



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE PÚBLICA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS REFEIÇÕES SERVIDAS E DAS CONDIÇÕES DE
HIGIENE NUMA IPSS**

Trabalho submetido por
Daniela Filipa Macedo Fernandes
para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde Pública

Fevereiro de 2014



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

**MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE
PÚBLICA**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS REFEIÇÕES SERVIDAS E
DAS CONDIÇÕES DE HIGIENE NUMA IPSS**

Trabalho submetido por
Daniela Filipa Macedo Fernandes
para a obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Saúde
Pública

Trabalho orientado por
Mestre Maria Isabel da Silva Santos

e coorientado por
Mestre Carla Maria Heliodoro Maia

Fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

Para que este projeto fosse concretizado, tive o apoio de algumas pessoas, a quem quero manifestar os meus agradecimentos:

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha Orientadora Mestre Isabel Santos. Sem ela, nunca teria conseguido terminar esta Dissertação. É difícil descrever todo o apoio, dedicação e disponibilidade para este trabalho e, por isso, estou-lhe eternamente grata.

À minha Co-Orientadora Mestre Carla Maia, por todo o apoio, disponibilidade e ensinamentos durante todo o estágio no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

Ao pessoal do Laboratório do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pela boa disposição, apoio e disponibilidade demonstrados, em especial à Eng.^a Cristina Correia, que me proporcionou o estágio no INSA, e à Dr.^a Rosália Furtado, por propor sempre boas soluções para qualquer problema que surgisse.

Ao Prof. Mauro Bragança, pela preciosa ajuda na análise estatística dos dados.

Ao pessoal da Santa Casa da Misericórdia de Santiago do Cacém, pela amizade e disponibilidade demonstradas durante todo o processo da colheita de dados e por terem aceitado participar neste estudo.

À Unidade de Patogenicidade do INSA, por se terem disponibilizado a analisar as minhas amostras.

Finalmente, a todos os meus amigos e familiares, pela força e apoio que me deram, ao longo destes anos, e pela paciência de me ouvirem, durante todo este tempo, sempre a falar do meu trabalho, e, em especial, à minha mãe, pelo seu apoio incondicional e permanente incentivo para que terminasse a Tese.

Obrigado a Todos por Tudo!!

RESUMO

As mudanças que têm ocorrido na sociedade, como a crescente urbanização e globalização da distribuição de alimentos, conduziram a hábitos sociais e alimentares completamente diferentes. As crianças e os idosos já não podem ser cuidados pelo núcleo familiar recorrendo-se habitualmente a creches e lares onde são consumidas algumas refeições. Estes novos hábitos conduziram ao aumento do número de doenças de origem alimentar. Entre os estabelecimentos que acolhem os grupos etários referidos, grupos de risco para este tipo de doença, encontram-se as Instituições Particulares de Solidariedade Social (IPSS). Assim, este trabalho teve como principais objetivos avaliar, numa Creche e Jardim de Infância (CJI), numa Unidade de Cuidados Continuados (UCC) e num Lar de Idosos (LI) de uma IPSS, a qualidade microbiológica dos pratos cozinhados, os conhecimentos em higiene e segurança alimentar (HSA) dos colaboradores e as condições de higiene das unidades bem como o grau de implementação dos pré-requisitos.

Foram ensaiadas 90 amostras de pratos confeccionados, tendo sido avaliados os parâmetros: microrganismos a 30 °C, fungos, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, estafilococos coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Obteve-se uma mediana para microrganismos a 30 °C de 3,42, enquanto para *Enterobacteriaceae* a mediana foi de 1,30. Verificou-se que os níveis de contagem mais elevados se encontraram no LI e no caso de *Enterobacteriaceae* a diferença é significativa ($p < 0,05$). Todas as amostras se revelaram negativas para *Salmonella*, *L. monocytogenes* e *C. perfringens*. Foi detetado *E. coli* (2,2%), estafilococos coagulase positiva (1,1%) e *B. cereus* (1,1%) em algumas amostras mas em níveis baixos. Verificou-se que 28,9 % das amostras obtiveram resultado Não Satisfatório, o que pode indicar algumas lacunas na HSA. Relativamente aos conhecimentos em HSA dos manipuladores verificou-se que existem algumas deficiências. No que se refere às instalações, a média das respostas positivas da cozinha da CJI é de 86,2 %, da cozinha de UCC é de 71,2% e da cozinha de LI é de 65,6%.

Os resultados indicam que as amostras analisadas não representam um risco para a saúde, mas as condições de pré-requisitos para o LI precisam ser melhoradas assim como os conhecimentos em HSA por parte dos manipuladores.

Palavras-chave: Grupos de risco, doenças com origem alimentar, higiene e segurança alimentar, grau de implementação dos pré-requisitos.

ABSTRACT

The changes that have occurred in society, such as increasing urbanization and globalization of food distribution, led to completely different social and eating habits. Children and the elderly can no longer be cared for by family nucleus and normally, people resort to kindergartens and homes where some meals are consumed. These new habits have led to an increase in the number of foodborne illnesses. Among the establishments that host these age groups, high risk groups for this type of illness are the Private Institutions of Social Solidarity (IPSS). So, this work had as main objectives to evaluate, in a Nursery and Kindergarten (CJI), in a Continuing Care Unit (CCU) and in a Home for the Elderly (LI) of a IPSS, the microbiological quality of cooked dishes, the knowledge hygiene and food safety (HSA) of employees and the hygiene of the units and the degree of implementation of prerequisites.

90 samples of prepared dishes were evaluated for the following parameters: Microorganisms at 30°C, fungi, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, coagulase positive staphylococci, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. The median obtained for microorganisms at 30 ° C was 3.42, while for *Enterobacteriaceae* the median was 1.30. It was verified that the higher levels found were at LI and, in the case of the *Enterobacteriaceae*, the difference was significant ($p < 0.05$). All samples have proved negative for *Salmonella*, *L. monocytogenes* and *C. perfringens*. It was detected *E. coli* (2.2%), coagulase-positive staphylococci (1.1%) and *B. cereus* (1.1%) in some samples but at low levels. It was found that 28.9% of the samples had unsatisfactory result, which may indicate some gaps in the HSA. Regarding the knowledge of the manipulators in HSA was found that there are some shortcomings. With regard to facilities, the average of the positive responses of the CJI cooking is 86.2%, the kitchen UCC is 71.2% and the kitchen LI is 65.6%.

The results indicate that the samples do not pose a health risk, but the conditions of prerequisite for LI need improvement as well as the knowledge in HSA by the handlers.

Keywords: Risk groups, foodborne diseases, food hygiene and safety, degree of implementation of the prerequisites.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
I. INTRODUÇÃO	13
1. ENQUADRAMENTO TEÓRICO E RECONHECIMENTO DO PROBLEMA.....	13
2. SEGURANÇA ALIMENTAR	16
3. BOAS PRÁTICAS E PRÉ-REQUISITOS AO SISTEMA DE ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLO	17
4. SISTEMA DE ANÁLISE DE PERIGOS E PONTOS CRÍTICO DE CONTROLO (HACCP) ...	20
5. DOENÇAS DE ORIGEM ALIMENTAR	23
5.1. <i>Consequências das Doenças de Origem Alimentar</i>	25
5.2. <i>Fatores associados à ocorrência de Doenças de Origem Alimentar</i>	25
5.3. <i>Grupos de alto risco</i>	26
5.3.1. <i>Doenças de Origem Alimentar em Idosos</i>	26
5.3.2. <i>Doenças de Origem Alimentar em Crianças</i>	27
5.4. <i>Incidência das Doenças de Origem Alimentar na Europa</i>	28
5.5. <i>Incidência das Doenças de Origem Alimentar em Portugal</i>	29
5.6. <i>Programas de Vigilância</i>	30
6. MICROBIOLOGIA ALIMENTAR	31
6.1. <i>Microrganismos Patogénicos</i>	31
6.1.1. <i>Salmonella spp.</i>	31
6.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	33
6.1.3. <i>Bacillus cereus</i>	35
6.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	37
6.1.5. <i>Clostridium perfringens</i>	38
6.1.6. <i>Escherichia coli</i>	39
6.2. <i>Microrganismos Indicadores de Qualidade e Higiene Alimentar</i>	43

6.2.1. Microrganismos Aeróbios Mesófilos.....	43
6.2.2. Fungos.....	44
6.2.3. Bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i>	44
6.2.4. <i>Escherichia coli</i>	45
7. CRITÉRIOS MICROBIOLÓGICOS APLICÁVEIS AOS PRATOS CONFECIONADOS	45
8. OBJETIVOS	46
II. MATERIAIS E MÉTODOS	48
1. MATERIAIS.....	48
1.1. Amostras Analisadas	48
1.2. Diluentes Utilizados.....	48
1.3. Meios de Cultura e Reagentes Utilizados.....	48
1.3.1. Contagem de Microrganismos a 30 °C	48
1.3.2. Contagem de Fungos.....	49
1.3.3. Contagem e Confirmação Bioquímica de <i>Enterobacteriaceae</i>	49
1.3.4. Contagem de <i>Escherichia coli</i>	50
1.3.5. Contagem e Confirmação Bioquímica de <i>Clostridium perfringens</i>	51
1.3.6. Contagem e Confirmação Bioquímica de Estafilococos coagulase positiva.....	52
1.3.7. Contagem e Confirmação Bioquímica de <i>Bacillus cereus</i>	53
1.3.8. Contagem e Confirmação Bioquímica de <i>Listeria monocytogenes</i>	54
1.3.9. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	54
1.4. Avaliação dos conhecimentos em Higiene e Segurança Alimentar	57
1.5. Avaliação das Condições de Higiene e dos Pré-Requisitos nas Unidades de Restauração	57
2. MÉTODOS	58
2.1. Receção e armazenamento das amostras no laboratório.....	58
2.2. Colheita e diluição das tomas de amostras	58
2.2.1. Preparação das diluições decimais.....	59
2.3. Contagem e Pesquisa dos Microrganismos em Estudo	59
2.4. Avaliação dos Conhecimentos em Higiene e Segurança Alimentar	60
2.4.1. População em estudo e Recolha de dados.....	60
2.5. Avaliação das Condições de Higiene e dos Pré-requisitos das Unidades de Restauração	61

2.6.	<i>Análise Estatística</i>	63
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
1.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	64
1.1.	<i>Microrganismos Indicadores de Qualidade e Higiene Alimentar</i>	64
1.2.	<i>Microrganismos Patogénicos.....</i>	69
1.3.	<i>Classificação das amostras perante os Critérios Microbiológicos</i>	70
2.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DO QUESTIONÁRIO SOBRE HIGIENE E SEGURANÇA ALIMENTAR.....	73
2.1.	<i>Características Sociodemográficas e Formação</i>	73
2.2.	<i>Conhecimentos em Higiene e Segurança Alimentar</i>	74
2.2.1.	Conhecimento do que é um microrganismo.....	74
2.2.2.	Conhecimento do que é o Sistema HACCP	75
2.2.3.	Conhecimento dos agentes patogénicos.....	76
2.2.4.	Conhecimento das temperaturas de refrigeração e congelação	78
2.2.5.	Conhecimento dos grupos de risco	80
2.2.6.	Outros aspetos relacionados com Higiene e Segurança Alimentar	82
2.2.7.	Relação entre o número de formações e a idade dos funcionários.....	83
3.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIGIENE E PRÉ-REQUISITOS.....	83
3.1.	<i>Cozinhas da Creche e Jardim de Infância, Unidade de Cuidados Continuados e Lar de Idosos</i>	83
IV.	CONCLUSÃO.....	87
V.	BIBLIOGRAFIA.....	89
ANEXOS		101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciação de perigos não significativos e significativos, e decisão sobre o respetivo controlo, através de pré-requisitos (Bolton & Maunsell, 2004)	18
Figura 2. Colónias características de Microrganismos a 30 °C em meio PCA (Fonte: Daniela Fernandes).....	49
Figura 3. Colónias características de leveduras e bolores em meio DRBC (Fonte: Daniela Fernandes).....	49
Figura 4. Colónias características de Enterobacteriaceae em meio VRBG (Fonte: Daniela Fernandes).....	50
Figura 5. Colónia característica de <i>Escherichia coli</i> em meio TBX (Fonte: Daniela Fernandes).....	51
Figura 6. Colónias características de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio BP (Fonte: Daniela Fernandes).....	53
Figura 7. Formação de um coágulo no Plasma de Coelho (Fonte: Daniela Fernandes) .	53
Figura 8. Colónia característica de <i>B. cereus</i> (Fonte: Daniela Fernandes)	54
Figura 9. Hemólise de <i>B. cereus</i> no meio COS (Fonte: Daniela Fernandes)	54
Figura 10. Aparelho mini-VIDAS	57
Figura 11. API 20E para a identificação de <i>Salmonella</i> spp. (Fonte: Daniela Fernandes)	57
Figura 12. Diluidor automático com balança (Fonte: Daniela Fernandes)	59
Figura 13. Stomacher (Fonte: Daniela Fernandes)	59
Figura 14. Esquema de preparação das diluições decimais (Fonte: Daniela Fernandes)	59
Figura 15. Histograma de Microrganismos Mesófilos (Log).....	65
Figura 16. Histograma de Enterobacteriaceae (log).	65
Figura 17. Histograma de Microrganismos Mesófilos (Log) sem outliers (zeros).....	66
Figura 18. Histograma de Enterobacteriaceae (log) sem outliers (zeros).	66
Figura 19. Histograma de Microrganismos Mesófilos (Log) nas diferentes cozinhas. ..	66
Figura 20. Histograma de Enterobacteriaceae (Log) nas diferentes cozinhas.....	66
Figura 21. Relação entre a presença de Microrganismos Mesófilos e Enterobacteriaceae.	68
Figura 22. Distribuição das amostras por cozinha e por resultado de qualidade microbiológica.	71
Figura 23. Resultados das condições de higiene e pré-requisitos na cozinha da CJI.	85

Figura 24. Resultados das condições de higiene e pré-requisitos na cozinha da UCC...	86
Figura 25. Resultados das condições de higiene e pré-requisitos na cozinha do LI.....	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Pré-Requisitos do Sistema HACCP.....	18
Tabela 2. Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer (Fonte: Santos <i>et al.</i> , 2005).....	47
Tabela 3. Resumo dos métodos utilizados na contagem dos microrganismos em estudo.	60
Tabela 4. Resumo do método utilizados na pesquisa da <i>Salmonella</i>	60
Tabela 5. Resumo dos testes de confirmação bioquímica de alguns microrganismos em estudo.....	62
Tabela 6. Distribuição do nº de amostras do Grupo 1 e 2 (Valores Guia INSA) pelas diferentes cozinhas	64
Tabela 7. Contagem de M30 e de ENT nas diferentes cozinhas.	65
Tabela 8. Níveis detectados de Microrganismos Mesófilos e Enterobacteriaceae.....	67
Tabela 9. Resultados da ocorrência de microrganismos patogénicos.....	69
Tabela 10. Frequência e percentagem das amostras segundo a qualificação de acordo com os Valores Guia do INSA.....	70
Tabela 11. Percentagem de conformidade dos alimentos cozinhados prontos a comer para os critérios microbiológicos de referência (parte 1).	72
Tabela 12. Percentagem de conformidade dos alimentos cozinhados prontos a comer para os critérios microbiológicos de referência (parte 2).	72

LISTA DE ABREVIATURAS

ASAE:	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
a _w :	Atividade da água
BCIG:	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico
BHI:	Caldo <i>Brain Heart Infusion</i>
BP:	<i>Baird Parker Agar</i>
BPH:	Boas Práticas de Higiene
BPL:	Boas Práticas de Laboratório
BPW:	<i>Buffered Peptona Water</i>
CDC:	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CJI:	Creche e Jardim de Infância
COS:	<i>Columbia Agar + 5% Sheep Blood</i>
CPE:	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxina
DAEC:	Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Difusamente Aderente
DAN:	Departamento de Alimentação e Nutrição
DECO:	Associação Portuguesa para a Defesa do Consumidor
DOA:	Doença de Origem Alimentar
DRBC:	<i>Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar</i>
EAEC:	Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enteroagregativo
EFSA:	<i>European Food Safety Authority</i>
EHEC:	Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enterohemorrágico
EIEC:	Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enteroinvasivo
ELFA:	<i>Enzyme Linked Fluorescent Assay</i>
EM:	Estado membro
EPEC:	Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enteropatogénico
ETEC:	Grupo Patogénico de <i>Escherichia coli</i> – Enterotoxigénico
UE:	União Europeia
EUA:	Estados Unidos da América
FAO:	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
HACCP:	<i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i>
HE:	<i>Hektoen Enteric Agar</i>

HSA:	Higiene e Segurança Alimentar
HUS:	Síndrome hemolítico-urémico
INSA:	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IPSS:	Instituição Particular de Solidariedade Social
ISO:	<i>International Organization for Standardization</i>
KFDA:	<i>Korea Food and Drug Administration</i>
LI:	Lar de Idosos
LS:	Caldo <i>Lactose Sulfite</i>
MKTTn:	Caldo <i>Muller-Kauffmann</i>
NASA:	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
NP:	Norma Portuguesa
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PCA:	<i>Standard Methods Agar</i>
PCC:	Ponto Crítico de Controlo
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RVS:	Caldo Rappaport Vassiliadis Soja
TBX:	<i>Tryptone Bile X-Glucuronide</i>
TS:	Triptona salina
TSA:	Agar tripticase soja
TSC:	<i>Tryptone Sulfite Cycloserine Agar</i>
TSI:	<i>Triple Sugar Iron agar</i>
UCC:	Unidade de Cuidados Continuados
VRBG:	<i>Violet Red Bile Glucose Agar</i>
VTEC:	Grupo patogénico de <i>Escherichia coli</i> – produtor de toxinas vero
XLD:	<i>Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar</i>
WHO:	<i>World Health Organization</i>

I. INTRODUÇÃO

1. Enquadramento Teórico e Reconhecimento do Problema

As alterações observadas nas sociedades modernas, nomeadamente a nível económico, social, demográfico, cultural e alimentar, assim como a evolução nas áreas científica e tecnológica, apresentam uma influência marcante na qualidade e na segurança alimentar, quer seja através da avaliação científica dos riscos, como também pela perceção pública dos mesmos (Santos & Cunha, 2007).

