ser determinante para uma dada aplicação, outros métodos de enumeração permitem detetar apenas as células viáveis, isto é, células ativas, ainda com capacidade para se reproduzir. Muitos destes métodos baseiam-se na utilização de corantes RedOx, uma vez que permitem contabilizar as células com capacidade para metabolizar [36]. O equipamento utilizado neste estudo (CellFacts II®) baseia-se neste tipo de métodos, uma vez que deteta todas as células com potencial de membrana, isto é, o número total de células viáveis (TVC), por volume de amostra.

Os métodos tradicionais para enumerar as células viáveis dependem do cultivo. No entanto, devido ao facto de uma mesma amostra poder conter organismos com requisitos nutricionais e ambientais (ex. temperatura, período de incubação) muito distintos, parte das células viáveis de uma amostra pode não ser contabilizada por este tipo de métodos. De facto, mesmo usando meios de cultura gerais, é provável que nem todas as células viáveis de uma amostra tenham a capacidade para se multiplicar e formar unidades formadoras de colónias (UFC) num dado meio. Isto porque os nutrientes disponíveis e as condições de incubação podem não ser favoráveis ao seu desenvolvimento, ou porque as células estão de alguma forma stressadas e não conseguem replicar-se naquelas condições. Estas células são então designadas por viáveis não-cultiváveis (VBNC), que tal como o próprio nome indica, não são passíveis de serem enumeradas através de técnicas por cultivo. Contudo assumem um estado metabólico quiescente que lhes permite reter a sua integridade celular e o seu potencial replicativo. Por oposição, as células viáveis e cultiváveis, são passíveis de serem cultivadas em meios adequados (gerais ou seletivos). Em termos de enumeração, é expectável que as contagens se ordenem da seguinte forma: células totais > totais viáveis >/= viáveis não-cultiváveis > viáveis cultiváveis [37–39].

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a capacidade do equipamento CellFacts II® para detetar rapidamente contaminação microbiológica em amostras provenientes de diferentes locais da unidade fabril. Numa primeira fase pretendeu-se confirmar a capacidade do equipamento para enumerar as células viáveis presentes numa amostra. Seguidamente

avaliou-se o grau de contaminação microbiológica dentro da unidade fabril, através de métodos tradicionais (cultivo) e pelo novo método. Finalmente, avaliou-se a eficiência de desinfetantes na manutenção da qualidade microbiológica de materiais e produtos da fábrica.

4.1 Validação do equipamento CellFacts II®

A validação do equipamento CellFacts II® foi efetuada partindo de uma suspensão microbiana de concentração conhecida e efetuando diluições sucessivas de base dez para análise no equipamento. Após confirmação por espalhamento em placa, a suspensão de partida possuía uma concentração de 3,60 x 10^6 células/mL. A análise foi feita em duplicado e os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Contagens totais de organismos viáveis obtidas na validação do equipamento CellFacts II®

Amostra	TVC/mL
Suspensão de partida	2,85 x 10^6 ± 3,54 x 10^5
Diluição 10^{-1}	1,65 x 10^5 ± 3,54 x 10^4
Diluição 10^{-2}	1,50 x 10^4 ± 2,83 x 10^3
Diluição 10^{-3}	1,80 x 10^3 ± 1,41 x 10^2
Diluição 10^{-4}	8,95 x 10^2 ± 2,12 x 10^1
Diluição 10^{-5}	9,25 x 10^1 ± 7,78 x 10^0

O equipamento mostrou-se capaz de determinar a concentração da suspensão de partida, bem como de efetuar as leituras com decréscimos de concentração, mostrando-se capaz de distinguir os valores de base dez entre diluições, comprovando assim a validade do método. O valor apresentado para a diluição 10^{-4} (e consequentemente para a diluição 10^{-5}) não se apresenta de acordo com o esperado, o que se poderá dever a erros cometidos na diluição por parte do operador. De salientar que para que a validação estivesse completa, parâmetros como a exatidão, a repetibilidade e a precisão teriam de ser igualmente avaliados, contudo não foram efetuados neste trabalho.

4.2 Avaliação do grau de contaminação microbiológica

A primeira avaliação do grau de contaminação microbiológica foi efetuada por método de espalhamento e contagem em placa. Os resultados obtidos para a contagem efetuada após 72 h de incubação do espalhamento direto das amostras estão sumarizados na tabela 5, expressos em UFC por mL.

Tabela 5 - Resultados das contagens em placa para o espalhamento direto das amostras, após 72 h de incubação

TQE (UFC/mL)			TQI (UFC/mL)			TQD (UFC/mL)		
Resinas	TQE 1	NA(1)	Resinas	TQI 1+2	< LD	Produto final	TQD 1	< LD
	TQE 2	< LD		TQI 3+4	< LD		TQD 2	3,5 x 10^1
	TQE 3	NA(1)		TQI 5	< LD		TQD 3	NA(1)
	TQE 4	< LD		TQI 6+7	< LD		TQD 4	2,0 x 10^1
	TQE 5	< LD	$CaCO_3$	TQI 8+9	< LD		TQD 5	NA(2)
	TQE 6	NA(1)		TQI 10+11	NA(1)		TQD 6	< LD
	TQE 7	NA(1)	TiO_2	TQI 12	NA(1)		TQD 7	NA(2)
$CaCO_3$	TQE 8+9	NA(1)		TQI 13	< LD		TQD 8	2,5 x 10^1
	TQE 10	< LD	Resinas	TQI 15+16	2,0 x 10^1		TQD 9	NA(2)
	TQE 11	4,0 x 10^1		TQI 17	NA(1)		TQD 10	5,2 x 10^2
TiO_2	TQE 12	2,0 x 10^1					TQD 11	2,7 x 10^3
	TQE 13	NA(1)					TQD 12	2,7 x 10^2
H_2O	TQE 14	>3,0 x 10^3					TQD 13	NA(2)
Resinas	TQE 15	6,0 x 10^1					TQD 14	7,5 x 10^1
	TQE 16	NA(1)					TQD 15	6,0 x 10^2
	TQE 17	< LD					TQD 16	< LD
							TQD 17	1,0 x 10^3

Legenda Tabela 5:

- LD – Limite de deteção = 10 UFC/mL
- NA(1) – Locais de amostragem previstos, mas não contemplados neste ensaio
- NA(2) – Amostras recolhidas, mas não analisadas

Observando a tabela 5 é possível verificar que a zona de enchimento de produtos finais (TQD) é aquela onde se observaram contagens mais elevadas de organismos cultiváveis (heterotróficos totais). Verificou-se também o crescimento de microrganismos em quase todos os locais de amostragem da zona de armazenamento exterior (TQE), com contagens mais elevadas no tanque de abastecimento de água para a produção (TQE 14). De salientar que à data da realização deste ensaio as baterias de lâmpadas UV para desinfeção da água de processo ainda não se encontravam instaladas.

A enumeração de organismos presentes nas placas foi dificultada pela coloração e/ou turvação de algumas das amostras, sobretudo nas amostras de produtos finais (TQD). O mesmo ocorreu

com amostras de matérias-primas em que estão presentes carbonatos de cálcio em suspensão (TQE e TQI de 8 a 11) ou o pigmento branco dióxido de titânio (TQE e TQI 12 e 13). As amostras de resinas (TQE e TQI de 1 a 7 e de 15 a 17) não apresentaram tanta dificuldade de observação uma vez que são mais translúcidas que as restantes. Os produtos TQD 5, 7, 9 e 13, com resultado NA(2), foram amostrados mas não analisados devido à sua elevada viscosidade, o que impossibilitou a sua pipetagem para posterior espalhamento em placa.

Simultaneamente, as mesmas amostras foram analisadas em placas de contacto, porém, ao contrário do esperado, todas as observações tiveram resultado negativo para a presença de contaminação microbiológica. Tal facto poderá dever-se às condições de cultivo, uma vez que as placas de contacto foram colocadas à temperatura ambiente e não em estufa, a uma temperatura mais elevada e acima de tudo controlada. Outra justificação poderá residir na presença de neutralizantes no meio de cultura, o que de alguma forma poderá ter interferido com o crescimento microbiano, ou ainda devido à presença do indicador RedOx, o TTC, o qual segundo a literatura, dependendo da concentração em que é utilizado, pode servir como agente seletivo e/ou de inibição para o crescimento microbiano [40].

Posteriormente foi efetuada a avaliação do grau de contaminação microbiológica com o equipamento Cellfacts II®. As amostras utilizadas nesta avaliação foram diferentes das utilizadas no ensaio de espalhamento em placa, contudo provenientes dos mesmos locais de amostragem.

Na figura 6 encontram-se os resultados da contagem total de organismos viáveis obtidos para as matérias-primas nos dois locais de amostragem previstos (TQE e TQI).