Assim, estas mudanças que têm ocorrido na sociedade, relacionadas com a crescente urbanização e globalização da produção e distribuição de géneros alimentícios, conduziram a hábitos alimentares completamente diferentes. Anteriormente os alimentos consumidos eram de produção local e o tempo decorrido entre a produção e o consumo bastante curto apresentando estes, por consequência, baixo risco de contaminação. Contudo, ocorreu uma evolução muito rápida na ciência e tecnologia de produção, processamento e distribuição de alimentos. Estes desenvolvimentos permitiram a disponibilidade de uma grande variedade de alimentos e a introdução de novos ingredientes, novos sabores e mais segurança, mas também trouxeram algumas preocupações, verificando-se um aumento do número de doenças de origem alimentar (DOA) na segunda metade do século XX (Santos & Cunha, 2007). As DOA causadas pela ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogénicos e/ou suas toxinas, constituem um dos maiores problemas em Saúde Pública e Segurança Alimentar, tanto em países desenvolvidos como em vias de desenvolvimento (World Health Organization, 2012).

A população tem cada vez menos tempo para preparar as suas refeições e, deste modo, verifica-se que a alimentação coletiva é uma consequência inevitável da vida moderna. Com estas modificações as entidades reguladoras, empresas de restauração, indústrias e profissionais de saúde, estão perante novos desafios resultante de novos perigos que surgem como resultado destas novas formas de produção (Barros, 2008). Assim, nos últimos anos, tem sido reconhecido o papel cada vez mais predominante da restauração na incidência de DOA (European Food Safety Authority, 2012). Os consumidores constituem um grupo muito diversificado com graus diversos de sensibilidade à doença e diferentes estilos de vida o que dificulta a produção de alimentos seguros (Forsythe, 2010).

Como consequência, facilmente se compreende que a preparação de alimentos seguros adquire importância especial em cantinas, nomeadamente de Instituições Particulares de Solidariedade Social (IPSS), pois algum incidente que ocorra nas fases de preparação, confeção e distribuição de alimentos, pode afetar um número elevado de consumidores, a grande maioria crianças e idosos, que em termos de segurança alimentar, são considerados grupos de risco por apresentarem risco acrescido de contrair DOA (Barros, 2008; Carvalheiro & Rocha, 2008).

Existe uma necessidade e obrigação legais de produzir alimentos seguros a esta população alvo, portanto é imprescindível a implementação de sistemas de segurança alimentar eficazes ao longo de toda a cadeia de produção e distribuição, nomeadamente, sistemas baseados nos princípios e metodologia *Hazard Analysis and Critical Control Points* – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP) (Carvalheiro & Rocha, 2008). Segundo Barros (2008) o desconhecimento das Boas Práticas de Higiene alimentar (BPH) ou situações de negligência por parte dos manipuladores de alimentos ou outro interveniente na cadeia alimentar, pode levar à sua contaminação e consequentemente, à ocorrência de DOA.

Um resultado combinado de estatísticas dos EUA, Reino Unido e Holanda indicam que até 70% das DOA foram associadas à restauração, o que mostra a importância da segurança alimentar nos serviços de alimentação das IPSS (Veiros, Proença, Santos, Kent-Smith & Rocha, 2009). Outro estudo realizado em 2005 pela *Korea Food and Drug Administration* (KFDA), revela que 72 % das DOA do ano anterior ocorreram em serviços de alimentação na restauração coletiva e que a maior parte destas foram causadas pelo consumo de alimentos contaminados com *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, e norovírus (Yoon et al., 2008). Na Europa, segundo o último relatório publicado pela *European Food Safety Authority* (EFSA), os agentes responsáveis por DOA mais frequentes são *Salmonella*, toxinas bacterianas e *Campylobacter*. Os principais alimentos implicados foram os ovos e ovoprodutos e refeições mistas, e os principais locais onde ocorreram DOA foram restaurantes e cozinhas domésticas (EFSA, 2013).

Procedimentos de Higiene e Segurança Alimentar (HSA) e de educação das pessoas envolvidas na preparação, processamento e serviço de refeições são linhas fundamentais na prevenção de grande parte das DOA, principalmente daquelas em que o agente infeccioso pode ser transferido para o alimento diretamente ou por

contaminação cruzada. As Listas de Verificação (*Checklists*) podem representar uma ferramenta útil para controlar os procedimentos e são usadas para as auditorias contínuas como forma de verificar um sistema HACCP e exigem a mesma atenção que o desenvolvimento inicial de um plano HACCP. Assim, o responsável pelo serviço de alimentação pode recorrer às *checklists* para verificar periodicamente as BPH e os procedimentos de rotina (Veiros, Proença, Santos, Kent-Smith & Rocha, 2009).

A Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) desenvolveu uma das *checklists* oficiais portuguesas para a avaliação das práticas sanitárias e de higiene (ASAE, 2007). Esta é uma lista abrangente, composta de 30 páginas, utilizada nas inspeções oficiais do sector da restauração. Outra lista oficial foi desenvolvida pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), para uso em unidades de restauração coletiva, a qual inclui referências à legislação vigente (Amorim, 2006).

Os manipuladores de alimentos têm um papel importante na prevenção de DOA durante a produção e distribuição de alimentos, podendo estar envolvidos na contaminação de alimentos crus ou processados (contaminação cruzada), bem como em práticas inadequadas de cozinhar e armazenar alimentos. De igual modo podem ser portadores assintomáticos de microrganismos responsáveis por DOA (Walker, Pritchard & Forsythe 2003).

As DOA têm sido associadas com o reaquecimento inadequado (50%), alimentos armazenados de forma inadequada (45%) e contaminação cruzada (39%) (Walker et al., 2003). O *Food Code* elaborado pela *Food and Drug Administration* (Food and Drug Administration, 2013), indica que os principais fatores de risco de DOA são, os alimentos provenientes de fontes inseguras, tratamento térmico inadequado, temperatura de manutenção inadequada, equipamentos contaminados e má higiene pessoal.

Face ao exposto, facilmente se compreende que a formação e educação são essenciais para garantir que os manipuladores de alimentos tenham consciência e o conhecimento necessários para cumprir as exigências de higiene, embora nem sempre resulte numa mudança positiva no comportamento. A necessidade de formação dos manipuladores de alimentos é uma parte essencial do conceito HACCP e é assim reconhecida pela legislação da União Europeia (UE), como explicitado no Regulamento (CE) 852/2004 e por organizações internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2006a). Com efeito, estudos recentes têm sugerido que o nível de conhecimentos, atitudes e práticas dos manipuladores de alimentos precisam ser

melhorados (Walker et al., 2003; Barros, 2008; Santos, Nogueira, Patarata & Mayan, 2008).

O problema da falta de conhecimentos sobre HSA resolve-se, realizando formações profissionais para as pessoas envolvidas. De um modo geral, estas formações são pouco frequentes e muitas vezes destinam-se apenas a dar cumprimento aos planos de formação e não à aquisição de competências (Barros, 2008).

A Associação Portuguesa para a Defesa do Consumidor (DECO) fez uma investigação a cozinhas de 20 lares de idosos de Lisboa e Porto e concluiu que sal a mais, saladas mal lavadas, desequilíbrio nutricional nas refeições e falhas de higiene eram problemas comuns. Adicionalmente foram apontados outros pontos de incumprimento nomeadamente lixo a céu aberto, boas práticas esquecidas, falta de plano de limpeza e desinfeção, alimentos em locais incorretos e pouca formação. O estudo refere que as instituições devem ser mais cuidadosas, sobretudo por se tratar de um grupo etário avançado, mais vulnerável em caso de DOA. (DECO, 2009).

2. Segurança Alimentar

O tema HSA assume atualmente um papel primordial perante uma sociedade mais interessada e conhecedora (Gonçalves, 2009). Apesar dos esforços das entidades governamentais em melhorar a segurança na cadeia alimentar, as DOA continuam a ser um problema significativo em Saúde Pública, estimando-se que, por ano, 1,8 milhões de pessoas morram devido a doenças diarreicas, que em muitos casos é devido a alimentos ou água contaminados (OMS, 2006a).

O *Codex Alimentarius* define “Segurança Alimentar” como sendo a garantia de que os alimentos não provocarão danos ao consumidor quando são preparados ou consumidos de acordo com o uso a que se destinam (Codex Alimentarius Commission, 2003). No entanto, facilmente se compreende que é possível ocorrer uma contaminação biológica, química ou física durante a produção primária, colheita, transformação, preparação, transporte, distribuição, armazenamento, exposição e venda de um alimento (Duarte, 2010).

Num plano de segurança alimentar consideram-se as contaminações microbiológicas como os perigos mais significativos, sendo a sua avaliação um pouco complexa. Estima-se que cerca de 90-95% das DOA são devidas aos alimentos preparados em casa, restaurantes, cantinas escolares, hospitais, lares de 3ª idade e

somente 5-10% dos casos correspondem a produtos alimentares fabricados na indústria. (Bolton & Maunsell, 2004; Moll & Moll, 2006; Viegas, 2009).

Reconhece-se que não existe risco zero e que não é possível reduzir a totalidade dos perigos de todos os alimentos, apesar das precauções sugeridas pela *Food and Agriculture Organization* da Organização Mundial de Saúde (FAO/OMS). No entanto, as empresas e indústrias alimentares devem identificar os perigos que têm o maior impacto na Saúde Pública e implementar programas preventivos, como o sistema HACCP, ferramenta essencial para avaliar perigos e estabelecer medidas para o seu controlo, ou normas ISO para reduzir o nível de risco ao mínimo que é prático, tecnologicamente viável e socialmente aceitável (Lammerding & Todd, 2006; Moll & Moll, 2006; Novais, 2006; Forsythe, 2010).

3. Boas Práticas e Pré-Requisitos ao Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo

As medidas básicas de higiene ou BPH, devem ser implementadas previamente à aplicação de um plano HACCP, para que o sistema se foque nas etapas, práticas ou procedimentos que são pontos críticos para a segurança dos alimentos processados ou preparados num determinado local. Estas medidas constituem o suporte para a implementação de um sistema HACCP e são denominadas, no seu conjunto, Pré-requisitos (Bolton & Maunsell, 2004; Novais, 2006; Pereira, 2009). Pretende-se com a aplicação destes assegurar a prevenção, eliminação ou redução dos perigos alimentares a um nível aceitável e, de um modo geral, permitem controlar os perigos associados com a envolvente à unidade de restauração, enquanto o objetivo do sistema HACCP é controlar os perigos associados diretamente com o processo (Bolton & Maunsell, 2004; Novais, 2006). É o que se expressa na Figura 1, aplicado a uma unidade de restauração.

São considerados pré-requisitos HACCP: Instalações e equipamento, Transporte, Requisitos relativos aos géneros alimentícios (inclui controlo de fornecedores e manutenção da cadeia do frio), Rastreabilidade, Controlo de resíduos, Controlo de pragas, Limpeza e desinfeção, Qualidade da água, Saúde e higiene do pessoal e Formação, e são aqui apresentados em seguida de forma sumária, como mostra a Tabela 1 (CAC, 2003).

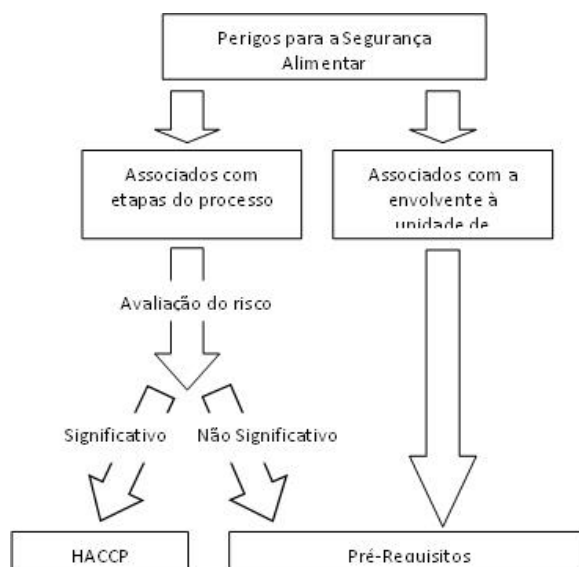


Figura 1. Diferenciação de perigos não significativos e significativos, e decisão sobre o respetivo controlo, através de pré-requisitos (Bolton & Maunsell, 2004)

Tabela 1. Pré-Requisitos do Sistema HACCP.