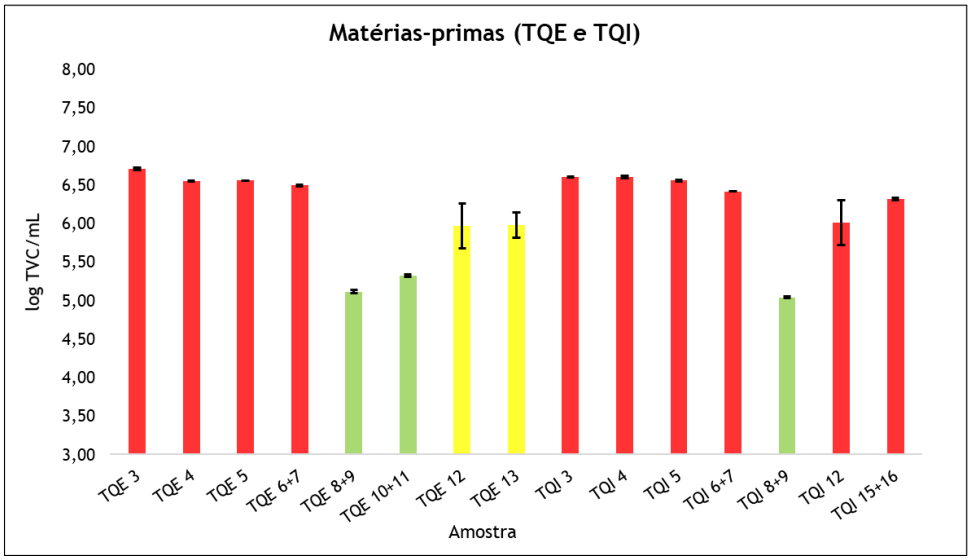


Figura 6 - Contagem total de organismos viáveis nas matérias-primas em TQE e TQI (vermelho: log TVC/mL ≥ 6; amarelo: 6 > log TVC/mL ≥ 5,7; verde: log TVC/mL < 5,7)

É possível verificar que as resinas analisadas apresentaram valores de contagem maiores que as restantes amostras, sendo que quando se comparam os dois locais de recolha (TQE e TQI), não existe grande diferença entre valores. As suspensões de $CaCO_3$ foram as que apresentaram valores de contagem total de organismos viáveis mais baixos, seguidas das suspensões de TiO_2. Seria de esperar que as resinas fossem as matérias-primas com valores mais elevados de contagem uma vez que possuem na sua composição uma grande fonte de nutrientes necessários ao crescimento microbiano (compostos orgânicos), facto que se confirma pelos resultados desta avaliação. A figura 7 apresenta a percentagem de atividade celular em cada amostra nos locais TQE e TQI.

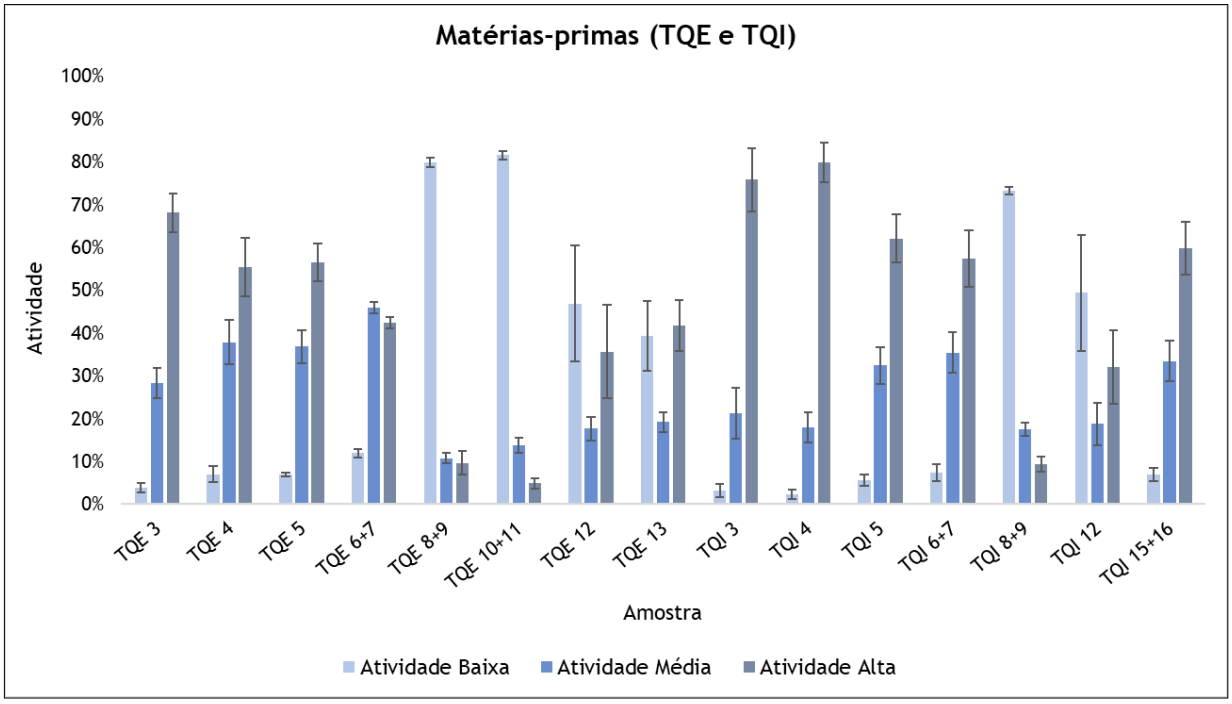


Figura 7 - Percentagem de atividade celular em cada amostra nos locais TQE e TQI

Observando a figura 7 verifica-se que, quer em TQE como em TQI, as amostras que tiveram as percentagens de atividade alta mais elevadas foram as resinas, seguidas pelas suspensões de TiO_2 (TQE e TQI 12 e 13) e por último, as suspensões de $CaCO_3$.

Na figura 8 encontram-se os resultados da contagem total de organismos viáveis obtidos para os produtos finais (TQD).

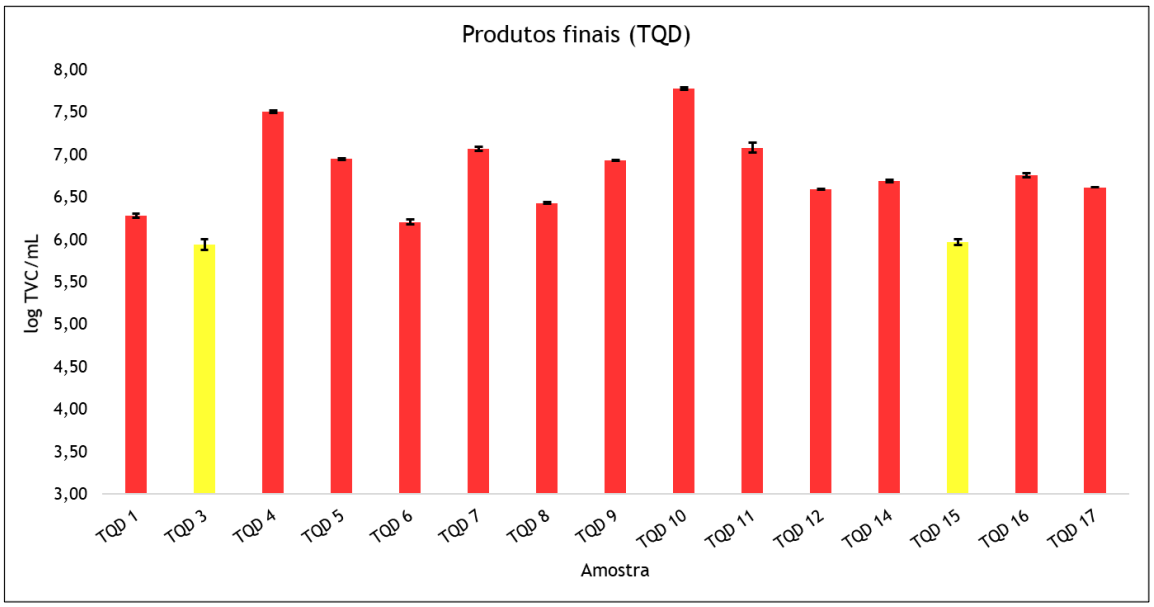


Figura 8 - Contagem total de organismos viáveis nos produtos finais em TQD (vermelho: log TVC/mL ≥ 6; amarelo: 6 > log TVC/mL ≥ 5,7)

As amostras com valores de contagem mais elevados foram a TQD 4 e a TQD 10, sendo que no geral, os valores obtidos para os produtos finais foram mais elevados relativamente às matérias-primas nesta análise. As exceções nos produtos finais foram as amostras TQD 3 e TQD 15 que quando comparadas com as restantes amostras do mesmo local de recolha tiveram valores de contagem mais baixos. Na figura 9 apresentam-se as percentagens de atividade celular em cada amostra do local TQD, para avaliação do estado fisiológico.

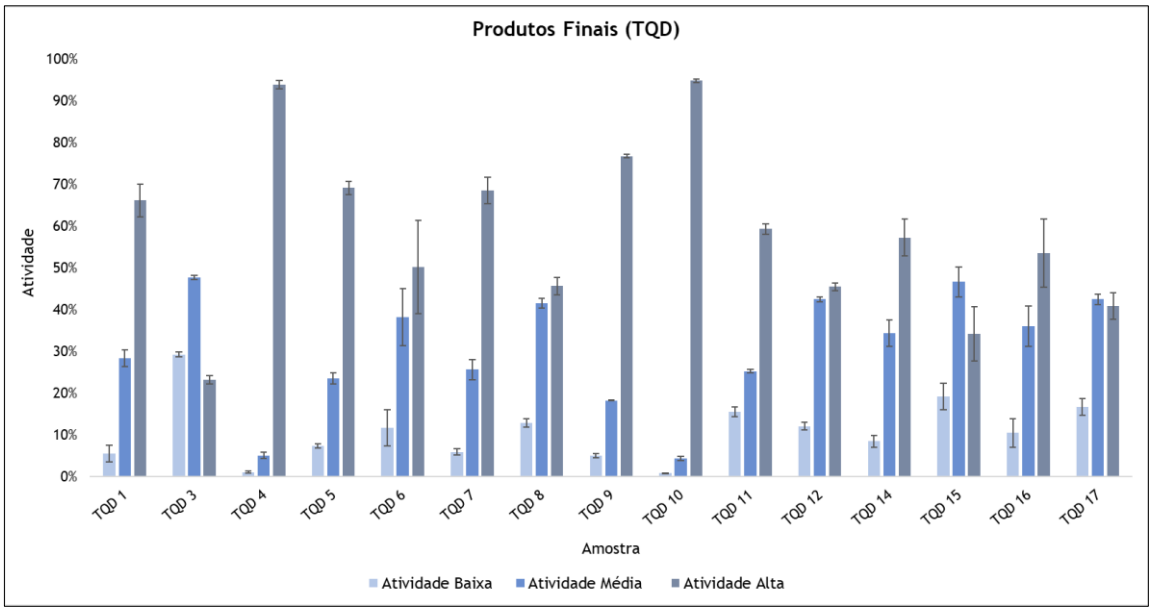


Figura 9 - Percentagens de atividade celular em cada amostra no local TQD

Verificou-se que a maioria dos produtos finais detém uma percentagem de atividade alta muito elevada, com destaque para as amostras TQD 4 e TQD 10, que além de terem o valor de células por mL mais elevado (ver figura 8), estas estão, na sua maioria, metabolicamente ativas.