Pré-Requisitos	Medidas a observar	Referência Bibliográfica
Instalações e equipamento	Devem ser mantidos limpos e em boas condições de manutenção.	CAC, 2003; Regulamento 852, 2004
	Devem permitir evitar a acumulação de sujidade.	CAC, 2003; Regulamento 852, 2004
	As instalações sanitárias devem ser em número suficiente munidas de autoclismo e ligadas a um sistema de esgoto eficaz e localizadas fora das zonas onde se manuseiam os alimentos.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Os lavatórios para a lavagem das mãos devem estar equipados com água corrente quente e fria, materiais de limpeza das mãos e dispositivos de secagem higiénica.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Devem existir meios adequados de ventilação natural ou mecânica, para reduzir ao mínimo a contaminação.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Iluminação adequada de modo a que as operações se possam realizar de uma forma higiénica e as lâmpadas deverão estar devidamente protegidas.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Nos estabelecimentos de restauração e bebidas, a área de serviço compreende as zonas de receção e armazenagem, cozinha, copa e zona de fabrico, vestiários e instalações sanitárias destinadas ao uso do pessoal.	Anónimo, 2008
	A zona de cozinha destina-se à preparação e confeção de alimentos, podendo também destinar-se ao empratamento e distribuição. A copa limpa corresponde à zona destinada ao empratamento e distribuição do serviço, e a copa suja corresponde à zona destinada à lavagem de louças e de utensílios	Anónimo, 2008
Transporte	Durante o transporte os alimentos devem estar devidamente protegidos.	CAC, 2003
	Os veículos e os recipientes utilizados para o	CAC, 2003; Regulamento 852,

	transporte devem ser mantidos limpos e em boas condições.	2004
	Sempre que necessário, os veículos devem ser capazes de manter os géneros alimentícios a temperaturas adequadas e permitir que essas temperaturas sejam controladas.	CAC, 2003; Regulamento 852, 2004
Requisitos Relativos aos Géneros Alimentícios	Não se deve aceitar nenhuma matéria-prima que se saiba que contenha parasitas, microrganismos indesejáveis ou substâncias estranhas que não possam ser reduzidas para um nível aceitável mediante um processamento normal.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Devem utilizar-se apenas matérias-primas provenientes de fornecedores qualificados.	Bolton e Maunsell, 2004
	Quando os géneros alimentícios forem destinados a ser servidos frios devem ser arrefecidos rapidamente após a fase de transformação pelo calor, até atingirem uma temperatura de que não resultem riscos para a saúde.	Regulamento 852, 2004
	A descongelação dos géneros alimentícios deve ser efetuada, sempre que possível, numa câmara de refrigeração.	Regulamento 852, 2004
	Os <i>stocks</i> de matérias-primas e ingredientes deverão ser sujeitos a uma rotação efetiva, com base no <i>first in – first out</i> (primeiro a entrar – primeiro a sair), tendo em conta as validades.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004
Rastreabilidade	Cada embalagem de alimentos deve estar etiquetada com a data de produção, o tipo de alimento, o nome do estabelecimento e o número de lote de modo a permitir a sua rastreabilidade.	CAC, 1993; Regulamento (CE) 178, 2002
Controlo de Resíduos	Não deve haver acumulação de resíduos nas áreas onde se encontram os alimentos.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Os resíduos devem ser colocados em contentores que possuam tampa acionada com pedal e que devem ser mantidos em boas condições e ser fáceis de limpar e desinfetar.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
Controlo de pragas	Devem ser instituídos procedimentos adequados para controlar as pragas (roedores, aves, insetos e outros animais).	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	As instalações e as zonas circundantes deverão ser inspecionadas periodicamente para detetar possíveis infestações.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Os insetocutores devem ser instalados nas entradas e nas zonas de armazenamento de bolbos e tubérculos.	Pereira, 2009
Limpeza de desinfeção	Limpeza e desinfeção são as duas etapas fundamentais da higienização que consiste num conjunto de procedimentos cujo objetivo é a garantia de um ambiente limpo e livre de potenciais contaminantes.	Dias, 2008
	Os produtos químicos de limpeza deverão ser manipulados e utilizados com cuidado e de acordo com as instruções do fabricante, sendo armazenados separados dos alimentos, em recipientes claramente identificados, a fim de evitar o risco de contaminação dos alimentos	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Os programas de limpeza e desinfeção deverão ser monitorizados de uma forma contínua e eficaz e, quando necessário, documentados.	CAC, 2003
	Os planos de limpeza escritos deverão incluir,	CAC, 2003

	superfícies, equipamentos e utensílios a serem limpos; responsabilidade de tarefas específicas; método e frequência da limpeza e por fim, medidas de monitorização, nomeadamente análises microbiológicas ou outras.	
Qualidade da água	O fornecimento de água utilizada nas operações que envolvem alimentos está definido no Decreto-Lei n.º 306/2007 (Anónimo, 2007a), que obriga a utilização de água potável nos estabelecimentos alimentares.	Anónimo, 2007a
	Quando a empresa do sector alimentar utiliza água distribuída por uma entidade gestora de sistemas de abastecimento público, deve pedir comprovativo dos registos relativos ao programa de controlo da qualidade da água implementado, o qual é exigido por lei a estas entidades.	Anónimo, 2007a
	O gelo que entre em contacto com alimentos ou que possa contaminar os alimentos deve ser fabricado com água potável.	CAC, 2003; Regulamento 852, 2004
Saúde e Higiene Pessoal	Os manipuladores de alimentos deverão manter um elevado grau de higiene pessoal e, onde apropriado, usar vestuário protetor, touca e calçado adequado.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Os cortes e feridas do pessoal, desde que não impeçam a realização do trabalho, deverão ser cobertos com pensos impermeáveis apropriados.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Um manipulador de alimentos deverá submeter-se a um exame médico caso as razões clínicas ou epidemiológicas assim o exijam.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	O pessoal deverá lavar as mãos sempre que o seu nível de limpeza possa afetar a segurança dos alimentos	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004
Formação	Os operadores das empresas do sector alimentar devem assegurar que o pessoal que manuseia os alimentos seja supervisionado e disponha, em matéria de higiene dos géneros alimentícios, de formação adequadas para o desempenho das suas funções.	CAC, 2003; Bolton e Maunsell, 2004; Regulamento 852, 2004
	Devem ser efetuadas avaliações periódicas dos programas de formação, assim como supervisões e verificações de rotina para assegurar que os procedimentos são aplicados com eficácia.	CAC, 2003

4. Sistema de análise de perigos e pontos crítico de controlo (HACCP)

O HACCP é um sistema de prevenção e controlo da segurança alimentar, aplicado a toda a cadeia alimentar, desde a produção primária ao consumidor final, no qual são identificados os perigos que têm impacto no consumo, estabelece medidas preventivas a adotar para os evitar e determina o seu controlo (CAC, 2003; Afonso, 2006). Permite identificar as etapas de processamento suscetíveis que possam levar a uma falha de segurança do produto, através de contaminação física, química ou

(micro)biológica, e também permite determinar os Pontos Críticos de Controlo (PCC) e mantê-los sob vigilância (Afonso, 2006; Food and Drug Administration, 2013).

O sistema HACCP foi estudado em 1957 e aplicado pela primeira vez nos Estados Unidos (EUA) pela *Pillsbury Company*, com a colaboração dos laboratórios do exército e força aérea americanos e da *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) no sentido de desenvolver um plano para a produção de alimentos seguros para o programa espacial (missão Apolo). O Comité do *Codex Alimentarius*, desde 1986, recomenda o uso deste sistema nos programas de segurança alimentar e a OMS em 1989, aconselhou a sua introdução nas regulamentações nacionais e internacionais, pois considera ser um dos melhores meios para garantir a segurança dos alimentos (Batista, Pinheiro & Alves, 2003; Afonso, 2006). A nível da EU, uma vez que os géneros alimentícios estão em livre circulação no espaço comunitário, todas as empresas do sector agroalimentar estão obrigadas a implementar o sistema HACCP (Regulamento 853, 2004).

Este sistema assenta em sete princípios, aplicáveis através de uma série de doze passos segundo uma metodologia proposta pela Comissão do *Codex Alimentarius* (2003), em seguida enunciados.

Os primeiros cinco passos são fundamentais na preparação do plano HACCP. A direção da organização deve assegurar-se de que dispõe dos conhecimentos e competências adequados à formulação de um plano HACCP. Para tal, deve formar uma equipa multidisciplinar incluindo todo o pessoal que possui conhecimento e experiência específica do produto e do processo utilizados. Nos estabelecimentos de restauração deve incluir o responsável da cozinha, a gerência, o pessoal de apoio e, se necessário, um consultor na área alimentar (passo 1) (CAC, 2003; Bolton & Maunsell, 2004). A descrição detalhada do produto final (passo 2) tem em consideração todos os elementos relevantes para a sua segurança, incluindo a composição e características físico-químicas do produto, processamento, conservação e armazenagem e método de distribuição (CAC, 2003; Bolton & Maunsell, 2004). O uso a que se destina (passo 3) terá que ser baseado na utilização prevista do produto por parte do consumidor final. Em determinados casos, como por exemplo na alimentação em instituições, ter-se-á que ter em conta que se trata de grupos vulneráveis da população, nomeadamente crianças e idosos (CAC, 2003). É necessário construir fluxogramas detalhados para os diferentes processos com uma descrição clara, exata e sequencial de todos os passos operacionais (passo 4). Num restaurante, esta exigência implica um fluxograma diferente para cada

tipo de produto final preparado. Em alternativa, poderá ser aplicado um fluxograma sumário, caso contemple todos os processos existentes no estabelecimento de restauração (CAC, 2003; Bolton & Maunsell, 2004). Por último o diagrama é revisto *in situ* (passo 5) para confirmar se a operação de processamento vai ao encontro do diagrama de fluxo em todas as suas etapas e momentos e corrigi-lo onde apropriado (CAC, 2003; Bolton & Maunsell, 2004; Afonso, 2006).

Os últimos sete passos refletem os princípios nos quais se baseia o sistema HACCP (CAC, 2003; Regulamento 852, 2004; FDA, 2013):

1. Identificação dos perigos que possam ser evitados, eliminados ou reduzidos para níveis aceitáveis. A equipa HACCP deve elaborar uma lista com todos os perigos previsíveis em cada fase. Devem ser analisadas as eventuais medidas de controlo a aplicar a cada perigo. É ainda necessário fazer a avaliação do risco, ou seja, determinar a sua probabilidade de ocorrência e o impacto que terá na saúde do consumidor (severidade) para permitir determinar o nível de controlo a exercer. A avaliação do risco é efetuada através de uma Matriz (probabilidade x severidade) (Anexo 1);

2. Identificar PCCs que são etapas, passos ou procedimentos no processo geral, onde se pode aplicar controlo com o objetivo de prevenir, eliminar e/ou reduzir um perigo relevante a níveis aceitáveis. Nos PCCs são controlados os perigos que foram considerados significativos na etapa anterior. Para decidir se determinada etapa, passo ou procedimento é o mais adequado para controlar cada um dos perigos significativos, pode utilizar-se uma árvore de decisão (Anexo 2);

3. Para cada PCC devem especificar-se os parâmetros a controlar e os limites críticos. Na ausência de valores legais/indicativos, a equipa deverá suportar cientificamente os limites estabelecidos (bibliografia ou historial do produto/processo). Os critérios mais rápidos incluem medições de temperatura, tempo, humidade, pH, A_w e parâmetros sensoriais, tais como aspeto, textura, sabor, etc. Devem ser também estabelecidas as tolerâncias admitidas à volta do valor-alvo, mas que se encontrem ainda dentro do limite crítico estabelecido, de forma a evitar que este seja atingido, tendo em conta as imprecisões das medidas e os tempos de resposta. Na implementação do sistema, deverão ter em conta os critérios de higiene do processo que estão definidos no Regulamento (CE) n.º 2073/2005, alterado pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007;

4. Estabelecimento e aplicação de processos eficazes de monitorização para cada PCC. Mediante os procedimentos de monitorização, deverá ser possível a deteção precoce da perda de controlo num PCC. Se a monitorização não for contínua o seu grau

ou frequência deverá ser suficiente para garantir que o PCC está controlado. Como forma de monitorização preferem-se medições como a temperatura ou pH, às análises microbiológicas, porque se podem realizar rapidamente. Todos os registos e documentos relacionados com a monitorização dos PCCs deverão ser assinados pela(s) pessoa(s) que a efetua(m) e pelo funcionário(s) da empresa responsável(is) pela sua revisão;

5. Estabelecimento de medidas corretivas quando a monitorização indicar que um PCC não se encontra sob controlo. Estas medidas devem assegurar que o PCC volta a estar controlado. As medidas adotadas devem incluir também um sistema adequado de eliminação do produto afetado. Os procedimentos relativos às medidas aplicadas e eliminações de produto devem ser documentados nos registos do plano HACCP;

6. Estabelecimento de procedimentos de verificação para determinar se o Sistema HACCP funciona corretamente. Podem ser utilizados métodos, procedimentos e ensaios de comprovação e verificação incluindo a amostragem aleatória e a análise. A frequência das verificações deve ser suficiente para confirmar que o sistema HACCP está a funcionar eficazmente. Quando seja possível, as atividades de validação devem incluir medidas que confirmem a eficácia de todos os elementos do plano HACCP;

7. Elaboração de um sistema de registos eficaz e preciso. Deverão ser documentados os procedimentos do sistema HACCP. A documentação e a manutenção de registos deverão ser adequadas à natureza e magnitude da operação em questão e suficiente para indicar que os controlos do HACCP estão a ser efetuados e mantidos.

Em síntese, o HACCP é um sistema pró-ativo de segurança alimentar, que assenta numa identificação científica, sistemática e exaustiva dos perigos associados a cada alimento e das medidas de controlo respetivas (Pereira, 2009). As empresas devem definir um plano de amostragem para análise, tendo em conta a natureza/grau de risco dos produtos e as técnicas de preparação e confeção a que são sujeitos, para garantir a eficácia do sistema. Os resultados devem ser avaliados criticamente (FDA, 2013).

5. Doenças de Origem Alimentar

Embora os alimentos sejam indispensáveis para a manutenção da vida, podem também ser responsáveis por doenças (Adams & Moss, 2008).

As DOA abrangem um grande espectro de doenças e são um problema em crescimento de Saúde Pública a nível mundial e uma causa significativa na redução da produtividade económica (OMS, 2006b; WHO, 2012). Cada ano, em todo o mundo,

milhões de pessoas, particularmente crianças sofrem e morrem devido a DOA que são o resultado da ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogénicos ou, em menor escala, com químicos. (OMS, 2006b). A contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer fase do processo de produção dos alimentos para consumo (“do prado ao prato”) e pode resultar de contaminação ambiental, incluindo a poluição da água, solo ou ar. A apresentação clínica mais comum de DOA toma a forma de sintomas gastrointestinais sendo que os sintomas mais comuns incluem dor de estômago, náuseas, vômitos, diarreia e febre, no entanto, estas doenças podem apresentar alterações neurológicas, imunológicas ou outras. A falência de múltiplos órgãos e até mesmo cancro pode resultar da ingestão de alimentos contaminados, representando assim um peso considerável de deficiência, bem como de mortalidade (WHO, 2012).

Dependendo do tipo e quantidade de patogénicos ingeridos os sintomas podem ser severos e implicar cuidados médicos e hospitalização muitas vezes prolongada ou mesmo morte ou ligeiros e autolimitantes. Como consequência, apenas um pequeno número de casos de enfermidades causadas por alimentos é notificado às autoridades. O que se deve ao facto de que muitos patogénicos presentes nos alimentos causarem sintomas brandos, e a pessoa infetada não procurar auxílio médico ou, mesmo quando se recorre ao médico, muitas vezes quer o doente quer o próprio médico não estão sensibilizados para a investigação do agente etiológico e do alimento envolvido, logo o número de casos notificados pode ser definido como a ponta do *iceberg*, tendo em vista o número real de DOA causadas por alimentos (Adams & Moss, 2008; Forsythe, 2010).

Segundo os relatórios da EFSA, entre 2006 e 2011, os alimentos mais frequentemente associados a surtos de DOA são de origem animal, como por exemplo, ovos, carnes (não especificada), leite, peixe e os produtos derivados desses, sendo que têm surgido surtos envolvendo alimentos mistos (*mixed food*) ou *buffets*. Os agentes envolvidos foram maioritariamente *Salmonella*, *Campylobacter*, vírus e toxinas bacterianas (EFSA, 2007; EFSA, 2009; EFSA, 2010; EFSA, 2011; EFSA, 2012; EFSA, 2013). A incidência de DOA devido aos perigos microbiológicos é dependente de uma variedade de fatores, que incluem, a alteração dos perfis demográficos, com aumento da parte da população mais suscetível aos agentes patogénicos nos alimentos, mudanças nas práticas agrícolas, sistemas de distribuição de alimentos e o aumento da preferência por carne de aves. As tecnologias intensivas de criação de animais, introduzidos para minimizar os custos de produção, têm levado à emergência de zoonoses, que afetam os

seres humanos. Por fim, os detritos resultantes da produção pecuária podem constituir uma fonte de contaminação devido aos microrganismos patogênicos eventualmente presentes (Food and Agriculture Organization/WHO, 2002). Outro fator a ter em conta é a evolução dos microrganismos por mutações e recombinações genéticas que conduzem ao aparecimento de estirpes com maior virulência e enorme capacidade de sobrevivência perante agentes antimicrobianos e fatores ambientais adversos (Santos & Cunha, 2007). Mudanças nos padrões alimentares, como a preferência por alimentos frescos e minimamente processados, o aumento do intervalo entre a preparação de alimentos e o seu consumo, e o aumento da prevalência da ingestão de alimentos preparados fora de casa, contribuem para o aumento da incidência de doenças transmitidas por alimentos atribuídas a microrganismos (FAO/WHO, 2002).