Os valores de contagem total de organismos viáveis foram responsáveis pela classificação ilustrativa do tipo "semáforo" de cada amostra, que se traduzem na diferente atribuição de cores representada nas figuras 6 e 8, em que a vermelho são as amostras que falham no sistema de aprovação, a amarelo as amostras a monitorizar atentamente e a verde as que passam no sistema de aprovação.

Sumarizando os três métodos utilizados na avaliação do grau de contaminação microbiana pode dizer-se que a análise efetuada em placa se revelou útil na perceção da morfologia dos organismos contaminantes, assim como na perceção do seu crescimento através do tempo de cultivo necessário para a observação de colónias. Contudo revelou algumas limitações ao nível da observação, uma vez que as amostras processadas possuem grandes quantidades de ruido visual. Outra limitação reside no facto de só se ter perceção do que é cultivável e não de um todo, podendo levar a decisões erradas com base em falsos negativos. O mesmo se passa com a análise em placas de contacto em que neste caso em particular não foi possível tirar quaisquer conclusões. De salientar que seria no mínimo expectável algum tipo de crescimento semelhante ao observado no ensaio de espalhamento em placa, tendo em conta que um dos meios de cultura é muito semelhante. Relativamente aos testes com o equipamento Cellfacts® pode dizer-se que a obtenção de resultados é muito mais rápida face aos dois métodos anteriormente apresentados, mais sensível e orientada para uma totalidade. A possibilidade de análise sem a necessidade de recorrer à incubação e a informação sobre o estado fisiológico das células devem ser vistas como mais valias no uso deste equipamento.

4.2.1 Estudo da influência de amostragem em diferentes pontos de um mesmo tanque

A figura 10 apresenta os valores de contagem total de organismos viáveis e a figura 11 as percentagens de atividade celular nos diferentes pontos de amostragem do tanque de produto final TQD 11.

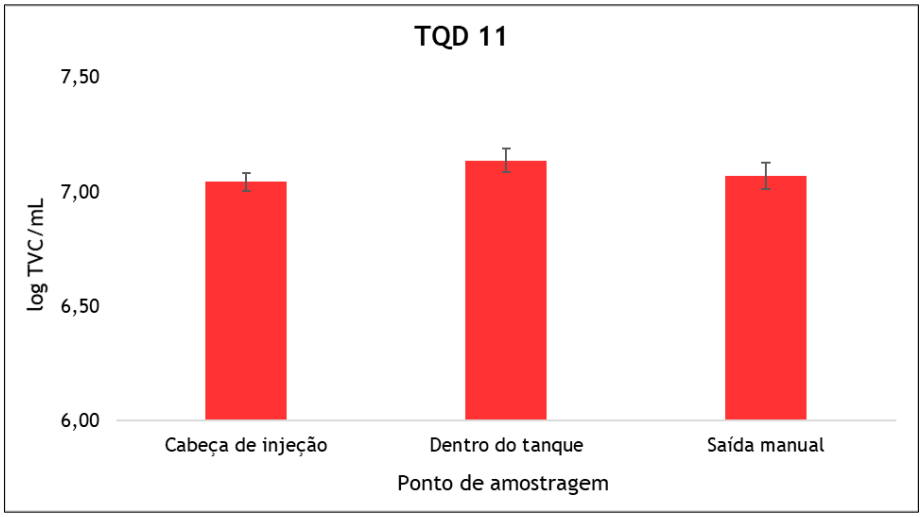


Figura 10 - Contagem total de organismos viáveis nos diferentes pontos de amostragem no tanque TQD 11 (vermelho: log TVC/mL ≥ 6)

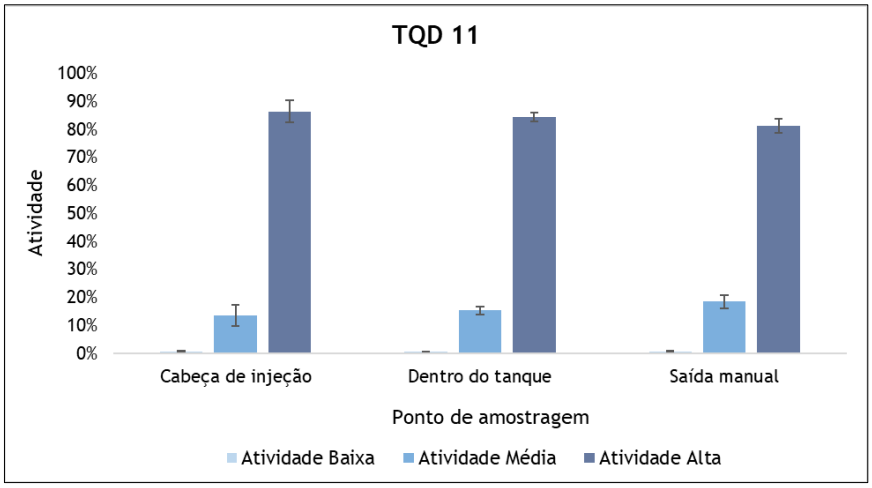


Figura 11 - Percentagens de atividade celular nos diferentes pontos de amostragem no tanque TQD 11

Observando as figuras 10 e 11, sugere-se que pouca ou nenhuma distinção existe entre pontos de amostragem, quer na contagem de organismos viáveis, quer nas percentagens de atividade celular, o que significa que o ponto onde se efetua a recolha da amostra poderá não ter influencia nos níveis de contaminação microbiana. Uma possível explicação para este acontecimento reside no facto de ocorrer recirculação, em intervalos de hora a hora durante o período laboral, dentro dos tanques de armazenamento do produto final, levando à homogeneização do seu conteúdo.

Também neste estudo foram utilizadas placas de contacto como método de avaliação complementar da presença de contaminação microbiana. Os resultados foram negativos para todas as amostras. A possível justificação para o sucedido reside nas razões já apresentadas para outras avaliações realizadas ao longo deste trabalho com a mesma metodologia.

4.2.2 Análise da água de processo e avaliação da eficiência de lâmpadas UV na sua desinfeção

Para análise da água de processo e avaliação da eficiência das unidades de desinfeção por lâmpadas UV, foram analisadas amostras provenientes dos pontos de recolha mencionados na figura 5. Na tabela 6 compararam-se os resultados obtidos para os três pontos de amostragem, com as contagens totais de organismos viáveis (TVC/mL) e respetivas percentagens de atividade celular.

Tabela 6 - Resultados obtidos na análise da água de processo e avaliação da eficiência de lâmpadas UV

Parâmetro	Controlo	TQE 14 IN	TQE 14 OUT
TVC/mL	$4{,}13 \times 10^3 \pm 2{,}06 \times 10^3$	$8{,}10 \times 10^3 \pm 5{,}11 \times 10^3$	$7{,}5 \times 10^3 \pm 4{,}82 \times 10^3$
Atividade alta (%)	2,83 ± 1,29	4,85 ± 4,07	3,29 ± 2,09
Atividade média (%)	70,83 ± 2,42	77,48 ± 1,10	76,23 ± 4,27
Atividade baixa (%)	26,34 ± 3,79	17,67 ± 3,71	20,47 ± 6,29

Observando a tabela 6 é possível constatar que apesar da presença das unidades de desinfeção, nenhuma diferença se faz notar entre a água proveniente da rede de abastecimento (controlo) e a água tratada à saída das lâmpadas UV. Seria espectável que à saída do tanque e após a segunda unidade de desinfeção (TQE 14 OUT) os valores fossem inferiores quer aos de controlo, quer aos da entrada do tanque (TQE 14 IN) uma vez que passa apenas por uma unidade de desinfeção. A razão para que tal não aconteça poderá residir no facto de a água que sai em TQE 14 OUT permanecer estagnada, ainda que por curtos períodos de tempo, dentro do tanque de armazenamento ou então por poder existir algum foco de contaminação dentro do próprio tanque. Relativamente às percentagens de atividade também não se fizeram notar grandes distinções entre as amostras. Sugere-se que o sistema de desinfeção em questão não seja eficiente uma vez que não há redução da população microbiana nem variação na sua atividade celular [41].

Foram utilizadas placas de contacto como método de avaliação complementar, sendo que os resultados foram negativos para a presença de contaminação microbiológica em ambas as amostras. A possível justificação para o sucedido reside nas razões já apresentadas para outras avaliações realizadas ao longo deste trabalho com a mesma metodologia.

4.3 Avaliação da eficácia dos produtos biocidas

Na tabela 7 são apresentadas as contagens totais de organismos viáveis e as percentagens de atividade celular obtidas através dos gráficos 3D no período de 4 horas de estudo para cada biocida e concentrações testadas, tendo como referência a amostra de controlo sem adição de qualquer biocida.

Tabela 7 - Resultados obtidos na avaliação da eficácia dos produtos biocidas

Parâmetro	Controlo	Biocida					
		A		B		C	
		5 ppm	10 ppm	100 ppm	150 ppm	10 ppm	30 ppm
TVC/mL	$3,35 \times 10^6 \pm 2,12 \times 10^5$	$3,15 \times 10^6 \pm 7,07 \times 10^4$	$3,40 \times 10^6 \pm 1,41 \times 10^5$	$1,85 \times 10^6 \pm 7,07 \times 10^4$	$7,60 \times 10^5 \pm 4,24 \times 10^4$	$9,45 \times 10^4 \pm 5,02 \times 10^4$	$1,26 \times 10^4 \pm 9,12 \times 10^3$
Atividade Alta (%)	45 ± 0,10	41 ± 0,56	41 ± 2,64	49 ± 0,17	58 ± 0,42	0	0
Atividade Média (%)	30 ± 0,03	32 ± 0,59	32 ± 2,67	28 ± 0,21	24 ± 0,21	21 ± 1,08	9 ± 1,10
Atividade Baixa (%)	25 ± 0,07	27 ± 0,04	28 ± 0,04	23 ± 0,04	18 ± 0,09	79 ± 3,90	91 ± 1,85

Analisando as percentagens de atividade apresentadas na tabela 7 verifica-se que o biocida C apresentou potencial como biocida, sendo que passadas as quatro horas a atividade celular baixou bastante, bem como a população microbiana foi reduzida comparativamente ao controlo. O biocida B apresenta uma ligeira redução na contagem total de organismos viáveis, principalmente na concentração de 150 ppm. Contudo, as percentagens de atividade alta foram mais elevadas face à amostra de controlo, deixando algumas questões acerca da sua eficácia enquanto aditivo biocida. Para os biocidas A e B devem-se fazer variar as suas concentrações além das testadas nesta avaliação, bem como alargar o período de análise a fim de se otimizar o seu uso e perceber com clareza a eficiência que possuem. De acordo com a literatura, para que se possa considerar um desinfetante como sendo eficaz, este tem de promover uma redução da população microbiana em pelo menos 5 log numa suspensão e de 3 log numa superfície [41]. Tendo em conta este critério, nenhum dos biocidas avaliados neste trabalho pode ser considerado como eficiente.

5 Conclusões

A indústria das tintas tem demonstrado fortes preocupações no que a contaminações de origem microbiológica diz respeito. Principalmente os produtores de tintas de base aquosa, assim como alguns fabricantes de matérias-primas para a sua produção, pois vêm o seu leque de opções para a prevenção deste tipo de ocorrências ficar cada vez mais restrito e reduzido. O uso excessivo de produtos biocidas por parte de algumas indústrias, principalmente a dos cosméticos, fez com que estes produtos se tornassem alvo de grande atenção devido aos problemas dérmicos que acabariam por provocar nas pessoas. Tal facto levou as entidades competentes a criar leis de aprovação e restrição quanto ao uso de certas substâncias ativas como produtos biocidas. A monitorização e análise rigorosa dos seus produtos e matérias-primas passa então a ser melhor arma de defesa por parte dos fabricantes de tintas. Para responder às necessidades de indústrias deste tipo, cujo tempo é dinheiro, os métodos de monitorização e análise devem além de ser eficientes, serem tão rápidos quanto possível, daí a aposta na metodologia tratada ao longo deste projeto.

No presente trabalho procedeu-se à avaliação do grau de contaminação microbiológica em tintas e matérias-primas utilizadas na sua produção através de um método de deteção rápida de partículas. O equipamento utilizado para o efeito foi o CellFacts II®. O método foi validado, contudo os parâmetros da repetibilidade, precisão e exatidão devem ser contemplados em futuros trabalhos. Foi possível verificar que os produtos finais (tintas) e as resinas usadas na sua produção apresentam os níveis de contagem mais elevados, seguido das suspensões de dióxido de titânio e por fim as suspensões de carbonato de cálcio. Sugere-se ainda que o grau de contaminação microbiológica é semelhante em qualquer ponto de recolha de um tanque em que ocorra recirculação. Quanto às lâmpadas UV usadas para a desinfeção da água de processo, presume-se que o sistema instalado na unidade fabril não esteja a ser eficiente. De entre os métodos utilizados na avaliação do grau de contaminação microbiano, é possível destacar o equipamento CellFacts II® por ser mais rápido e por ter a capacidade de enumerar células independentemente do estado fisiológico em que se encontram. As placas de contacto utilizadas correntemente pela empresa revelaram ser uma metodologia muito pouco credível, uma vez que todos os testes tiveram resultado negativo.

A eficiência dos biocidas utilizados pela empresa foi avaliada, sendo que o biocida que apresentou maior potencial foi o C, contudo nada se pode afirmar concretamente acerca da sua eficiência.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

Os principais objetivos deste trabalho foram a avaliação do grau de contaminação microbiológica em tintas e matérias-primas usadas na sua produção e a avaliação da eficácia dos produtos biocidas utilizados pela empresa. Dos objetivos propostos, apenas o primeiro foi alcançado, sendo que o segundo necessitaria de ser devidamente desenvolvido e explorado.

6.2 Limitações e Trabalho Futuro

As maiores condicionantes na realização do trabalho foram os problemas técnicos do equipamento CellFacts II® que ocorreram ao longo do semestre, assim como os excessivos atrasos na entrega de consumíveis necessários à sua utilização, que por diversas vezes originaram atrasos na obtenção dos resultados e na concretização do próprio trabalho em si.

A validação do equipamento utilizado deve ser explorada em outras vertentes, como por exemplo, utilizando uma tinta como amostra e inoculando a mesma com suspensões microbianas de concentração conhecida de modo a avaliar a resposta do equipamento com uma matriz real. Os parâmetros da repetibilidade, precisão e exatidão devem ser contemplados numa futura validação. Quanto à eficácia dos produtos biocidas, poderá ser viável a extensão do período de avaliação. A avaliação de outros princípios ativos além dos contemplados neste projeto também deve ser tida em conta. Para uma melhor compreensão e implementação do equipamento como metodologia de avaliação interna, sugere-se a criação de um plano de amostragem regular e sistemático, efetuando-se várias amostras mensais tanto de produtos, como de matérias-primas.

6.3 Apreciação Final

O trabalho desenvolvido é relevante para a indústria em questão, mas também para a comunidade científica em geral. A aplicação deste tipo de metodologia em outras áreas de intervenção pode ser explorada e encorajada. Os trabalhos desenvolvidos ao longo deste projeto poderão servir de base a trabalhos futuros.

Referências

[1]. «*Barbot - Indústria de Tintas, S.A.*» [Internet]. 2016 [citado a 17 de Outubro de 2017]. Disponível em: https://barbot.pt/empresa/historia/

[2]. Nogueira J.L. «*Noções Básicas de Tintas e Vernizes, Volume I*». ARCP. ARCP - Associação Rede Competência em Polímeros; 2006. 269 p.

[3]. Menda M. «*Corantes e pigmentos*» [Internet]. Conselho Regional de Química - IV Região. 2011 [citado a 19 de Fevereiro de 2018]. Disponível em:

http://www.crq4.org.br/quimicaviva_corantespigmentos

[4]. S. L. «*Coatings Encyclopedic Dictionary*». Federation of Societies for Coatings Technology; 1995.

[5]. Lambourne R., T.A. S. «*Paint and Surface Coatings - Theory and Practice, 2nd Edition*». Cambridge England: Woodhead Publishing Limited; 1999. 529-549 p.

[6]. Stoye D., Freitag W. «*Paints, Coatings and Solvents - 2nd Edition*». Wiley VCH; 2008. 1-414 p.

[7]. Denyer S.P. «*Mechanisms of action of biocides*». Int Biodeterior. 1990;26(2–4):89–100.

[8]. Euchi S. «*Abrindo a caixa preta dos revestimentos*». Mais arquitetura. 2002;v. 4(n.):54–6.

[9]. Contant S., Júnior G.C., Machado P.F.M.P.B., Lona L.M.F. «*Evaluation of the effect of dry-film biocides on paint film preservation using neural networks*». Brazilian J Chem Eng. 2010;27(4):643–51.

[10]. Matteucci A. «*Cómo escoger el biocida correcto*». Almeida e Valenga; 1989.

[11]. Leite L., Murro M. «*Nova tecnologia multifuncional para a proteção microbiológica de tintas em emulsão em 1999*». Em: CONGRESSO INTERNACIONAL DE TINTAS, 6. São Paulo: ABRAFATI; 1999. p. 147–54.

[12]. «*Substâncias biocidas ativas - ECHA*» [Internet]. [citado a 17 de Janeiro de 2018]. Disponível em: https://echa.europa.eu/pt/information-on-chemicals/biocidal-active-substances?p_auth=DAc4TKbJ&p_p_id=echarevbiocides_WAR_echarevbiocidesportlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_echarevbiocid

[13]. «*Guia para a utilização de Biocidas nas Tintas Decorativas*». [citado a 11 de Janeiro de 2018]; Disponível em:

http://www.aptintas.pt/Media/doc_421_guia_biocidas_versao2_2014_valid_dgs_pt.pdf

[14]. Dey B.K., Hashim M.A., Hasan S., Sen Gupta B. «*Microfiltration of water-based paint effluents*». Adv Environ Res. 2004;

[15]. «*Os Microrganismos e os Alimentos*». [citado a 19 de Fevereiro de 2018];28. Disponível em:
http://www.epralima.com/infoodquality/Material_de_formacao_pt/Manuais/3_Os_Microrganismos_e_os_Alimentos.pdf

[16]. Fazenda J.M.R. «*Tintas e Vernizes: ciência e tecnologia, 2ª ed.*» São Paulo: ABRAFATI; 1995.

[17]. Winkowski K. «*Estratégias de controle microbiano*». Impra Lat. 1999;v. 4(n. 1):11–4.