5.1. Consequências das Doenças de Origem Alimentar

A preocupação global com a segurança alimentar ocorre devido ao seu efeito sobre a saúde do consumidor e as perdas financeiras na indústria alimentar, como consequência das retiradas dos produtos e barreiras comerciais. Nos EUA, o impacto económico das DOA, embora secundário à perda de vidas, é impulsionado por assistência médica, despesas legais, investigações da Saúde Pública, perda de salários, perda de quota no mercado, e a perda da confiança dos consumidores e é estimado em 20 a 43 mil milhões de dólares por ano. Foi estimado que as doenças com origem alimentar serão responsáveis por 76 milhões de casos, 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes em cada ano (Wesley, 2009).

5.2. Fatores associados à ocorrência de Doenças de Origem Alimentar

Os surtos de DOA envolvem um número de pessoas e uma fonte comum e são, consequentemente, mais intensamente investigadas que a ocorrência de casos esporádicos. Informações valiosas são proveniente dessas investigações sobre os fatores mais comuns que contribuem e as falhas na higiene dos alimentos que levam a surtos de DOA (Adams & Moss, 2008).

Numa conferência internacional “Segurança Alimentar na Restauração: Uma responsabilidade ignorada?” (*“Catering Food Safety: A responsibility ignored?”*), realizada em Novembro de 2003 em Budapeste, e que reuniu cientistas, chefes de cozinha e representantes de consumidores e das agências de segurança alimentar para discutirem o tema da segurança alimentar na restauração, foram realçados vários fatores que contribuem para a ocorrência de DOA em unidades de restauração,

designadamente: matérias-primas contaminadas, manipulações inadequadas que originam contaminações cruzadas, armazenagens em frio e arrefecimentos impróprios, práticas de descongelação incorretas, confeção inadequada, má higiene pessoal, manipuladores de alimentos infetados, higiene das instalações e equipamentos inadequados, utilização de panos da loiça e esponjas em diversas funções, alimentos preparados com muita antecedência e distribuição demorada (European Union Risk Analysis Information Network , 2003).

5.3. Grupos de alto risco

Embora todos os indivíduos sejam suscetíveis a DOA, existe um número crescente de pessoas que são mais propensas a experimentar essas doenças e, muitas vezes, com consequências mais graves. Estas pessoas incluem, lactentes e crianças, mulheres grávidas, imunocomprometidos por meio de medicamentos ou doenças, e os idosos (FAO/WHO, 2002; Forsythe, 2010).

5.3.1. Doenças de Origem Alimentar em Idosos

O número de pessoas com idade superior a 65 anos está a aumentar globalmente. Normalmente os idosos são mais vulneráveis a DOA, devido à diminuição e alteração da resposta imune, fisiologia gastrointestinal, uso de medicamentos imunossupressores ou ácido-supressivos, doenças crónicas e fatores de saúde, como a desnutrição (Kendall, Hillers & Medeiro, 2006; Kirk, Veitch & Hall, 2010; Lund & O'Brien, 2011). A motilidade intestinal e a função imunológica da mucosa diminuem com o envelhecimento, aumentando a suscetibilidade a infeção sistémica através do intestino. O uso prolongado de antibióticos pode estimular o crescimento excessivo de microrganismos patogénicos do cólon e a perda de inibição competitiva fornecida pela microflora natural (Kendall et al., 2006).

Uma subpopulação em maior risco de DOA são pessoas idosas que vivem em lares. As condições de vida dos idosos e o contacto com visitantes e funcionários fazem dos lares um ambiente propenso a propagação de agentes infecciosos (Kirk et al., 2010). A frequência de surtos em lares de idosos não é conhecida, mas uma variedade de dados sugerem que elas são comuns (Strausbaugh, Sukumar & Joseph, 2003). A preparação centralizada e distribuição dos alimentos aos residentes dos lares têm riscos inerentes para a transmissão de agentes patogénicos de origem alimentar (Kirk et al., 2010). Os fatores responsáveis pelos surtos de origem alimentar são devido à preparação de refeições para um grande número de pessoas, o fornecimento de dietas moles e

alimentação por sonda. Segundo Strausbaugh et al., (2003), a maioria (51%) das mortes por doença diarreica ocorre em pessoas idosas, e 30% dessas mortes ocorrem entre os residentes dos lares de idosos. A vulnerabilidade dos residentes precisa de ser considerada na análise de risco nos programas de segurança alimentar, como no plano HACCP, juntamente com a formação permanente em segurança alimentar aos funcionários (Kirk et al., 2010).

Dados da *Foodborne Diseases Active Surveillance Network* (FoodNet) de 2003 indicaram que, comparado com os adultos jovens (idades entre 20 e 59 anos), as pessoas com idade superior a 60 anos, apresentaram uma maior incidência de infeções causadas por *Listeria*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia* e *Escherichia coli* 0157. Os dados FoodNet não incluem a incidência de *Clostridium perfringens* ou *Staphylococcus aureus*, no entanto, existem relatórios do aumento da suscetibilidade a esses patógenos em idosos (Kendall et al., 2006). Outros autores confirmam que, os idosos são suscetíveis a DOA, provocadas por, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *C. perfringens*, em que este último pode causar colite pseudomembranosa neste grupo etário. E este é também o grupo com maior probabilidade de falecer após a infeção com *Escherichia coli* O157 (Strausbaugh et al., 2003; Kendall et al., 2006; Kirk et al., 2010; Lund & O'Brien, 2011).

5.3.2. Doenças de Origem Alimentar em Crianças

Com exceção dos idosos, as crianças têm um maior risco de ter DOA que outros grupos etários. Um estudo recente sobre doenças infecciosas intestinais na Inglaterra, revelou que foram mais frequentemente relatadas em crianças. Estas doenças podem conduzir a consequências para a saúde a curto e a longo prazo e por vezes, podem resultar em morte (Clark, Sharp & Reilly, 2000; Sockett & Rodgers, 2001; Pew Health Group & Center for Foodborne Illness Research & Prevention, 2009).

Normalmente as crianças são mais vulneráveis a DOA, devido ao seu sistema imunológico ainda estar em desenvolvimento impedindo a sua aptidão para combater infeções. Por outro lado o seu baixo peso corporal resulta numa redução da dose de um agente patogénico necessário para provocar doença, ocorre um controlo limitado sobre a sua dieta e os riscos relacionados com a segurança alimentar, e a produção de ácido do estômago é reduzida diminuindo a sua capacidade de eliminar bactérias nocivas (PEW & CFI, 2009; Lund & O'Brien, 2011). Nas creches, as crianças estão em contacto

próximo e frequente umas com as outras, e nesse ambiente significa que as DOA podem propagar-se rapidamente (Cardiff, 2012).

Dados da FoodNet em 2008, indicaram que as crianças com menos de 4 anos são mais afetadas que o resto da população (dos 4 anos aos 50 anos) com *Campylobacter*, *E. coli* 0157:H7, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella* e *Toxoplasma gondii* (Sockett & Rodgers, 2001; PEW & CFI, 2009). Ao contrário da maioria dos adultos, as crianças com idade inferior a um ano são suscetíveis à infeção por esporos do *Clostridium botulinum*, que pode germinar e colonizar o cólon infantil produzindo neurotoxina botulínica e levando ao botulismo infantil (Saraiva, 2012). Fórmulas infantis contaminadas com *Cronobacter* spp. ou *Salmonella* já causaram infeções graves em recém-nascidos (Lund & O'Brien, 2011). Há evidências de que determinadas categorias de alimentos desempenham um papel ocasional em expor lactentes e crianças a DOA. Assim, tem sido documentada desde a década de 1950 no Canadá, nos EUA, no Reino Unido e outros países, a associação de produtos de leite em pó com *Salmonella* e *Clostridium*, *Enterobacter sakazakii* (hoje *Cronobacter* spp.) e intoxicação alimentar estafilocócica (Sockett & Rodgers, 2001; Cahill, Wachsmuth, Costarrica & Embarek, 2008).

5.4. Incidência das Doenças de Origem Alimentar na Europa

Segundo o último relatório publicado pela EFSA os surtos de DOA são classificados em 2 categorias: surto com “evidência forte” quando existe evidência robusta da implicação de um determinado alimento e “evidência fraca” quando não é possível implicar qualquer alimento ou quando as evidências são fracas. Assim, em 2011 na UE, ocorreram 5.648 surtos de DOA, que deram origem a 69.553 casos de doença, dos quais 7.125 foram hospitalizados e 93 morreram (EFSA, 2013).

Salmonella, embora com uma tendência decrescente, continuou a ser o primeiro agente responsável por DOA (26,6%), seguido por toxinas bacterianas (12,9%), *Campylobacter* (10,6%) e vírus (9,3%). O número de surtos nos quais o agente causal foi desconhecido continuou a aumentar em relação aos anos anteriores sendo esse aumento de 27,8% (2.023 surtos) em relação a 2010 (1.380 surtos). Houve um declínio contínuo do número total de surtos de *Salmonella* na UE durante o período de 2008 com 1.888 surtos para 2011 com 1.501 surtos. Além disso, o número total de surtos causados por vírus diminuiu para 525 em 2011, após um aumento de 697 em 2008 para 1.043 em 2009 (EFSA, 2013).

Como nos anos anteriores, os principais alimentos implicados foram os ovos e ovo produtos, responsáveis por 21,4% dos surtos em que *Salmonella* Enteritidis foi o agente patogénico mais frequente neste alimento. As refeições mistas foram a categoria a seguir mais implicada, sendo responsáveis por 13,7% dos surtos e *Salmonella* foi de igual modo o agente mais frequentemente detetado, seguido do calicivírus e toxinas bacterianas (*C. perfringens*, *Staphylococcus*, e *Bacillus*). Peixe e produtos derivados com 10,1% dos surtos tiveram como principal agente responsável a histamina (78,9%). Crustáceos, marisco e moluscos foram responsáveis por 6,0% dos surtos por calicivírus e toxinas marinhas e os vegetais, sumos e produtos derivados originaram 5,3% dos surtos causados maioritariamente por *Salmonella* e *E. coli* patogénicos. O número de surtos causados por refeições mistas aumentou em comparação com 2010 de 13,9% para 17,8%. Observou-se igualmente um aumento nos surtos causados por peixe e produtos derivados e doces e chocolates. Em contrapartida observou-se diminuição nos surtos com origem em vegetais, crustáceos, marisco e moluscos (EFSA, 2013).

No que respeita os principais locais em que ocorreram surtos de DOA, foram os restaurantes que aumentaram de 30,8% para 34,4% substituindo as cozinhas domésticas com 32,7% dos surtos. As escolas ou creches foram implicadas com 4,4% dos surtos, e as instituições (lares, etc) foram notificadas com 2,4% dos surtos (EFSA, 2013).

5.5. Incidência das Doenças de Origem Alimentar em Portugal

Ao contrário de outros países Europeus, Portugal não possui ainda um sistema nacional de vigilância e controlo de DOA. Deste modo, os números apresentados não revelam a verdadeira dimensão das DOA em Portugal. Uma avaliação da situação epidemiológica nacional, na última década, pode ser efetuada a partir dos dados disponíveis nos relatórios dos programas de vigilância e controlo de doenças de origem alimentar na Europa da OMS e da EFSA.

Os dados estatísticos relativos ao período de 1987 a 2000 foram disponibilizados pelos 7º e 8º Relatórios da OMS, que têm como base a informação disponibilizada pelo INSA (WHO, 2000; WHO, 2003). Não existem dados referentes aos anos de 2001 a 2003 mas desde 2004 que todos os dados de surtos de DOA que chegam ao conhecimento do INSA são reportados nos relatórios da EFSA.

Em 2011 foram reportados, oficialmente em Portugal, 8 surtos com origem alimentar. No total 101 pessoas que evidenciaram sinais de doenças, foi registada uma hospitalização, e nenhum caso fatal (EFSA, 2013). De 2010 para 2011 ocorreu um

aumento de 4 surtos enquanto no período anterior se observou um declínio contínuo do número de surtos desde 2008, em que foram reportados 35 surtos, envolvendo 457 pessoas, 272 hospitalizações e um caso fatal. Já em 2009, foram reportados 11 surtos de origem alimentar, em que 251 pessoas evidenciaram sinais de doença e resultaram em 90 hospitalizações, não havendo registo de nenhum caso fatal (EFSA, 2010; EFSA, 2011; EFSA, 2012). Só para comparação, em 1998 foram registados 47 surtos, em que do total de 1.411 pessoas que evidenciaram sinais de doenças, resultaram 602 hospitalizações (WHO, 2000).

Os agentes etiológicos envolvidos nos casos dos surtos de origem alimentar, de 2011, 2010, 2009 e 2008, foram *Salmonella*, toxina de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium* (*Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, e *Clostridium* spp., não especificado), *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* (EFSA, 2010; EFSA, 2011; EFSA, 2012; EFSA, 2013).

5.6. Programas de Vigilância

Muitos países não têm sistema de recolha e divulgação de dados sobre as DOA e mesmo naqueles onde existem dados comunicados é reconhecido que representa apenas uma fração do número real de casos. Alguns estudos têm sugerido que a proporção real para os casos relatados pode estar compreendida entre 25:1 e 100:1 (Adams & Moss, 2008). As DOA têm sido a principal causa de doença humana por séculos, mas continua a desconhecer-se a sua verdadeira incidência, e vários estudos têm indicado que podem ser 300-350 vezes mais frequentes do que indicam os casos relatados. A OMS chamou a atenção para as DOA como um problema mundial e para o papel da vigilância como um passo essencial para a introdução de medidas de controlo (Clark et al., 2000).

O objetivo da vigilância é detetar os surtos e contribuir para a medição de tendências e para a introdução de medidas de intervenção e controlo (legislação, educação para a saúde, informação ao público, alterações na produção alimentar e métodos de processamento) para a prevenção de DOA (Clark et al., 2000; Viegas, 2009). Contribuem igualmente para o reconhecimento de características epidemiológicas das DOA. Existem diferentes fatores que contribuem para a incidência dos surtos de DOA relatadas, estes são, a idade, distribuição geográfica dos indivíduos infetados, incidência sazonal e locais de ocorrência (Clark et al., 2000).

6. Microbiologia Alimentar

Se a produção e manipulação dos alimentos ocorrerem em deficientes condições de higiene, os géneros alimentícios podem conter microrganismos. Esses microrganismos podem ser patogénicos, e causar doença no seu consumidor, ou serem indicadores das condições higiénicas observadas.

De seguida, serão explicados os principais microrganismos patogénicos mais frequentes em produtos alimentares confeccionados bem como os microrganismos indicadores de qualidade e higiene utilizados neste estudo.

6.1. Microrganismos Patogénicos

6.1.1. *Salmonella* spp.

As bactérias do género *Salmonella* fazem parte da família *Enterobacteriaceae*. São bactérias em forma de bacilos, Gram negativas, anaeróbicas facultativas, não formam esporos e são móveis, à exceção dos serotipos *S. Gallinarium* e *S. Pullorum* que são imóveis (Lacasse, 1998; FDA, 2012). *Salmonella* fermenta a glicose, produzindo ácido e gás, contudo é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. No entanto, têm surgido nos últimos anos biótipos atípicos, capazes de utilizar a lactose e/ou a sacarose, o que pode levar a que estas estirpes não sejam identificadas nos meios habitualmente usados em laboratórios clínicos ou da indústria alimentar. Como consequência, têm surgido tecnologias moleculares ou imunoenzimáticas, muito mais eficientes do que os métodos tradicionais de deteção de *Salmonella* (D' Aoust & Maurer, 2007).

A sua temperatura ótima é de, aproximadamente, 38 °C e a temperatura mínima para o seu crescimento é cerca de 5 °C. Estas bactérias por não serem esporuladas, são minimamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60 °C (pasteurização e cozimento), durante 15 a 20 minutos (Forsythe, 2010). No género *Salmonella*, existem apenas duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, mas existem mais de 2500 serovares de *Salmonella* (Jay Loessner & Golden, 2005; Viegas, 2009). Os serovares Typhi e Paratyphi provocam normalmente septicémia e são os agentes responsáveis pela febre tifoide nos seres humanos, enquanto as outras formas de salmonelose produzem sintomas mais brandos (Jay et al, 2005; FDA, 2012). O principal reservatório desta bactéria é o intestino dos animais e dos seres humanos infetados ou portadores, e é disseminada com as matérias fecais no ambiente, onde pode persistir durante muito tempo. O uso de estrume contribui para a contaminação dos solos e da água, e os insetos ajudam na propagação da bactéria pelo meio ambiente (Lacasse, 1998; Jay et al, 2005).

A salmonelose surge após a passagem de *Salmonella* do lúmen para o epitélio do intestino delgado, onde ocorre a inflamação (FDA, 2012). Nas pessoas mais vulneráveis (crianças, idosos, doentes crónicos) esta bactéria pode atingir zonas mais profundas, e então disseminar-se por via linfática e sanguínea, provocando uma septicemia e uma infeção generalizada, podendo levar a anomalias cardíacas e circulatórias, infeção intracraniana e disfunção de órgãos e por vezes, a morte (Lacasse, 1998; Viegas, 2009).

A dose infecciosa vai depender da idade e da saúde do hospedeiro e das diferentes estirpes, bastando 15 a 20 células para o aparecimento dos sintomas, que aparecem de 6 a 48 horas após a ingestão do alimento contaminado. Os sintomas agudos são sobretudo diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos, dores de cabeça, acompanhadas na maioria dos casos por febre, mais raramente pela presença de sangue nas fezes (Lacasse, 1998; D' Aoust, 2000; Forsythe, 2010; D' Aoust & Maurer, 2007). Estes sintomas, geralmente, diminuem em 5 dias mas por vezes segue-se um estado de portador, de um a vários meses, durante o qual o indivíduo assintomático continua a excretar *Salmonella* (Viegas, 2009).

Toda a população é suscetível, mas os sintomas são mais graves em idosos, crianças e doentes. O rácio de letalidade da maioria das formas de salmonelose é inferior a 1%, enquanto da febre tifoide é de 10%. *S. Dubin* tem um rácio de letalidade de 15% quando ocorre septicemia nos idosos e *S. Enteritidis* tem um rácio, aproximado de 3,6%, no que diz respeito a surtos em hospitais e casas de saúde, sendo que os idosos são os mais afetados (FDA, 2012).

A salmonelose tem uma incidência cíclica, sendo superior nos períodos de calor, entre Julho e Setembro, devido à ocorrência de temperaturas ambiente mais propícias à multiplicação das bactérias nos alimentos e também pela maior frequência de piqueniques e consumo de pratos frios durante essa época do ano (Lacasse, 1998).

Alguns exemplos de alimentos que têm sido associados à doença incluem, carnes cruas, aves, ovos, leite e produtos lácteos, peixe, camarões, côco, molhos, bolos, creme ou coberturas de sobremesas, gelatina, manteiga de amendoim, chocolate e cacau (Viegas, 2009; FDA, 2012, Forsythe, 2010). A contaminação dos géneros alimentícios ocorre quando o microrganismo é introduzido na área de preparação, onde se multiplica nos alimentos, devido a temperaturas de conservação ou modo de preparação inadequados ou por contaminação cruzada de alimentos crus com alimentos processados (Viegas, 2009).

Desde os anos oitenta do século passado, *S. Enteritidis* emergiu como o microrganismo patogénico associado ao consumo de ovos. Diversos estudos têm comprovado que este serovar pode desenvolver-se na parte interior do ovo, mais precisamente na gema. Este acontecimento ocorre através de uma transmissão vertical transovárica, isto é, a contaminação da gema pela bactéria antes da formação da casca do ovo (Rabsch *et al.*, 2000; Forsythe, 2010; FDA, 2012).

Como já referido, embora com tendência decrescente, *Salmonella* continua a ser o agente zoonótico mais comum em DOA na EU. Em 2011 foram relatados 1.501 surtos que afetaram 11.394 pessoas, das quais 2.114 foram hospitalizadas e 13 morreram. O serovar mais frequente foi *S. Enteritidis* e os ovos e produtos à base de ovos os alimentos mais comuns (EFSA, 2013).

Nos EUA, estima-se que anualmente ocorram 1 milhão de doentes devido a *Salmonella* spp., 19.000 hospitalizações e 380 mortes. Em relação a *S. Typhi* ocorreram 1.800 casos com 380 hospitalizações. *Salmonella* é o maior responsável pelos casos de hospitalização e de morte devidos a DOA. Em Inglaterra, País de Gales, Austrália e EUA, *Salmonella* é o agente bacteriano mais frequentemente implicado em DOA (Scallan *et al.*, 2011).

6.1.2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria patogénica responsável por casos isolados e por surtos de listeriose em humanos e animais. Em 1927, esta bactéria patogénica foi pela primeira vez identificada e reconhecida em animais, no entanto, apenas a partir dos anos 80, é que *L. monocytogenes* foi considerada uma ameaça para a Saúde Pública pela comunidade científica, pela indústria alimentar e pelos consumidores, no seguimento de diversos surtos graves devido ao consumo de alimentos contaminados (Pagotto, Corneau & Farber, 2006).

Listeria monocytogenes pertence à família *Listeriaceae* e é um bacilo Gram positivo, não esporulado, anaeróbico facultativo, move-se através de flagelos e está amplamente distribuído no ambiente (Lacasse, 1998; Pagotto *et al.*, 2006; FDA, 2012). A sua atividade hemolítica em agar de sangue é uma das características que, juntamente com outras características bioquímicas, permite distinguir *L. monocytogenes* das outras espécies pertencentes ao mesmo género (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2003).

Este microrganismo é ubiqüitário, com capacidade de se desenvolver em condições desfavoráveis para outros microrganismos patogénicos, que se pode multiplicar a temperaturas entre 0 °C a 45 °C e, por consequência, mostra algum crescimento nos alimentos refrigerados. O pH adequado para multiplicação varia entre 4,4 e 9,6, embora seja melhor entre 6 e 8, sendo o pH ótimo 7,0. É um dos poucos microrganismos patogénicos que se pode multiplicar em substratos com atividade da água (a_w) tão baixa quanto 0,93 e em concentrações de NaCl de 10 % (Lacasse, 1998; Pagotto et al., 2006; Swaminachan *et al.*, 2007). Encontra-se amplamente distribuída na natureza, solo, pasto e água, mas também nos animais domésticos e selvagens, facto que explica a facilidade com que é encontrada em alimentos, desde a produção até ao consumo (Beuchat, 1996; Viegas, 2009).

L. monocytogenes é responsável por infeções que prejudicam, preferencialmente, indivíduos com o sistema imunológico enfraquecido, incluindo mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos. Os sintomas da listeriose podem ser, septicémia, meningite, encefalite e infeção intrauterina em grávidas, que pode resultar em aborto espontâneo (FDA, 2012). O microrganismo coloniza rapidamente o tubo digestivo provocando ou não uma diarreia discreta, antes de se disseminar pelo organismo por via circulatória. O período de incubação geralmente é excessivamente longo, de 1 a 90 dias, e esta doença começa normalmente por sintomas de tipo gripal, evoluindo em mais de 70% dos casos, para complicações graves como aborto na grávida, meningite ou septicemia em recém-nascidos, doentes transplantados ou submetidos a quimioterapia, doentes com SIDA ou qualquer outra situação que possa comprometer o sistema imunológico (Lacasse, 1998; Forsythe, 2010; Swaminachan *et al.*, 2007). Embora a infeção humana seja rara, a doença é muitas vezes severa e a taxa de letalidade é elevada, principalmente nos grupos de risco. Este microrganismo está entre as principais causas de morte em infeções de origem alimentar em países industrializados (Viegas, 2009). A dose infecciosa é desconhecida, mas pensa-se que depende da estirpe e da suscetibilidade do hospedeiro humano. Em casos contraídos a partir de leite cru, ou leite supostamente pasteurizado pode assumir-se que em pessoas suscetíveis, menos de mil microrganismos podem provocar doença (Forsythe, 2010; FDA, 2012).

Nos últimos anos, foram descritos vários surtos de listeriose associados ao consumo de leite cru, leite supostamente pasteurizado, queijos pouco maturados, gelados, vegetais crus, carnes cruas, peixes crus e fumados e alguns enchidos (FAO/WHO, 2004; FDA, 2009).

Na UE o número de surtos de listeriose não é muito elevado mas envolve uma elevada percentagem de hospitalizações (em muitos casos 100%) e uma elevada taxa de letalidade. O ano de 2006 foi o que envolveu um maior número de casos, 120, dos quais 89 foram hospitalizados (74,2%) e 17 acabaram por falecer o que correspondeu a 30,9% do total de óbitos ocorridos devido a DOA. Isso fez com que *Listeria* tenha sido o patógeno mais grave em relação a surtos de origem alimentar em 2006. (EFSA, 2007). Já em 2011 ocorreram apenas 3 surtos de evidência forte atribuídos a *L. monocytogenes*. Um deles, devido ao consumo de queijo, afetou 11 pessoas sendo que todas foram hospitalizadas e 4 faleceram (taxa de letalidade de 36,4%). Os outros 2 surtos afetaram 5 pessoas tendo de igual modo todas sido hospitalizadas mas não se registaram mortes (EFSA, 2013).

Nos EUA, estima-se que anualmente ocorram 1.600 doentes devido a *L. monocytogenes*, 1 500 hospitalizações e 250 mortes (Scallan et al., 2011). É um dos agentes responsáveis por um maior número de mortes.

Em Portugal os dados são escassos e os únicos oficiais são relativos a 2004, e estão registados no relatório da EFSA, reportando 38 casos humanos nesse ano (EFSA, 2007). Entre janeiro de 2009 e fevereiro de 2011, ocorreu um surto, na região da grande Lisboa, que envolveu 46 casos com uma taxa de letalidade de 43,5%, devido ao consumo de queijo (Pita, 2012).

6.1.3. *Bacillus cereus*

B. cereus é um bacilo Gram positivo, anaeróbio facultativo, formador de esporos e que foi isolado pela primeira vez em 1887 (Lacasse, 1998; Forsythe, 2010; ICMSF, 2003). Este microrganismo multiplica-se facilmente num alimento cozinhado ou pasteurizado, devido à termorresistência dos esporos que resistem ao tratamento e não encontram flora competitiva visto que foi eliminada (Lacasse, 1998; Granum & Baird-Parker, 2000; Granum, 2007). Tem uma temperatura ótima de crescimento de 30 °C a 40 °C, mas consegue ainda crescer a temperaturas entre 4 °C e 55 °C (Granum & Baird-Parker, 2000; Jay et al., 2005; Schraft & Griffiths, 2006; Granum, 2007).

B. cereus produz duas enterotoxinas, a diarreica e a emética, que são os agentes responsáveis pela DOA (ICMSF, 2003). A toxina diarreica é causada por uma proteína de alto peso molecular que age sobre a mucosa intestinal, provocando uma acumulação de líquido no intestino causando uma diarreia aquosa. Esta toxina é segregada no próprio intestino delgado humano pelos microrganismos ingeridos com o alimento

contaminado. É inativada a temperaturas inferiores à pasteurização, a 56 °C durante 5 minutos. A toxina emética é causada por um peptídeo de baixo peso molecular, termoestável, só sendo destruída à temperatura de 126 °C durante 90 minutos. Esta toxina é produzida durante a fase estacionária de crescimento num alimento (Lacasse, 1998; Granum & Baird-Parker, 2000; Forsythe, 2010; ICMSF, 2003; Granum, 2007).

Os sintomas da síndrome diarreica são similares aos da tóxico-infecção por *C. perfringens*, provocando diarreias aquosas, cólicas abdominais e dor, mas tendo uma curta duração. O período de incubação é, geralmente de 6 a 15 horas após o consumo do alimento contaminado e na maioria dos casos os sintomas persistem durante 24 horas, que é o tempo em que a bactéria é excretada em grandes quantidades. A intoxicação alimentar causada pela toxina emética assemelha-se à intoxicação por *Staphylococcus aureus* e é caracterizada por náuseas e vômitos, que ocorrem 30 minutos a 6 horas após o consumo do alimento contaminado. Os sintomas causados por esta toxina têm uma duração de menos de 24 horas (Lacasse, 1998; Forsythe, 2010; FDA, 2012). O alimento mais comum na intoxicação alimentar pela toxina emética é o arroz cozido com antecedência, não refrigerado, e depois reaquecido a temperatura insuficiente para a destruição do microrganismo, antes de ser servido. Os esporos de *B. cereus* resistem ao cozimento, logo podem crescer e produzir a toxina emética durante a permanência do alimento à temperatura ambiente (Lacasse, 1998; Schoeni & Wong, 2005). Outros alimentos como a batata, massa e produtos de queijo também têm sido associados a surtos de DOA provenientes da toxina emética. A síndrome diarreica, resultante da ingestão do alimento contaminado com a bactéria que depois de ingerida produz e liberta a toxina, tem sido associada a uma grande variedade de alimentos, tais como, carne, leite e vegetais (Forsythe, 2010).

A população em geral é suscetível à intoxicação por *B. cereus*, apesar da intensidade dos sintomas variar de indivíduo para indivíduo, sendo mais severo em crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos (FDA, 2012).

Em 2011, na UE, ocorreram 220 surtos devido a toxinas produzidas por *Bacillus*, o que correspondeu a um aumento de 122,2% relativamente a 2010. Foram afetadas 2.307 pessoas 174 das quais foram hospitalizadas e uma faleceu (EFSA, 2013). Ressalta-se um surto ocorrido em 2007, em França, numa escola / jardim-de-infância que afetou 146 pessoas, sendo o género alimentício implicado ervas e especiarias (EFSA, 2009).

Nos EUA, anualmente estima-se que existam 63.000 doentes devido a *B. cereus*, e 20 hospitalizações (Scallan et al., 2011).

6.1.4. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram positiva pertencente à família *Micrococcaceae*, anaeróbia facultativa e que ao microscópio surge aos pares, em cadeias pequenas e, mais frequentemente, aos cachos (Bergdoll & Wong, 2006; FDA, 2012). Os estafilococos são facilmente destruídos pelo calor, sensíveis à acidez, tolerantes ao sal (halotolerantes) e aos nitritos (Lacasse, 1998; Jay *et al*, 2005). Em condições favoráveis, algumas estirpes têm a capacidade de produzir toxinas, as enterotoxinas (SE), que são os agentes responsáveis pelas intoxicações alimentares em humanos (Seo & Bohach, 2007; Viegas, 2009). As SE são proteínas hidrossolúveis e termoestáveis, sendo dificilmente destruídas pelo calor, pela desidratação ou congelamento. Classicamente são reconhecidas as SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED e SEE, sendo que a maioria dos surtos é provocada pelas toxinas SEA e SED. Para as novas SEs identificadas ainda não está claramente estabelecida a relação com a capacidade de provocar intoxicação alimentar (Seo & Bohach, 2007; Argudín, Mendoza & Rodicio, 2010). Esta espécie é um hospedeiro adaptado sendo o principal reservatório, o homem. A maior quantidade de microrganismos situa-se a nível das fossas nasais, trato digestivo, olhos, garganta, de onde é disseminada sobre a pele da cara e das mãos podendo também existir em feridas na pele (Lacasse, 1998; Jay *et al*, 2005). Sabendo que a principal fonte de *S. aureus* que causam gastroenterites são portadores humanos, uma melhor educação e treino dos manipuladores terá provavelmente um impacto na diminuição desta doença, não esquecendo no entanto, que os equipamentos e as superfícies também podem ser fontes de contaminação (Forsythe, 2010; Viegas, 2009).

Os sintomas da intoxicação estafilocócica ocorrem, rapidamente, após poucas horas do consumo do alimento contaminado (1 a 6 horas) (Jay *et al*, 2005). Os sintomas mais comuns são náuseas, vômitos compulsivos, cólicas abdominais e prostração (Forsythe, 2010; Jay *et al*, 2005; FDA, 2012; Viegas, 2009). Na maioria dos casos, os sintomas são agudos, dependendo da suscetibilidade dos indivíduos à toxina, da quantidade de alimento ingerido, da quantidade de toxina presente no alimento ingerido e do estado de saúde do indivíduo. Uma dose de toxina inferior a 1,0 ng em alimentos contaminados produzirá sintomas de intoxicação (Forsythe, 2010; FDA, 2012; Viegas,

2009). A morte devido à intoxicação alimentar por *S. aureus* é muito rara, no entanto existem relatos de morte entre idosos, crianças e pessoas debilitadas (FDA, 2012).