[18]. Arquiaga M.C., Canter L.W., Robertson J.M. «*Microbiological characterization of the biological treatment of aircraft paint stripping wastewater*». Environ Pollut. 1995;

[19]. Bjurman J. «*Fungal and microbial activity in external wooden panels as determined by finish, exposure, and construction techniques*». Int Biodeterior Biodegrad. 1999;

[20]. Stranger-Johannessen M., Norgaard E. «*Deterioration of anti-corrosive paints by extracellular microbial products*». Int Biodeterior. 1991;

[21]. Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., Barer M.R. «*Viability and activity in readily culturable bacteria: A review and discussion of the practical issues*». Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 1998;73(2):169–87.

[22]. Keep N.H., Ward J.M., Cohen-Gonsaud M., Henderson B. «*Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states*». Vol. 14, Trends in Microbiology. p. 271–6.

[23]. Keep N.H., Ward J.M., Robertson G., Cohen-Gonsaud M., Henderson B. «*Bacterial resuscitation factors: Revival of viable but non-culturable bacteria*». Vol. 63, Cellular and Molecular Life Sciences. p. 2555–9.

[24]. Kell D.B., Young M. «*Bacterial dormancy and culturability: The role of autocrine growth factors*». Vol. 3, Current Opinion in Microbiology. 2000. p. 238–43.

[25]. Denyer S.P., Stewart G.S.A.B. «*Mechanisms of action of disinfectants*». Em: International Biodeterioration and Biodegradation. 1998. p. 261–8.

[26]. Baumgart J. «*[Possibilities and limits of modern rapid procedures for process control of cleaning and disinfection methods].*» Zentralbl Hyg Umweltmed [Internet]. Dezembro de 1996;199(2–4):366–75. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9409924

[27]. Schwarzentruber P. «*Microbiological Characterisation of White Pigment Slurries - A Strategy for Bacteria Management*». University of Warwick; 2003.

[28]. Reichart O., Szakmár K., Jozwiak Á., Felföldi J., Baranyai L. «*Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination*». Int J Food Microbiol [Internet]. 10 de Março de 2007 [citado a 21 de Fevereiro de 2018];114(2):143–8. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160506005368

[29]. «*Products - CellFacts Analytics*» [Internet]. 2017 [citado 18 de Janeiro de 2018]. Disponível em: http://www.cellfacts-analytics.com/products

[30]. Schwarzentruber P. «*A new analytical method in microbiology*». Oftringen, Switzerland;

[31]. Di Maiuta N. «*Characterisation of Mixed Microbial Populations in White Mineral Dispersions*». University of Warwick; 2010 (April):1–262.

[32]. Fowler S., Roush R., Wise J., OpenStax College, Rice University. «*Concepts of Biology*». Am Biol Teach [Internet]. 1996;58(3):186. Disponível em:

http://openstaxcollege.org/files/textbook_version/low_res_pdf/12/col11487-lr.pdf

[33]. Reasoner D.J. «*Heterotrophic plate count methodology in the United States*». Int J Food Microbiol [Internet]. 1 de Maio de 2004 [citado a 21 de Fevereiro de 2018];92(3):307–15. Disponível em:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503004458

[34]. Boczek L.A., Rice E.W., Johnson C.H. «*TOTAL VIABLE COUNTS | Spread Plate Technique*». Em: Encyclopedia of Food Microbiology [Internet]. Elsevier; 2014 [citado a 21 de Fevereiro de 2018]. p. 636–7. Disponível em:

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123847300003311

[35]. LIOFILCHEM Bacteriology Products. «*TECHNICAL SHEET - CONTACT SLIDE 2*» [Internet]. Rev.1 of 15.03.2006. 2006 [citado a 5 de Fevereiro de 2018]. p. 2. Disponível em: http://static.lvengine.net/frilabo/Imgs/outros/525272.TechnicalDataSheet.pdf

[36]. Hernandez M. «*A Combined Fluorochrome Method for Quantitation of Metabolically Active and Inactive Airborne Bacteria*». Aerosol Sci Technol [Internet]. Fevereiro de 1999;30(2):145–60. Disponível em:

http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/027868299304741

[37]. Hale, W. G., Saunders, V. A., Margham, J. P., & Hale W.G. «*Collins Dictionary of Biology, 3rd edition*». 3rd. Editi. London: Collins; 2005. 518 p.

[38]. Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D., Faucher S.P. «*The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens*». Front Microbiol [Internet]. 2 de Junho de 2014;5. Disponível em:

http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00258/abstract

[39]. Giagnoni L., Arenella M., Galardi E., Nannipieri P., Renella G. «*Bacterial culturability and the viable but non-culturable (VBNC) state studied by a proteomic approach using an artificial soil*». Soil Biol Biochem [Internet]. Março de 2018;118:51–8. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071717306776

[40]. WEINBERG E.D. «*Selective inhibition of microbial growth by the incorporation of triphenyl tetrazolium chloride in culture media.*» J Bacteriol [Internet]. Agosto de 1953;66(2):240–2. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13084567

[41]. Wirtanen G., Salo S. «*Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants*». Rev Environ Sci Biotechnol [Internet]. 2003;2(2):293–306. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1023/B:RESB.0000040471.15700.03

Anexo A Figuras Ilustrativas

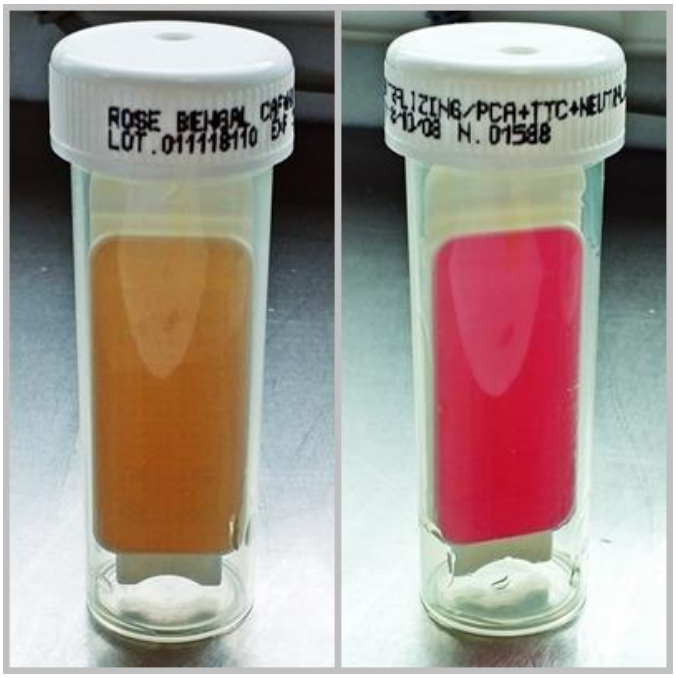


Figura 12 – Placa de contacto *Contact Slide 2* da *Liofilchem*®

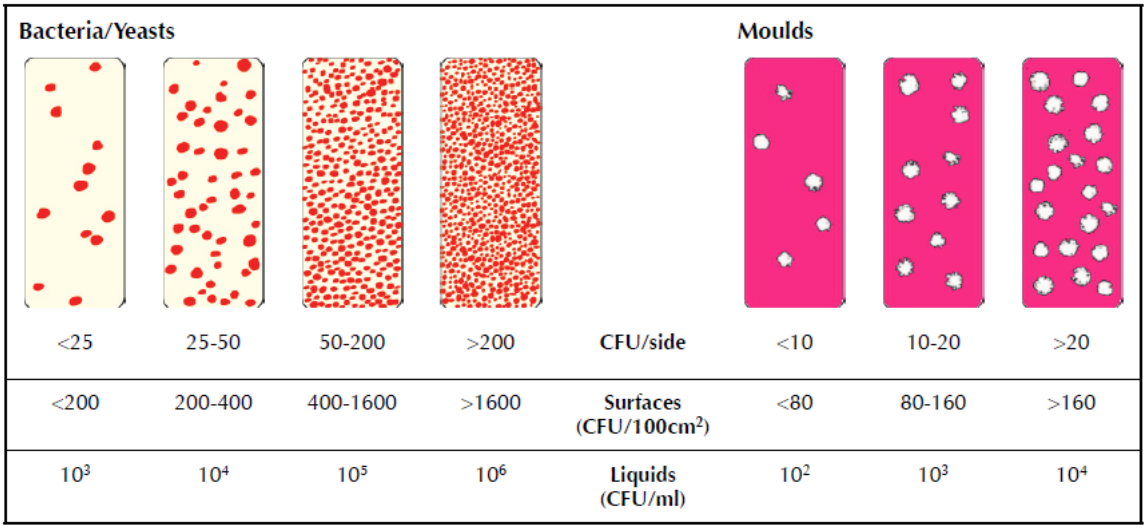


Figura 13 - Escala de unidades fornecida pelo fabricante para as placas de contacto [35]