Os alimentos que normalmente estão associados a intoxicação estafilocócica são aqueles que foram manipulados após o processamento e sujeitos a temperaturas de armazenamento entre 10 °C e 45 °C antes do seu consumo, como saladas preparadas com ovo, maionese, marisco, atum ou frango, bolos com recheio, recheios de carne, fiambre e gelados. Vários surtos foram ainda atribuídos ao consumo de queijo (Forsythe, 2010; Bergdoll & Wong, 2006; FDA, 2012).

Em 2011 a nível da UE ocorreram 345 surtos devido à toxina estafilocócica representando 6,1% do total de surtos e corresponde a um aumento de 25,9% face ao ano anterior. As pessoas afetadas foram 3.054, 284 das quais foram hospitalizadas e 1 morreu. Pode observar-se que 6 destes surtos reportados ocorreram em Portugal e envolveram 90 pessoas não se tendo registado hospitalizações nem mortes (EFSA, 2013).

Nos EUA, anualmente estimam-se 240.000 doentes devido a *S. aureus*, 1.100 hospitalizações e 6 mortes (Scallan et al., 2011).

6.1.5. *Clostridium perfringens*

C. perfringens é um bacilo Gram positivo, esporulado e anaeróbico estrito (Lacasse, 1998; Forsythe, 2010; FDA, 2012; Viegas, 2009). É amplamente distribuído no meio ambiente e ocorre frequentemente no intestino do homem e animais, e os esporos podem persistir no solo (onde se encontra em níveis de 10^3 a 10^4 ufc/g), sedimentos e em áreas sujeitas a contaminação fecal humana e animal (McClane, 2007; FDA, 2012; Viegas, 2009). A bactéria cresce facilmente em alimentos ricos em proteínas, pouco ácidos e mantidos a uma temperatura entre 15 °C e 50 °C e produz enterotoxina (CPE) a temperaturas entre 30 °C e 40 °C. As células vegetativas são facilmente destruídas pelo cozimento, mas os esporos são bastante resistentes ao calor, à desidratação e ao congelamento (Lacasse, 1998).

Existem 5 tipos de *C. perfringens* (A, B, C, D e E), em que os tipos A, C e D são patogénicos humanos, enquanto os tipos B, C, D e E são patogénicos animais (Forsythe, 2010). Apenas *C. perfringens* tipo A é responsável por toxinfecções alimentares, através da enterotoxina (CPE) (Lacasse, 1998; Labbé, 2000; Jay et al., 2005; Viegas, 2009). Os primeiros sintomas da gastroenterite ocorrem 8 a 24 horas após a ingestão do alimento contaminado com grande quantidade de células vegetativas (Labbé, 2000; Jay et al.,

2005). Este é o tempo necessário para a bactéria sintetizar a CPE no intestino delgado. Ao fixar-se sobre o epitélio da mucosa, a toxina modifica a permeabilidade da membrana, interferindo no transporte de água, sódio e cloretos e fazendo com que haja uma aceleração da motilidade intestinal (Lacasse, 1998). Os principais sintomas incluem diarreia e cólicas abdominais intensas e persistem, geralmente, durante 24 horas, sendo a reidratação bastante importante, dado que já têm sido reportados casos de morte devido a desidratação e complicações subsequentes (Viegas, 2009). As pessoas mais frequentemente afetadas por este tipo de DOA são as crianças, idosos e doentes. Os idosos são mais suscetíveis a sintomas prolongados ou severos (FDA, 2012). *C. perfringens* tipo C provoca uma enterite necrótica, que embora rara, é muito grave (síndrome *pig-bel*), e é geralmente fatal. Esta doença é causada pela infecção e necrose dos intestinos, que resulta em septicémia (Forsythe, 2010; McClane, 2007; FDA, 2012).

Normalmente, a causa da toxicoinfecção por *C. perfringens* é a exposição prolongada de alimentos preparados a temperaturas inadequadas, o que permite que as células vegetativas se multipliquem e atinjam níveis elevados. As carnes, os produtos cárneos e os molhos são os alimentos mais frequentemente associados (Forsythe, 2010). Por exemplo, os rolos de carne, carnes assadas e aves recheadas, são alimentos que apresentam condições favoráveis para a multiplicação de clostrídios. A dimensão que estes géneros alimentícios apresentam, dificulta a penetração de calor até ao seu interior durante o processo de cozimento. Um arrefecimento lento e as condições de anaerobiose destas zonas centrais proporcionam as condições ideais para a germinação dos esporos e crescimento de bactérias que podem atingir números preocupantes (Lacasse, 1998).

Os dados da EU relativos a *C. perfringens*, nos últimos anos, são publicados em conjunto com outros *Clostridia* não existindo referências específicas a *C. perfringens* (EFSA, 2013).

Nos EUA, anualmente ocorrem 970 000 doentes devido a *C. perfringens*, 440 hospitalizações e 26 mortes (Scallan et al, 2011).

6.1.6. *Escherichia coli*

E. coli é uma bactéria Gram negativa, em forma de bacilo, anaeróbico facultativo, que pertence à família *Enterobacteriaceae* (Lacasse, 1998; ICMSF, 2003). A maioria das estirpes de *E. coli* não representa qualquer perigo para o seu hospedeiro uma vez que fazem parte da flora normal do trato intestinal do Homem e de outros animais de sangue quente. Contudo existem algumas estirpes que causam infeções

alimentares e são classificados segundo os seus fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, sintomas clínicos e serologia. Atualmente, os principais grupos de *E. coli* patogénica associada ao consumo de alimentos são *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* produtora de verotoxina (VTEC) nas quais se incluem as estirpes enterohemorrágicas (EHEC) como *E. coli* 0157:H7 (Willshaw, Cheasty & Smith, 2000; Forsythe, 2010; ICMSF, 2003; Jay *et al*, 2005; Meng, Doyle, Zhaot, & Zhaot, 2007; Health Protection Agency, 2011). Para distinguir as diferentes estirpes de *E. coli* utiliza-se a serotipagem, que permite a diferenciação com base nos antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K) (Lacasse, 1998; Willshaw *et al*, 2000; ICMSF, 2003).

O grupo ETEC é conhecido como causador da diarreia dos viajantes. Este microrganismo provoca frequentemente diarreia aquosa (similar à água de arroz) com cólicas abdominais, febre baixa e náuseas em crianças de países menos desenvolvidos e viajantes de países industrializados com boas condições higiénicas para países menos desenvolvidos com baixos padrões de higiene (Forsythe, 2010; FDA, 2012; Viegas, 2009). O microrganismo coloniza o intestino delgado, onde prolifera e produz toxinas que induzem a secreção de fluidos (Forsythe, 2010; FDA, 2012). As estirpes ETEC produzem duas toxinas, uma toxina termoestável (ST) e uma toxina termosensível (LT). Apesar de diferentes estirpes de ETEC poderem produzir uma ou ambas as toxinas, a doença causada por cada toxina é semelhante (Centers for Disease Control, 2005). Nos países com saneamento básico e com práticas de higiene adequadas, esta infeção não é considerada uma doença alimentar grave. A contaminação dos alimentos pode dever-se a manipuladores infetados e a água contaminada com dejetos humanos (Willshaw *et al*, 2000; FDA, 2012). Esta doença aparece 1 a 3 dias após o consumo do alimento contaminado e dura geralmente 3 a 4 dias e, raramente dura mais de três semanas (CDC, 2005).

O grupo EPEC apresenta um mecanismo de virulência que não está relacionado com a excreção de enterotoxinas típicas de *E. coli* e é conhecido por causar a diarreia infantil (FDA, 2012). Este microrganismo tem a capacidade de colonizar o intestino onde causa lesões nas microvilosidades, semelhantes às causadas por *E. coli* O157:H7, não havendo evidência de uma invasão dos tecidos (Forsythe, 2010; ICMSF, 2003). Os sintomas mais comuns incluem vômitos, febre e diarreia aquosa contendo muco, mas não sangue (Forsythe, 2010). Os surtos por EPEC ocorrem sobretudo em lactentes

alimentados por biberão, o que sugere a utilização de água contaminada na hidratação dos leites em países subdesenvolvidos (FDA, 2012).

As estirpes EIEC assemelham-se a *Shigella* na sua atividade bioquímica, antigénica e patológica. A sua ação desenvolve-se na mucosa do cólon, invadindo as células epiteliais, multiplicando-se e eventualmente causando ulceração no intestino (ICMSF, 2003; Jay *et al.*, 2005). A EIEC pode provocar uma doença conhecida por disenteria bacilar, que é caracterizada pelo aparecimento de sangue e muco nas fezes dos indivíduos infetados (FDA, 2012). Outros sintomas da EIEC podem ser cólicas abdominais, vômitos, febre e calafrios (Forsythe, 2010; FDA, 2012). São desconhecidos os alimentos associados ao patogénico EIEC, mas ocorreram alguns surtos relacionados a hambúrgueres e leite não pasteurizado (FDA, 2012).

No que se refere às estirpes do grupo EAEC, provocam diarreia persistente em crianças, durando mais de 14 dias, tanto em países em desenvolvimento como países industrializados (Forsythe, 2010; Bangar & Mamatha, 2007). O mecanismo invasivo característico das estirpes EAEC, envolve a agregação bacteriana, a adesão a células epiteliais intestinais e a elaboração de vários mediadores bacterianos toxigénicos (Bangar & Mamatha, 2007).

O grupo DAEC tem sido associado a diarreia em crianças, mas de forma controversa, pois alguns estudos têm relatado que estirpes de DAEC são encontradas de forma semelhante em crianças com e sem diarreia (Forsythe, 2010; Scaletsky *et al.*, 2002). Os marcadores de virulência da DAEC associados à diarreia também ainda estão por ser esclarecidos (Lopes *et al.*, 2005). Segundo Fratamico e Smith (2006), algumas estirpes de DAEC não são diarreicas, no entanto, se um indivíduo for infetado com uma estirpe diarreica os sintomas são: febre, vômitos e fezes líquidas e mucoides. A diarreia causada por DAEC ocorre mais nos países em desenvolvimento e principalmente em crianças entre 48 e 60 meses de idade (Fratamico & Smith, 2006).

As estirpes VTEC têm sido reconhecidas como importantes agentes de DOA. O serotipo mais conhecido destas bactérias é o O157:H7 que foi pela primeira vez reconhecido como causador de colite hemorrágica em 1982 (Lacasse, 1998; Forsythe, 2010; FDA, 2012). As bactérias deste serovar diferem da maioria das outras estirpes de *E. coli*, devido ao seu crescimento ser diminuído ou nulo a 44 °C, por não fermentarem o sorbitol e não produzirem β -glucuronidase (Willshaw *et al.*, 2000; Forsythe, 2010). A virulência desta bactéria está ligada à produção de uma grande quantidade de uma ou mais toxinas potentes que causam danos severos no lúmen do intestino. Estas toxinas,

referidas como verotoxinas (VT) ou shigatoxinas (*shiga-like* toxina, ST), são idênticas às toxinas produzidas por *Shigella dysenteriae*. Os sintomas desta doença são dores abdominais severas e diarreia que inicialmente é aquosa mas posteriormente torna-se sanguinolenta podendo ainda ocorrer vômitos e febres baixas. Os sintomas persistem durante, mais ou menos, oito dias. Em alguns indivíduos mais sensíveis, como crianças e idosos, pode-se desenvolver a síndrome hemolítico-urémico (HUS) que é caracterizada por uma falha renal e anemia hemolítica, e pode até mesmo provocar a morte (Lacasse, 1998; Forsythe, 2010; Jay *et al.*, 2005; FDA, 2012). O principal reservatório de *E. coli* O157:H7 é o gado bovino e a transmissão para os humanos ocorre através do consumo de alimentos contaminados, principalmente carnes cruas ou pouco cozinhadas e leite cru. A contaminação fecal da água e outros alimentos, bem como contaminação cruzada, durante a manipulação de alimentos, também podem ser responsáveis pela transmissão do microrganismo (Forsythe, 2010).

Em 2011 foram relatados, na UE, 60 surtos devido a *E. coli* patogénicos o que representou 1,1% do total de surtos e um aumento de 93,5% relativamente a 2010. Registaram-se 4.476 casos dos quais 2.524 foram hospitalizados e 54 morreram. Do total destes surtos 14 são de evidência forte e foram devidos *E. coli* VTEC exceto 2 (1 *E. coli* EPEC e outro a *E. coli* não especificado). Foram reportados diferentes serovares VTEC O157 em 7 surtos, VTEC O27:H30 em 1 e a estirpe EAEC e produtora de verotoxina O104:H4 em 4 surtos todos relacionados. Esta última estirpe foi a responsável pelo maior surto deste tipo ocorrido a nível mundial, e que iniciou na Alemanha em Maio de 2011. Foram afetadas 3.793 pessoas, 827 das quais desenvolveram a HUS e 53 morreram (EFSA, 2013). No total este surto envolveu 16 países da Europa e da América do Norte e originou 4.075 casos, 908 dos quais desenvolveram HUS e 50 morreram (WHO, 2011). Em Portugal, em 2006, foi relatado um surto devido ao consumo de sanduíches com carne cozinhada servida num piquenique escolar que afetou 25 pessoas, as quais foram todas hospitalizadas (EFSA, 2007).

Segundo Scallan *et al.*, 2011, nos EUA, estimam-se anualmente 63 000 doentes devido a *E. coli* O157, 2 100 hospitalizações e 20 mortes. Em relação a *E. coli* (não O157), estimam-se 110 000 casos de doença, 270 hospitalizações e 1 morte. *E. coli* ETEC também provocou 18 000 doentes por ano, entre o ano 2000 e 2008.

6.2. Microrganismos Indicadores de Qualidade e Higiene Alimentar

O termo microrganismo indicador pode ser aplicado a qualquer grupo taxonómico, fisiológico ou ecológico de microrganismos, cuja presença ou ausência garante uma evidência indireta relativamente a uma característica particular do histórico da amostra e pode ser usado relativamente à qualidade microbiológica dos alimentos relacionada com o teor total de microrganismos e o seu prazo de validade ou à segurança alimentar quando relacionado com a presença de patogénicos de origem intestinal (Jay *et al.*, 2005; Forsythe, 2010).

Os microrganismos indicadores, através das análises microbiológicas, podem fornecer informações simples, confiáveis e rápidas sobre falhas no processamento, contaminações após o processamento, contaminações ambientais e os níveis gerais de higiene em que os alimentos foram processados e armazenados (Montville & Matthews, 2008). Neste estudo foram utilizados os microrganismos aeróbios mesófilos, fungos, *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli*, como microrganismos indicadores.

6.2.1. Microrganismos Aeróbios Mesófilos

A contagem de microrganismos aeróbios em placa é utilizada para determinar o número total de microrganismos num produto alimentar, incluindo bactérias, bolores e leveduras (Montville & Matthews, 2008). Os microrganismos aeróbios mesófilos constituem um dos melhores indicadores, podendo ser utilizados para avaliar a qualidade sanitária, aceitabilidade organolética (odor, sabor e aspeto), e o respeito pelas boas práticas de fabrico (BPF). Com efeito, os microrganismos mesófilos, na maioria dos casos, são indicadores pobres de segurança alimentar, uma vez que não se correlacionam diretamente com a presença de patogénicos ou toxinas. A existência de uma contagem baixa de mesófilos não significa que a amostra esteja isenta de microrganismos patogénicos ou toxinas, no entanto, se uma amostra estiver altamente contaminada com estes microrganismos, pode ser considerada como um risco potencial para a saúde, embora não diretamente relacionado (Morton, 2001). De um modo geral, contagens elevadas de microrganismos aeróbios mesófilos são sempre pouco desejáveis, na medida em que podem estar associadas a matérias-primas excessivamente contaminadas ou manipulação inadequada dos produtos, limpeza e desinfeção das superfícies inadequadas, bem como com baixa qualidade e reduzido prazo de validade dos alimentos.