Figura 14 - Bijou de 7 mL

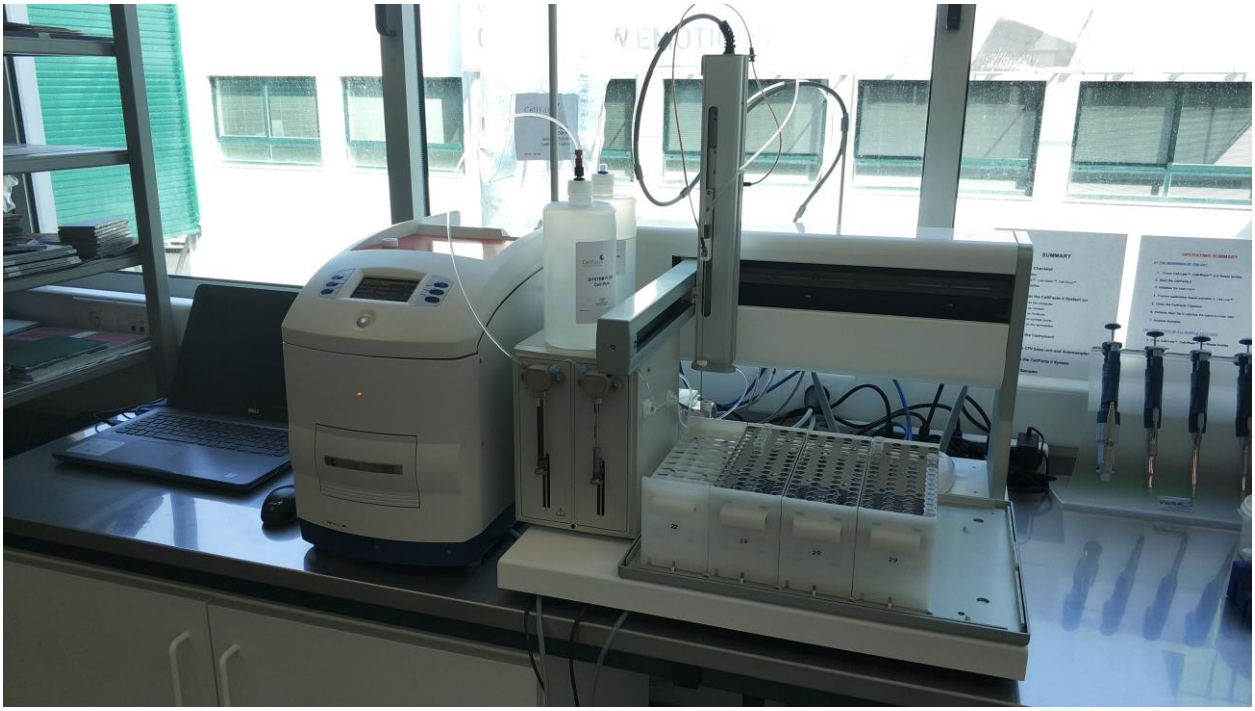


Figura 15 - Equipamento CellFacts II® instalado na Barbot – Indústria de Tintas S.A.



Figura 16 - Espectrofotómetro *Helios Unicam y*

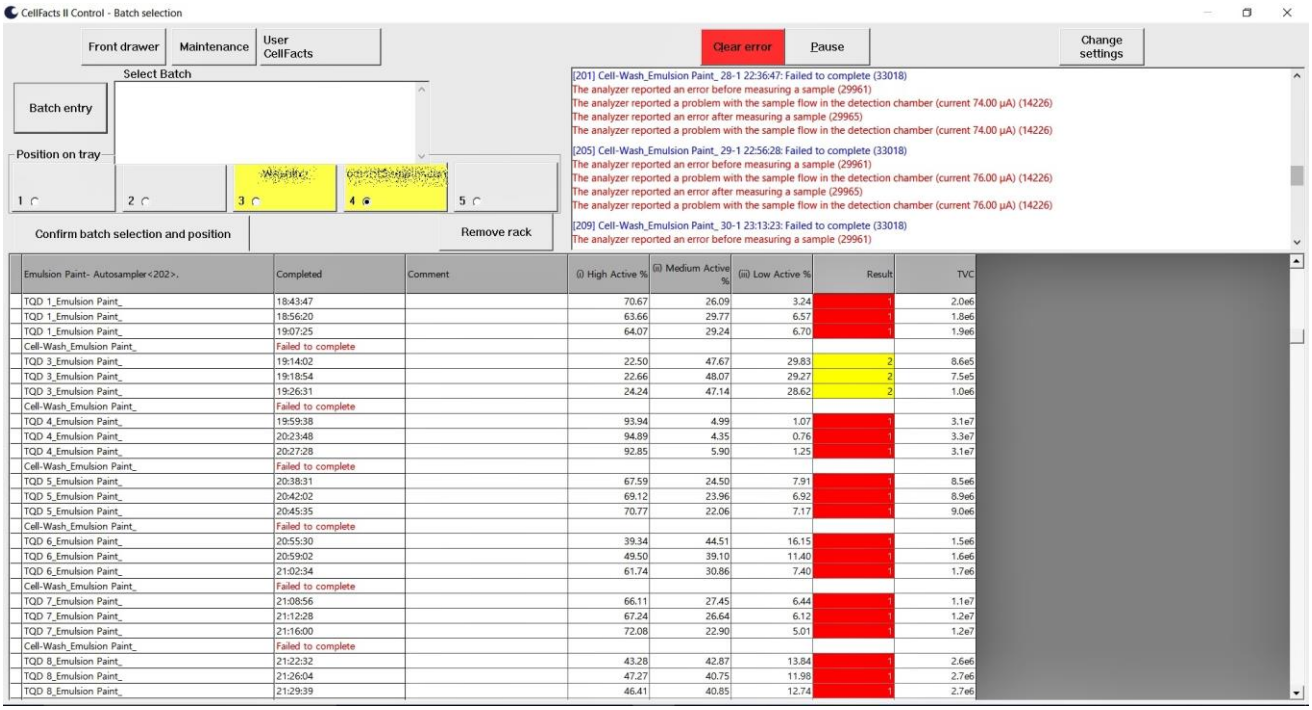


Figura 17 - Agitador *vortex* VWR® Analog Mixer



Figura 18 - Microcentrífuga Micro Star 12

Anexo B Apresentação de resultados no CellFacts II®



Emulsion Paint- Autosampler<202>.	Completed	Comment	High Active %	Medium Active %	Low Active %	Result	TVC
TQD 1_Emulsion Paint_	18:43:47		70.67	26.09	3.24	1	2.0e6
TQD 1_Emulsion Paint_	18:56:20		63.66	29.77	6.57	1	1.8e6
TQD 1_Emulsion Paint_	19:07:25		64.07	29.24	6.70	1	1.9e6
Cell-Wash_Emulsion Paint_	Failed to complete						
TQD 3_Emulsion Paint_	19:14:02		22.50	47.67	29.83	2	8.6e5
TQD 3_Emulsion Paint_	19:18:54		22.66	48.07	29.27	2	7.5e5
TQD 3_Emulsion Paint_	19:26:31		24.24	47.14	28.62	2	1.0e6
Cell-Wash_Emulsion Paint_	Failed to complete						
TQD 4_Emulsion Paint_	19:59:38		93.94	4.99	1.07	1	3.1e7
TQD 4_Emulsion Paint_	20:23:48		94.89	4.35	0.76	1	3.3e7
TQD 4_Emulsion Paint_	20:27:28		92.85	5.90	1.25	1	3.1e7
Cell-Wash_Emulsion Paint_	Failed to complete						
TQD 5_Emulsion Paint_	20:38:31		67.59	24.50	7.91	1	8.5e6
TQD 5_Emulsion Paint_	20:42:02		69.12	23.96	6.92	1	8.9e6
TQD 5_Emulsion Paint_	20:45:35		70.77	22.06	7.17	1	9.0e6
Cell-Wash_Emulsion Paint_	Failed to complete						
TQD 6_Emulsion Paint_	20:55:30		39.34	44.51	16.15	1	1.5e6
TQD 6_Emulsion Paint_	20:59:02		49.50	39.10	11.40	1	1.6e6
TQD 6_Emulsion Paint_	21:02:34		61.74	30.86	7.40	1	1.7e6
Cell-Wash_Emulsion Paint_	Failed to complete						
TQD 7_Emulsion Paint_	21:08:56		66.11	27.45	6.44	1	1.1e7
TQD 7_Emulsion Paint_	21:12:28		67.24	26.64	6.12	1	1.2e7
TQD 7_Emulsion Paint_	21:16:00		72.08	22.90	5.01	1	1.2e7
Cell-Wash_Emulsion Paint_	Failed to complete						
TQD 8_Emulsion Paint_	21:22:32		43.28	42.87	13.84	1	2.6e6
TQD 8_Emulsion Paint_	21:26:04		47.27	40.75	11.98	1	2.7e6
TQD 8_Emulsion Paint_	21:29:39		46.41	40.85	12.74	1	2.7e6

Figura 19 - Exemplo de apresentação de resultados do equipamento CellFacts II®

Legenda Figura 19:

- Amostras: na primeira coluna do ecrã são descritas as amostras, sendo que no topo da coluna é indicado o aplicativo de análise em uso (no caso particular da figura, *Emulsion Paint*)
- Percentagem de atividade: são apresentadas três colunas onde se encontram as percentagens de atividade alta, média e baixa, respetivamente.
- Resultado: na coluna "*Result*" tem-se o sistema ilustrativo tipo "semáforo".
- TVC: na última coluna é apresentada a contagem total de organismos viáveis (TVC) por mL.
- *Failed to complete*: as linhas de tabela com esta indicação, são referentes à solução de limpeza *Cell-Wash*™ introduzida de forma intercalar para prevenção de contaminações cruzadas. A sua análise no equipamento é dada como "falha" por esta não possuir eletrólitos na sua composição.

Anexo C Gráficos 3D

No presente anexo são apresentados os gráficos 3D obtidos através do *software* complementar *CFII 3D View* (*Cellfacts Analytics Ltd., Coventry, UK*) para a avaliação da eficácia dos aditivos biocidas.

Na figura 20 é apresentado o gráfico 3D para a amostra de controlo sem adição de qualquer aditivo biocida.