6.2.2. Fungos

Dentro do reino dos Fungos, as leveduras podem ser vistas como sendo fungos unicelulares em comparação com os bolores, os quais são multicelulares (Jay *et al.*, 2005). Os fungos são ubiqüitários e por consequência podem contaminar os alimentos, podendo estas serem contaminados no campo, durante o período de cultivo (alimentos de origem vegetal) ou durante a preparação e armazenagem (alimentos de origem vegetal e animal). Estes microrganismos apresentam uma grande capacidade de reprodução e tolerância a baixa a_w , elevadas pressões osmóticas e capacidade de crescerem num leque alargado de temperaturas, fatores que explicam a sua presença em variados géneros alimentícios. Deste modo, estes microrganismos são importantes agentes de deterioração, estimando-se que 5 a 10% da produção mundial de alimentos seja desperdiçada por contaminação fúngica. Por outro lado, algumas espécies de fungos, nomeadamente *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, produzem micotoxinas que são metabolitos secundários tóxicos. Os efeitos para a saúde humana decorrentes da exposição a micotoxinas são variados sendo de referir a hepatotoxicidade, a imunotoxicidade, etc. Alguns destes compostos como as aflatoxinas são reconhecidamente carcinogénicos (Lacasse, 1998; Santos, Venâncio & Lima 1998; Veiga *et al.*, 2009).

6.2.3. Bactérias da família *Enterobacteriaceae*

Taxonomicamente as bactérias da família *Enterobacteriaceae* são bacilos Gram negativos, que fermentam a glicose, são oxidase negativa, geralmente catalase-positiva e usualmente reduzem o nitrato (Kornacki & Johnson, 2001). São bactérias amplamente disseminadas no meio ambiente, nomeadamente no solo, na água e nas plantas, mas também fazem parte da flora intestinal de humanos e animais (Santos, 2009). Os géneros desta família, transmitidos para os alimentos, incluem *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. A contagem destas bactérias permite a avaliação da qualidade geral de um alimento e as condições de higiene presentes durante o processamento dos alimentos. É recomendado para a análise de produtos alimentares, a utilização de *Enterobacteriaceae* em substituição dos coliformes anteriormente avaliados, visto que estes não correspondem a um grupo taxonómico definido e os níveis encontrados variam consoante o método utilizado (Kornacki & Johnson, 2001).

6.2.4. *Escherichia coli*

E. coli é considerado o melhor indicador de contaminação fecal de alimentos, sendo utilizado para determinar a probabilidade da presença de microrganismos patogénicos com origem em matéria fecal (Kornacki e Johnson, 2001; Santos, 2009). O crescimento desta bactéria em alimentos processados é indicativo de que houve um processamento inadequado ou ocorreu uma contaminação posterior ao processamento (Kornacki & Johnson, 2001).

7. Critérios Microbiológicos aplicáveis aos pratos confeccionados

As análises microbiológicas, por si, não garantem a segurança de um produto final analisado, devido a motivos relacionados com a amostragem, metodologia e distribuição dos microrganismos na matriz. A aplicação do Sistema HACCP e a implementação de medidas preventivas, como o cumprimento de Pré-requisitos, faz com que a segurança dos produtos alimentares seja garantida, sendo as análises microbiológicas uma parte do sistema (Santos, Correia, Cunha, Saraiva e Novais, 2005).

Devido à dificuldade de interpretação dos resultados das análises microbiológicas, torna-se necessário estabelecer critérios de segurança harmonizados em matéria de aceitabilidade dos alimentos, nomeadamente no que se refere à presença microrganismos patogénicos, para a proteção da saúde pública e evitar interpretações discordantes.

Podem existir três tipos diferentes de critérios microbiológicos: Leis e Regulamentos, aplicados pelas autoridades nacionais e de cumprimento obrigatório, conduzindo ao emprego de sanções; Especificações Microbiológicas, que são acordos contratuais, utilizadas em trocas comerciais e pretendem garantir a qualidade e a segurança do produto até à data limite de consumo; Valores Guia, que se baseiam em linhas de orientação para avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos, ajudando na identificação de situações que requerem monitorização, garantindo o cumprimento do Sistema HACCP (Santos, 2009).

Em Portugal, não existe legislação no que se refere a critérios destinados à avaliação de produtos prontos a comer. O Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do INSA elaborou Valores Guia para alimentos prontos a comer, preparados em estabelecimentos de restauração coletiva, para o estudo de resultados analíticos, permitindo qualificar o produto segundo níveis de qualidade / segurança (Santos *et al.*, 2005).

As análises microbiológicas realizadas neste estudo tiveram em conta os critérios microbiológicos dos Valores Guia elaborados pelo INSA, e encontram-se explicitados na Tabela 2.

De acordo com estes Valores Guia, os alimentos prontos a comer estão divididos em três grupos de alimentos: o primeiro grupo de alimentos corresponde a refeições, sandes, bolos, sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas, ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada; o segundo grupo de alimentos corresponde a refeições, sandes, bolos, sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria; o grupo três de alimentos corresponde a saladas, vegetais e frutos crus. Neste estudo foram analisados alimentos dos grupos um e dois.

8. Objetivos

Foram objetivos gerais do presente trabalho:

- Avaliar a qualidade microbiológica de pratos cozinhados destinados a grupos de risco (crianças e idosos), preparados em três unidades de restauração diferentes: uma Creche e Jardim de Infância (CJI), uma Unidade de Cuidados Continuados (UCC) e um Lar de Idosos (LI), de uma IPSS do distrito de Setúbal;
- Determinar os conhecimentos em HSA dos colaboradores das três unidades de restauração;
- Avaliar as condições de higiene das unidades e verificar o grau de implementação dos pré-requisitos.

Foram objetivos específicos do presente trabalho:

- Comparar a qualidade higiénica dos pratos cozinhados preparados nas três unidades, de acordo com um perfil microbiano previamente determinado e verificar se existiam diferenças;
- Aplicar um questionário especialmente construído para este tipo de unidades de restauração no âmbito da HSA;
- Averiguar quais as variáveis que interferem no conhecimento em HSA;
- Avaliar a aplicação de pré-requisitos;
- Verificar se, existe relação entre as condições de higiene encontradas e os resultados microbiológicos.

Tabela 2. Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer (Fonte: Santos *et al.*, 2005)

Microrganismo	Grupo de alimentos	Qualidade microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não Satisfatório	Inaceitável / potencialmente perigoso
Microrganismo a 30°C	1	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$> 10^3 \leq 10^5$	$> 10^5$	NA
Leveduras	1 e 2	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
Bolores	1 e 2	≤ 10	$> 10 \leq 10^2$	$> 10^2$	*
<i>Enterobacteriaceae</i>	1	≤ 10	$> 10 \leq 10^2$	$> 10^2$	NA
	2	≤ 10	$> 10 \leq 10^3$	$> 10^3$	NA
<i>Escherichia coli</i>	1 e 2	≤ 10	NA	> 10	NA
Patogénicos					
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	1 e 2	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Bacillus cereus</i>	1 e 2	$\leq 10^2$	$> 10^2 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^5$	$\geq 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	1 e 2	< 10	$\geq 10 \leq 10^3$	$> 10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Salmonella</i>	1 e 2	Ausente / 25g			Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1 e 2	Ausente / 25g	$< 10^2$		$\geq 10^2$

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

1.1. Amostras Analisadas

Neste estudo, foram analisadas 90 amostras de pratos confeccionados, provenientes de 3 cozinhas diferentes (Creche e Jardim de Infância (CJI), Unidade de Cuidados Continuados (UCC) e Lar de Idosos (LI)) de uma IPSS. As amostras foram colhidas dentro da hora do almoço, entre as 11:30 h e 12:30 h, ao longo de 4 meses (Setembro a Dezembro). Normalmente, eram colhidas 3 amostras num dia e colocadas no frigorífico a uma temperatura entre 1 °C e 5 °C, e no dia seguinte eram colhidas mais 3 amostras. Na colheita das amostras, foi respeitada a metodologia descrita na Norma Portuguesa 1828, 1982. O saco para colheita da amostra, tinha uma etiqueta própria, onde se registava o produto, o local e a hora a que cada uma era colhida.

O transporte das amostras para o Laboratório de Microbiologia do DAN no INSA, num período máximo de 2 horas, foi efetuado numa mala térmica que garantiu uma temperatura entre 1 °C e 8 °C e estas foram acondicionadas de modo a evitar a rutura ou derrame, respeitando as regras descritas na Norma ISO 7218, 2007. No Anexo 3 apresenta-se a tabela com a descrição das amostras dos pratos confeccionados estudados.

1.2. Diluentes Utilizados

Na preparação das suspensões iniciais e diluições decimais, foram utilizados o diluente *Buffered Peptone Water* (BPW) e a *Tryptone Salt* (TS) respetivamente (ambos bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França). O cloreto de sódio em ambos os diluentes fornece uma solução isotónica. O pH é mantido a 7,0 devido à presença de um tampão de fosfato. Estes diluentes estão em conformidade com as recomendações da Norma ISO 6887-1, 1999.

1.3. Meios de Cultura e Reagentes Utilizados

1.3.1. Contagem de Microrganismos a 30 °C

Para a contagem de microrganismos a 30 °C, foi utilizado o meio de cultura sólido *Standard Methods Agar* (PCA) (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França). Este meio de cultura é constituído por peptona de caseína (bovino), extrato de levedura, glucose e agar. O PCA é um meio nutritivo que permite o crescimento e contagem da

maior parte dos microrganismos que crescem a 30°C em aerobiose (www.biomerieux.com) (Figura 2).

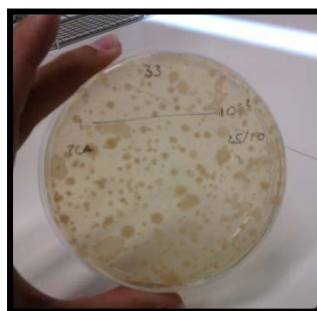


Figura 2. Colônias características de Microrganismos a 30 °C em meio PCA (Fonte: Daniela Fernandes)

1.3.2. Contagem de Fungos

Para efetuar a contagem de Leveduras e Bolores, foi utilizado o meio de cultura sólido *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (DRBC) (Biokar Diagnostics™, Beauvais, França). Este meio é recomendado para a enumeração de leveduras e bolores (Figura 3) que se desenvolvem em produtos destinados ao consumo humano e animal com uma a_w superior a 0,95. A triptona e a glucose garantem o crescimento das leveduras e bolores. Dicloran, agente anti fúngico, e *rose bengal* inibem a invasão de fungos e reduzem o tamanho das outras colônias. *Rose bengal* é facilmente assimilada pelas leveduras, o que facilita a sua contagem, tornando as suas colônias de cor rosa. A presença de cloranfenicol, um antibiótico resistente ao calor, reforça a seletividade do meio contra a maioria das bactérias contaminantes (www.biokar-diagnostics.com).



Figura 3. Colônias características de leveduras e bolores em meio DRBC (Fonte: Daniela Fernandes)

1.3.3. Contagem e Confirmação Bioquímica de *Enterobacteriaceae*

Para a contagem das bactérias da família *Enterobacteriaceae*, foi utilizado o meio de cultura sólido *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG) (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França). O princípio do meio é baseado na habilidade de *Enterobacteriaceae*

fermentarem a glucose rapidamente, fazendo com que haja uma redução do pH do meio, produzindo colónias de coloração roxa/rosa (Figura 4) devido à inclusão do indicador vermelho neutro. A presença simultânea de violeta cristal e sais biliares inibe o crescimento de bactérias Gram positivas (www.biomerieux.com).

Na confirmação bioquímica de *Enterobacteriaceae*, foi utilizado o meio de isolamento não seletivo, *Tryptic Soy Agar* (TSA) (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França). O TSA é um meio nutritivo universal destinado à deteção de microrganismos, permite o crescimento e isolamento de bactérias aeróbias e anaeróbias e favorece o desenvolvimento dos microrganismos fastidiosos (www.biomerieux.com). Para identificação foram utilizados os seguintes testes: reagente para deteção da oxidase (N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilediamina dihidroclorato) (BD, Becton, Dickinson and company, Sparks, USA) e gelose glucosada (Biokar Diagnostics™ Beauvais, França). O teste da oxidase é baseado na produção de uma enzima chamada citocromo oxidase. Esta enzima, na presença de oxigénio atmosférico, oxida a fenilenodiamina presente no reagente, que resulta numa mudança de cor amarela para roxo escuro devido à formação de indofenol (www.bd.com). O meio de gelose glucosada permite a demonstração da fermentação da glucose (com ou sem a produção de gás). O valor nutritivo do meio é devido ao seu teor de peptona de caseína, extrato de levedura e glucose. A fermentação da glucose é demonstrada através da acidificação, que transforma o indicador de pH (púrpura de bromocresol) para amarelo. O cloreto de sódio ajuda a manter o equilíbrio osmótico (www.biokar-diagnostics.com).



Figura 4. Colónias características de *Enterobacteriaceae* em meio VRBG (Fonte: Daniela Fernandes)

1.3.4. Contagem de *Escherichia coli*

Na contagem de *E. coli*, foi utilizado o meio de cultura sólido *Tryptone Bile X-Glucuronide* (TBX) (Bio-Rad™, Marne-la-Coquette, França), que é um meio seletivo para *E. coli* β -D-glucuronidase positiva em produtos alimentares. O resultado é obtido

diretamente pela contagem das colónias características depois de apenas 24 horas de incubação não sendo necessário nenhum passo de confirmação. Este meio contém um substrato cromogénico, o BCIG (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico). A maioria das estirpes de *E. coli* possuem um β -D-glucuronidase que quebra o BCIG, fazendo com que as colónias se tornem azuis (Figura 5). Este meio é seletivo em relação a Gram positivos e flora interferente através da ação combinada da alta temperatura de incubação (44 °C) e sais biliares (www.bio-rad.com).

1.3.4.1. Pesquisa de Factores de Patogenicidade de *Escherichia coli*

No estudo dos fatores de patogenicidade, foram utilizados métodos de biologia molecular e em particular a metodologia *Polymerase Chain Reaction* (PCR) multiplex. Esta deteção com recurso a esta metodologia, foi realizada no Laboratório de *Salmonella*, *E. coli* e outras bactérias entéricas do Departamento de Doenças Infeciosas do INSA.

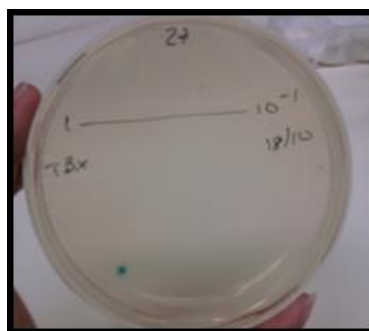


Figura 5. Colónia característica de *Escherichia coli* em meio TBX (Fonte: Daniela Fernandes)

1.3.5. Contagem e Confirmação Bioquímica de *Clostridium perfringens*

Para efetuar a contagem de *C. perfringens*, foi utilizado o meio *Tryptone Sulfite Cycloserine Agar* (TSC) (Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França). Este meio foi descrito por Harmon Kautter e Peeler (1971) para a deteção e contagem de bactérias anaeróbicas redutoras de sulfito em produtos alimentares e água. Os microrganismos redutores de sulfito, reduzem o sulfito de sódio a sulfureto, que reagindo com o citrato de ferro, forma um precipitado preto de sulfureto de ferro em torno das colónias. A flora acompanhante é inibida por *D-Cycloserine* (Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França), (www.biokar-diagnostics.com).

Para a incubação em atmosfera de anaerobiose, foi utilizado um indicador de anaerobiose (bioMérieux[®] SA, Marcy l'Étoile, França), uma jarra de anaerobiose e a saqueta *Anaerogen* 2,5 L (ambos OxoidTM, Basingstone, Hampshire, UK).