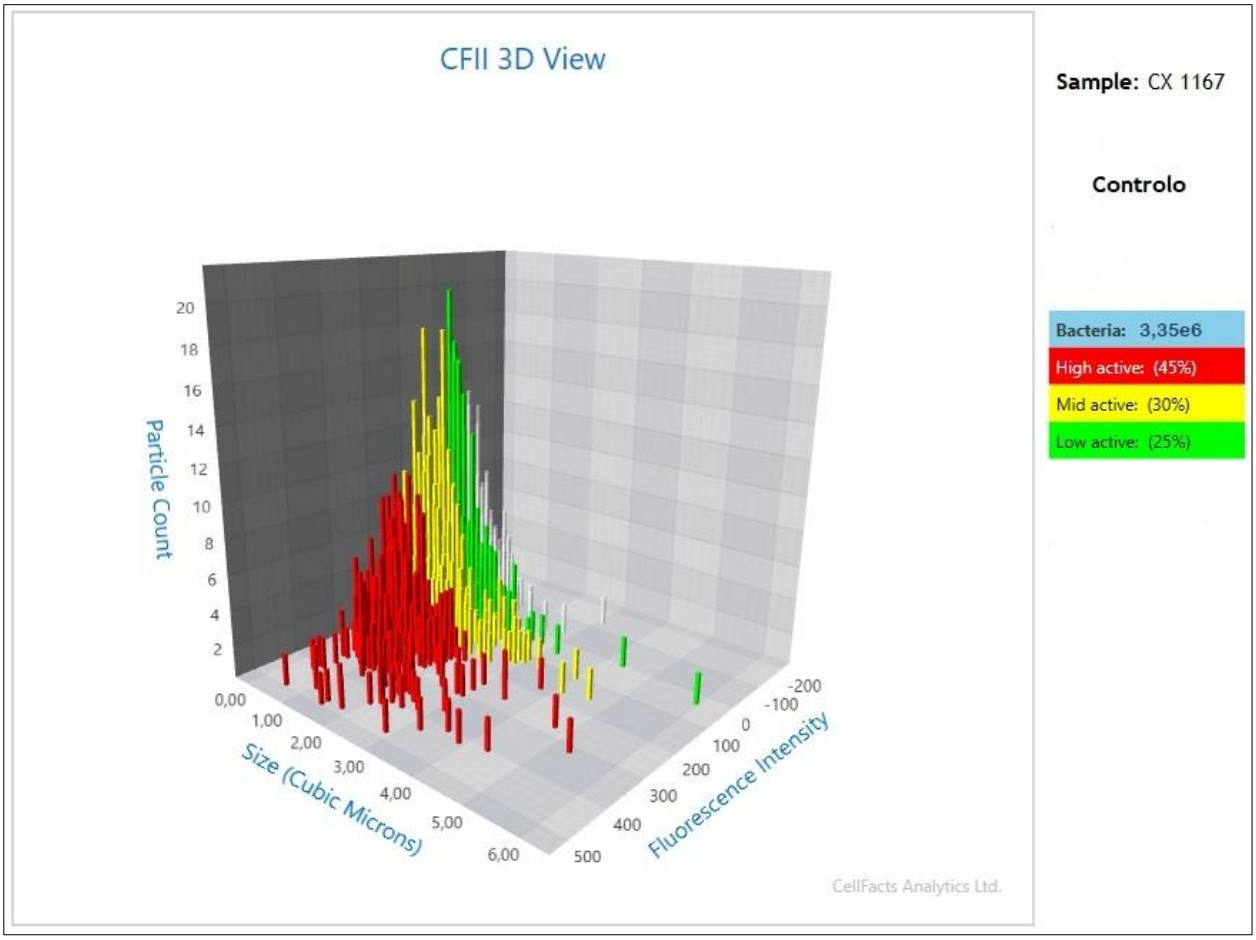


Figura 20 - Gráfico 3D obtido para a amostra de controlo

Nas figuras 21 e 22 encontram-se os gráficos 3D relativos à adição de biocida A nas concentrações de 5 e 10 ppm, respetivamente, testadas num período de 4 horas.

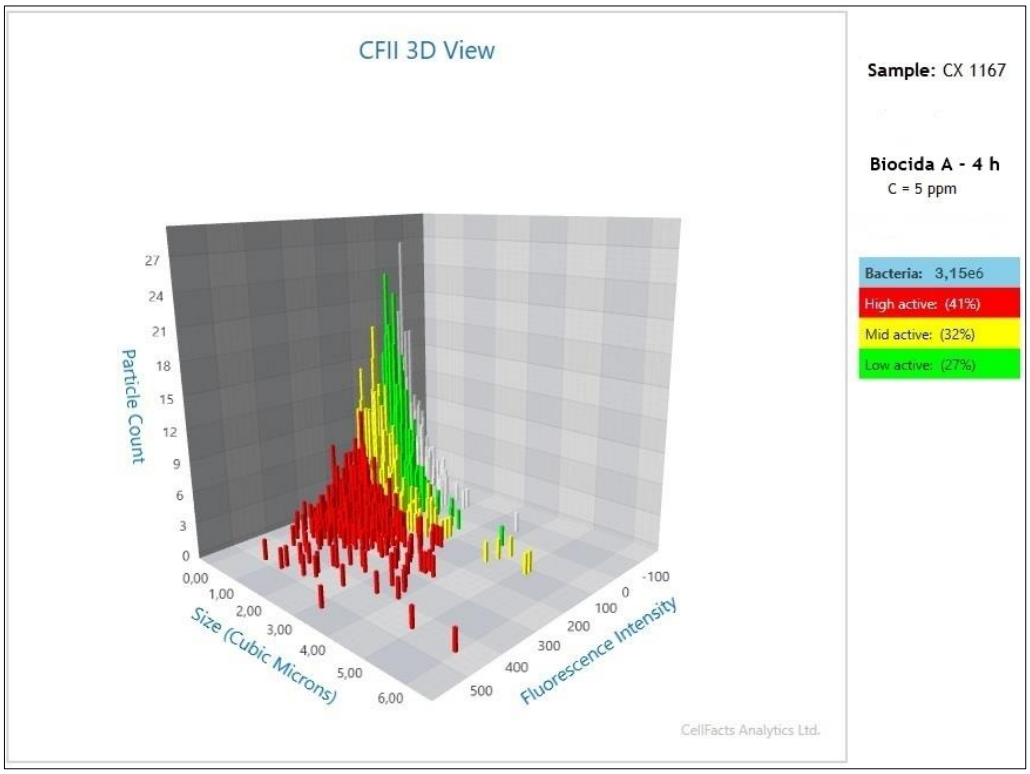


Figura 22 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida A na concentração de 5 ppm

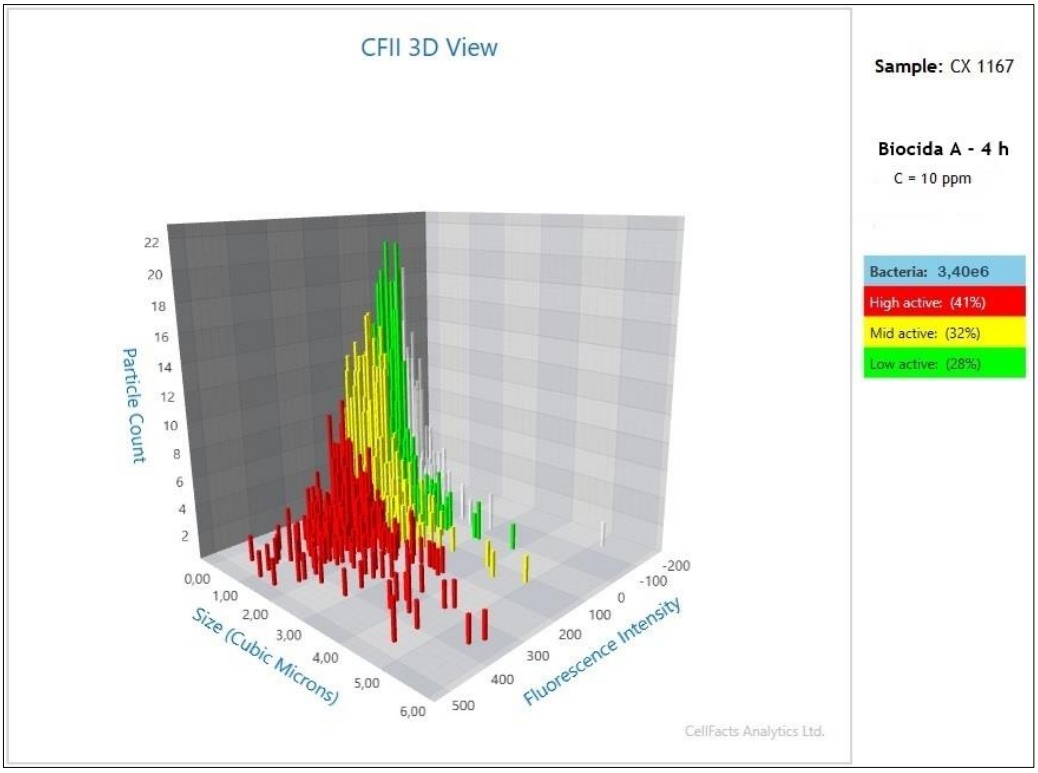


Figura 21 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida A na concentração de 10 ppm

Nas figuras 23 e 24 encontram-se os gráficos 3D relativos à adição de biocida B nas concentrações de 100 e 150 ppm, respetivamente, testadas num período de 4 horas.

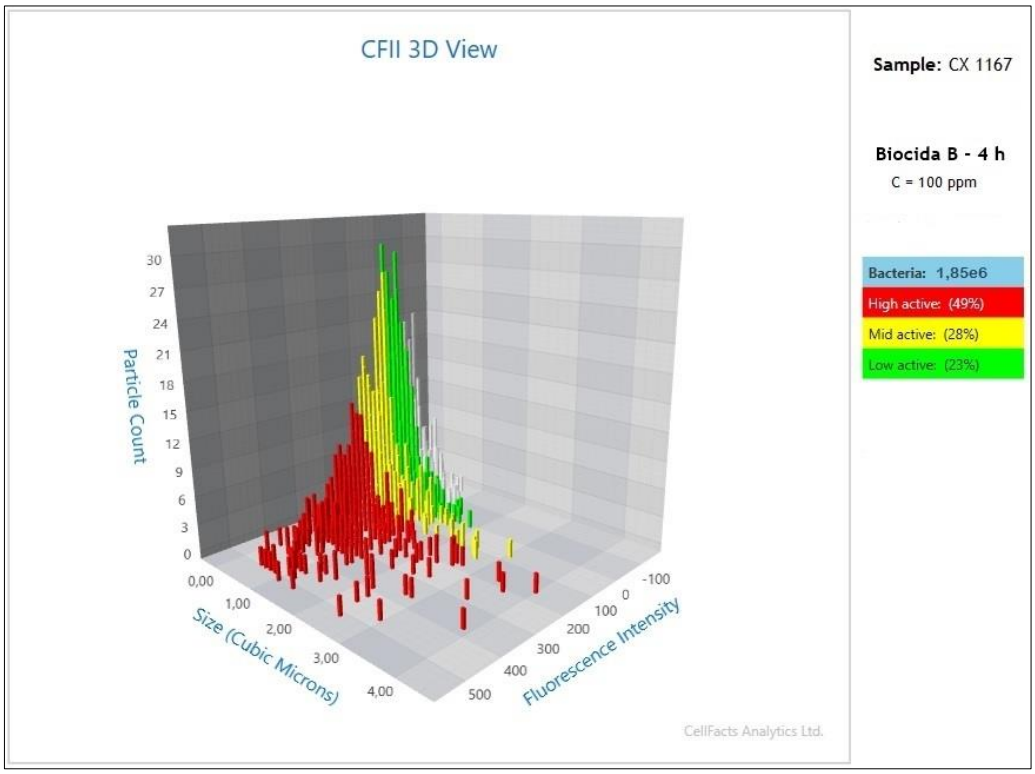


Figura 23 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida B na concentração de 100 ppm

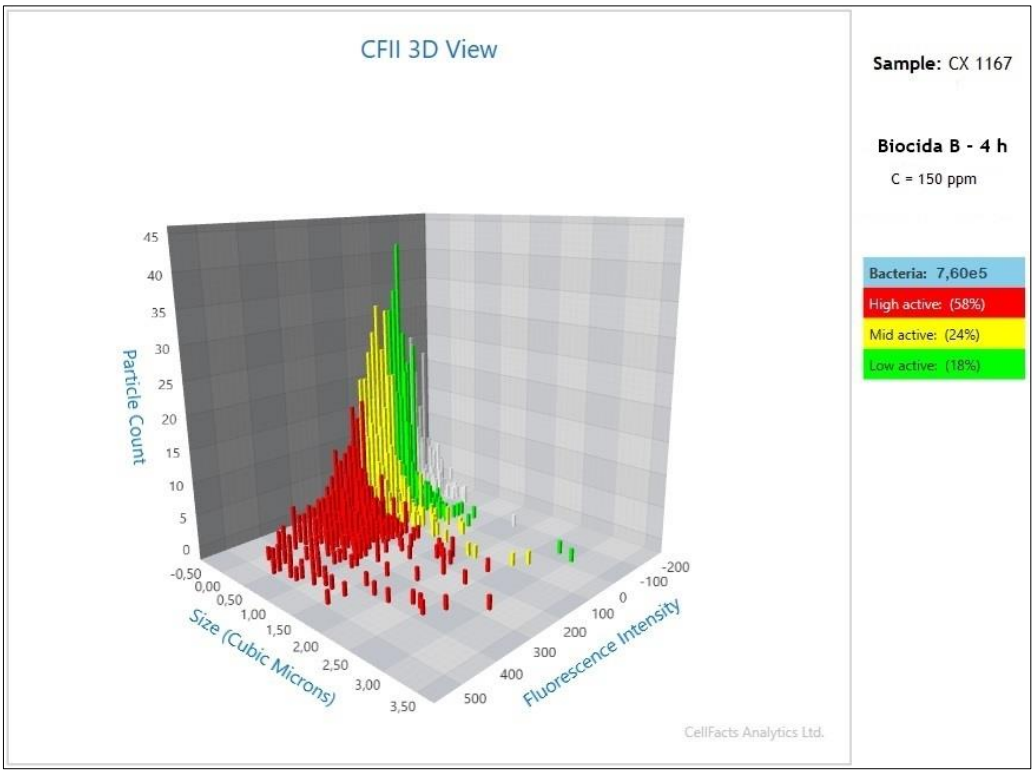


Figura 24 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida B na concentração de 150 ppm

Nas figuras 25 e 26 encontram-se os gráficos 3D relativos à adição de biocida C nas concentrações de 10 e 30 ppm, respetivamente, testadas num período de 4 horas.

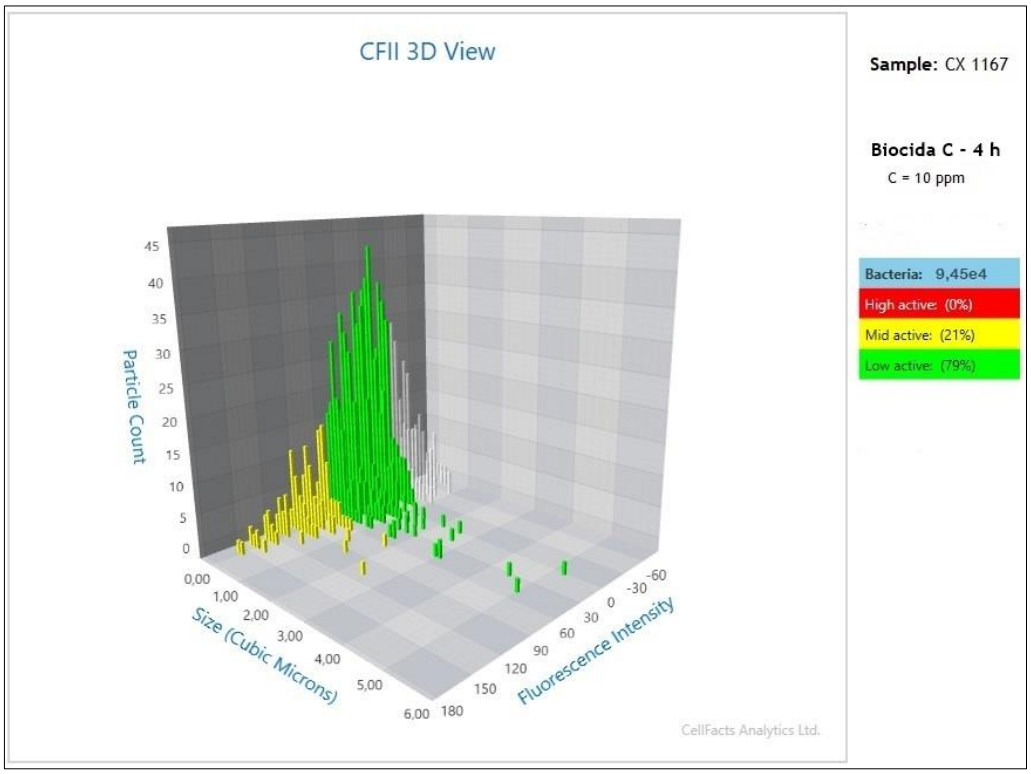


Figura 26 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida C na concentração de 10 ppm

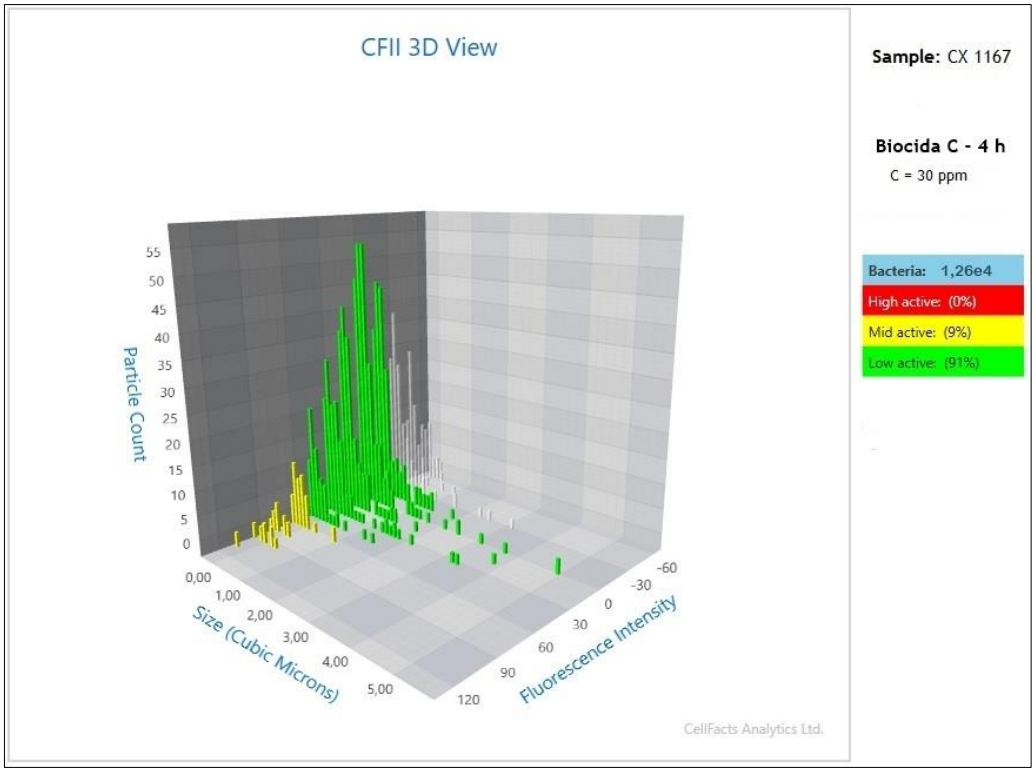


Figura 25 - Gráfico 3D obtido para a amostra com adição de biocida C na concentração de 30 ppm