Para a confirmação de *C. perfringens* foram utilizados dois meios de cultura líquidos, o *Thioglycollate resazurin* e *Lactose Sulfite* (LS) (ambos, Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França). No meio tioglicolato, a glucose, cistina e extrato de levedura fornecem os fatores de crescimento necessários para o crescimento bacteriano. O tioglicolato de sódio e a cistina são agentes redutores que impedem a acumulação de peróxidos, que são letais para alguns microrganismos. O componente Resazurina é utilizado como indicador redox, este é incolor em meio redutor e torna-se rosa em meio oxidado (www.biokar-diagnostics.com). A especificidade do meio LS para *C. perfringens* é devida, principalmente, à resistência do microrganismo ao sulfito e a sua capacidade de fermentar a lactose com produção de gás. A incubação a $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ assegura a cultura específica de *C. perfringens*, que reduz o metabisulfito de sódio a sulfureto, provocando, juntamente com o citrato de ferro um precipitado preto de sulfureto de ferro que se deposita no fundo do tubo (www.biokar-diagnostics.com).

1.3.6. Contagem e Confirmação Bioquímica de Estafilococos coagulase positiva

O meio de cultura *Baird-Parker* (BP) (bioMérieux[®] SA, Marcy l'Étoile, França), que foi utilizado para a contagem de estafilococos coagulase positiva, é um meio parcialmente seletivo que aplica a capacidade que os estafilococos têm para reduzir o telurito a telureto e de detetarem a lecitinase pela ação proteolítica sobre a lecitina do ovo. O meio contém uma base nutritiva rica que contém três peptonas, glicina e piruvato de sódio, cujo papel é estimular o crescimento das estirpes. A glicina, o cloreto de lítio e a telurito de potássio atuam como agentes seletivos, inibindo a microflora contaminante. O enriquecimento com gema de ovo ajuda na identificação, mostrando a ação da lecitinase. As colónias de *Staphylococcus aureus* aparecem cinzento escuro a preto devido à redução de telurito e rodeadas por halos claros (proteólise da gema de ovo) (Figura 6). Uma zona opaca de precipitação pode aparecer dentro do halo, devido à ação de uma lipase (www.biomerieux.com).

Para a confirmação bioquímica de estafilococos coagulase positiva, foi utilizado o meio *Brain-Heart Infusion* (BHI) e Plasma de Coelho (ambos Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França). O BHI é um meio nutritivo utilizado para a cultura de uma grande variedade de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos, é aqui usado para a deteção de *Staphylococcus aureus*, e consequentemente, para o teste da coagulase com o Plasma de Coelho (www.biokar-diagnostics.com). O Plasma de Coelho permite detetar a

coagulase, que é uma enzima capaz de coagular o plasma sanguíneo, o que foi demonstrado pela primeira vez, por Loeb em 1903 em estafilococos (Morrison, 1962). A presença desta enzima é considerada o principal fator na determinação da patogenicidade de estafilococos. Em teste efetuado em tubo, verifica-se a presença da coagulase através da formação de um coágulo no plasma, indicativo de uma reação positiva (www.biokar-diagnostics.com) (Figura 7).



Figura 6. Colónias características de *Staphylococcus aureus* em meio BP (Fonte: Daniela Fernandes)



Figura 7. Formação de um coágulo no Plasma de Coelho (Fonte: Daniela Fernandes)

1.3.7. Contagem e Confirmação Bioquímica de *Bacillus cereus*

Na contagem de *Bacillus cereus*, foi utilizado o meio *Bacillus cereus agar* (Mossel) (Biokar Diagnostics™, Beauvais, França), introduzido por Mossel e os seus colaboradores em 1967 para a contagem de *B. cereus* em alimentos. Ocorrem duas reações neste meio, a fermentação de manitol e a ação de lecitinase. *B. cereus* não fermenta o manitol, causando a viragem do vermelho fenol para amarelo. A emulsão de gema de ovo esterilizada é utilizada para detetar a presença de lecitinase. A produção de lecitinase revela-se pela formação de um precipitado esbranquiçado à volta das colónias de cor rosa por precipitação da gema de ovo (Figura 8). A polimixina é usada para inibir a microflora acompanhante quando a amostra testada é fortemente contaminada (www.biokar-diagnostics.com).

Para a confirmação bioquímica de *B. cereus*, através da hemólise, utilizou-se o meio *Columbia Agar com 5% Sheep Blood* (COS) (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França) (Figura 9).



Figura 8. Colónia característica de *B. cereus* (Fonte: Daniela Fernandes)



Figura 9. Hemólise de *B. cereus* no meio COS (Fonte: Daniela Fernandes)

1.3.8. Contagem e Confirmação Bioquímica de *Listeria monocytogenes*

Para a contagem de *Listeria monocytogenes*, utilizou-se o meio de cultura *Compass Listeria Agar* (Biokar DiagnosticsTM, Beauvais, França). As peptonas e os fatores de crescimento (extrato de levedura, piruvato de sódio e sulfato de magnésio) favorecem o crescimento excelente desta bactéria. O cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico do meio. *Listeria* hidrolisa o 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranoside (ou X- β -glucósido) e o produto resultante é submetido a uma ação oxidativa em que se forma um precipitado azul no centro das colónias. O fosfatidilinositol é utilizado como um substrato para a deteção de fosfolipase C de *L. monocytogenes*, que quando é degradado, forma à volta das colónias, um precipitado opaco. A microflora contaminante é inibida pela combinação de cloreto de lítio e uma mistura de agentes seletivos que incluem vários antibióticos e um agente anti fúngico (www.biokar-diagnostics.com).

Para o isolamento das colónias suspeitas foi utilizado o meio TSA (descrito em II.1.3.3), e posteriormente, para a confirmação bioquímica, utilizou-se o API *Listeria* (bioMérieux[®] SA, Marcy l'Étoile, França). O API *Listeria* é um sistema padronizado que inclui uma galeria, que comporta 10 microtubos que contêm os substratos desidratados e permitem a realização de testes enzimáticos ou fermentações de açúcares. Durante o período de incubação, produzem-se reações, que são traduzidas pelas mudanças de cor ou reveladas através da adição de reagentes. A leitura é efetuada com um Quadro de Leitura (Anexo 4) e a identificação obtém-se consultando a lista dos perfis do folheto informativo ou com um sistema de identificação online (<https://apiweb.biomerieux.com>).

1.3.9. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Na pesquisa de *Salmonella* spp, foi utilizado o BPW, o caldo *Rappaport Vassiliadis Soja* (RVS), o caldo *Muller-Kauffmann Tetrathionate novobiocin* (MKTTn),

o caldo M, e kit VIDAS[®] SLM (tudo produtos bioMérieux[®] SA, Marcy l'Étoile, França).

O BPW, além de ser o diluente utilizado na preparação das suspensões-mãe das amostras para análise microbiológica, é utilizado para o pré-enriquecimento não seletivo de *Salmonella*, antes do enriquecimento seletivo. Tem como objetivo, a ressuscitação de microrganismos que possam estar presentes em baixo número ou que tenham sofrido algum dano durante processos de conservação ou processamento de alimentos.

O caldo RVS é utilizado para o enriquecimento seletivo, em que o princípio é a presença de peptona de soja, que permite uma melhor estabilidade do pH, cloreto de magnésio que diminui o efeito tóxico do verde malaquite, permitindo uma melhor recuperação de *Salmonella*. O caldo MKTTn é outro meio de enriquecimento seletivo, juntamente com o RVS. Este meio contém sais biliares e o verde brilhante, que inibem o desenvolvimento das bactérias Gram positivas. A produção de tetracionato resultante da ação da solução de iodo-iodeto no tiosulfato de sódio, inibe as bactérias coliformes e a maioria das bactérias intestinais. O caldo M (manose) é utilizado para o pós-enriquecimento de *Salmonella* após cultura nos meios de enriquecimento. A manose e os íons de sal inorgânico estimulam o crescimento de *Salmonella* e o desenvolvimento dos seus flagelos (www.biomerieux.com).

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi efetuada, utilizando um teste imunoenzimático - VIDAS[®], que permite a detecção de antígenos da bactéria pela tecnologia *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA). Fazem parte do kit VIDAS[®], os cones, que servem de fase sólida e também de suporte de pipetagem, e as barretes, que contêm reagentes de reação imunológica prontos a usar. O interior dos cones está coberto de anticorpos anti-*Salmonella* adsorvidos na sua superfície. Se o microrganismo alvo estiver presente na amostra, ocorrerá uma reação antígeno-anticorpo, e posteriormente, pela adição de um conjugado (anticorpo ligado a fosfatase alcalina), bem como de um substrato contendo o fluorocromo 4-Metil-umbeliferil fosfato, ocorrerá a emissão de fluorescência detetada pelo sistema VIDAS[®] (Figura 10). Terminando o teste, os resultados são analisados automaticamente pelo aparelho mini-VIDAS[®] que fornece um valor de teste para cada amostra, e o resultado é apresentado como positivo ou negativo (Anónimo, 2009).

As amostras que revelaram resultados positivos foram sujeitas a testes de confirmação e identificação. Para tal foram utilizados os meios seletivos *Xylose Lysine*

Desoxycholate Agar (XLD) (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França) e *Hektoen Enteric Agar* (HE) (Biokar Diagnostics™, Beauvais, França).

As bactérias do género *Salmonella*, no meio XLD, são diferenciadas dos outros microrganismos, devido à sua capacidade de fermentar a xilose, e posteriormente, descarboxilar a lisina (via lisina-decarboxilase), causando uma subida no pH, tornando o meio básico. As colónias formadas são vermelhas na presença do indicador vermelho fenol. A produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S) ajuda na diferenciação de *Salmonellae*, formando colónias com centros pretos. As espécies que fermentam um dos três açúcares contidos no meio originam colónias amarelas ou laranjas. O desoxicolato de sódio inibe a flora Gram positiva contaminante. O meio HE contém três hidratos de carbono, lactose, sacarose e salicina. A alta concentração de lactose favorece a visualização das enterobactérias, evitando o problema das fermentações tardias. A sacarose e a salicina são adicionadas para assegurar um maior grau de diferenciação e para reduzir a toxicidade causada pelos indicadores de cor, de modo, a obter uma recuperação excelente de *Shigella* e *Salmonella*. O citrato de amónio férrico e o tiosulfato de sódio presentes no meio permitem a deteção da produção de H₂S por *Salmonella*, tornando o centro das colónias preto (www.biokar-diagnostics.com).

Como meio de diagnóstico, foi utilizado o agar *Triple Sugar Iron* (TSI) (BD, Becton, Dickinson and company, Sparks, USA). O TSI é utilizado para a identificação de enterobactérias pela rápida deteção através da fermentação da lactose, glucose (com ou sem produção de gás) e sacarose, bem como a produção de sulfureto de hidrogénio (precipitado negro). A fermentação dos hidratos de carbono é detetada pela presença de gás e pela alteração de cor visível (de vermelho para amarelo) do indicador de pH, vermelho fenol (www.bd.com).

Para a fase de identificação, as colónias suspeitas são isoladas em meio TSA (descrito em II.1.3.3) e posteriormente é utilizado o teste API20E (bioMérieux® SA, Marcy l'Étoile, França). O API20E é um sistema padronizado para a identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos não fastidiosos e engloba 20 microtubos que contêm substratos desidratados (Figura 11). Durante o período de incubação, são produzidas reações que se manifestam através de viragens espontâneas de cor ou reveladas após a adição de reagentes. A leitura é efetuada consultando o Quadro de Leitura (Anexo 5) e a identificação obtém-se com o Catálogo Analítico ou com um programa de identificação online (<https://apiweb.biomerieux.com>).



Figura 10. Aparelho mini-VIDAS



Figura 11. API 20E para a identificação de *Salmonella* spp. (Fonte: Daniela Fernandes)

1.4. Avaliação dos conhecimentos em Higiene e Segurança Alimentar

Para avaliação dos conhecimentos em HSA foi elaborado um questionário especialmente construído para as unidades de restauração da CJI, UCC e LI da IPSS em estudo. O questionário, que se encontra no Anexo 6, é composto por 16 perguntas de resposta rápida e demora cerca de 5 minutos a ser respondido. Previamente foi realizado um pré-teste, que permitiu avaliar o tempo de preenchimento e dificuldades de compreensão/preenchimento.

1.5. Avaliação das Condições de Higiene e dos Pré-Requisitos nas Unidades de Restauração

Para a avaliação das condições de higiene e dos pré-requisitos das três cozinhas em estudo, foi utilizada uma Lista de Verificação, disponibilizada pelo INSA (Anexo 7). Esta Lista de Verificação está de acordo com o Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios e com o Código internacional de práticas recomendadas – Princípios gerais de higiene dos alimentos (CAC, 2003).

A Lista de Verificação está dividida em 5 capítulos:

- Formação, Saúde e Higiene Pessoal;
- Instalações e Equipamentos;
- Refrigeração / Congelação;
- Confeção e Distribuição de Refeições;
- Boas Práticas.

Cada capítulo é constituído por questões individuais a cada uma das quais é atribuída uma avaliação numérica (1 valor) sempre que o requisito é cumprido. No final o número de respostas positivas é apresentado em percentagem de cumprimento.

2. Métodos

Os alimentos eventualmente poderão estar contaminados com microrganismos infecciosos dos Grupos de Risco Biológico de nível 1 e 2, pelo que é importante conhecer bem as regras de Higiene e Segurança do Laboratório, respeitando ainda, as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e os requisitos constantes na Norma ISO 7218, 2007.

Quando se realizam análises microbiológicas é especialmente importante que, apenas os microrganismos que estão presentes nas amostras sejam isolados e enumerados, e que estes microrganismos não contaminem o ambiente (Santos, 2009).

2.1. Receção e armazenamento das amostras no laboratório

As amostras ao chegarem ao laboratório foram rececionadas e armazenadas no frigorífico com uma temperatura controlada a $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem analisadas, respeitando sempre, um período máximo de 48 h após a colheita. A identificação das amostras foi efetuada através da atribuição de um número, em sistema informático, que permite acompanhar as amostras até ao resultado final.

2.2. Colheita e diluição das tomas de amostras

A colheita das tomas das amostras foi efetuada, respeitando criteriosamente as regras de assepsia referidas na Norma ISO 7218, 2007. Em primeiro lugar, lavaram-se e desinfetaram-se as mãos e seguidamente, desinfetou-se toda a área de trabalho com o auxílio de um algodão embebido em álcool a 70%. Posteriormente, abriram-se os sacos das amostras perto da chama do bico de Bunsen, respeitando um raio de 15 cm e, com colheres ou pinças estéreis, foi retirada uma porção representativa (aproximadamente 27g) das amostras e colocadas em sacos esterilizados próprios para *Stomacher* (PE dim 177×304 mm com tela filtrante Seward Limited, London, UK) devidamente identificados com o número da amostra e hora da colheita da toma. De seguida efetuou-se a diluição 1/10 recorrendo ao diluidor automático com balança (*Pinch Diluter* Ref. 7577 - bioMérieux[®] SA, Marcy l'Étoile, França), obtendo-se assim a suspensão-mãe (Figura 12). Todas as suspensões assim obtidas foram a homogeneizar no aparelho *Stomacher*[®] (*Stomacher 400 Circulator*, Seward Limited, London, UK), durante 1 minuto a 230 rotações por minuto (rpm) (Figura 13). Esta diluição (1/10) foi efetuada de acordo com as regras descritas na Norma ISO 6887-1, 1999, de forma a obter uma distribuição tão uniforme quanto possível dos microrganismos contidos nas amostras. A preparação das diluições decimais foi efetuada a fim de reduzir o número de

microrganismos por unidade de volume semeado e para permitir que, após a incubação, se possa observar o crescimento ou a contagem das unidades formadoras de colónias (ufc), como indicado em cada norma específica.

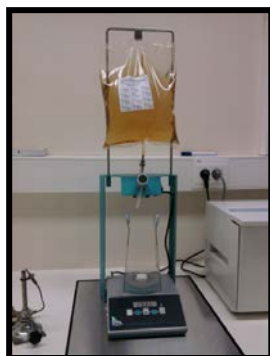


Figura 12. Diluidor automático com balança (Fonte: Daniela Fernandes)



Figura 13. Stomacher (Fonte: Daniela Fernandes)

2.2.1. Preparação das diluições decimais

Na preparação das diluições decimais, retirou-se 1 ml da suspensão inicial (10^{-1}) e colocou-se no tubo com 9 ml de TS, preparando assim a diluição 10^{-2} . A partir da diluição 10^{-2} é preparada de igual modo a diluição 10^{-3} e de seguida a diluição 10^{-4} (no caso de ser um alimento do grupo II), como especificado na Figura 14.

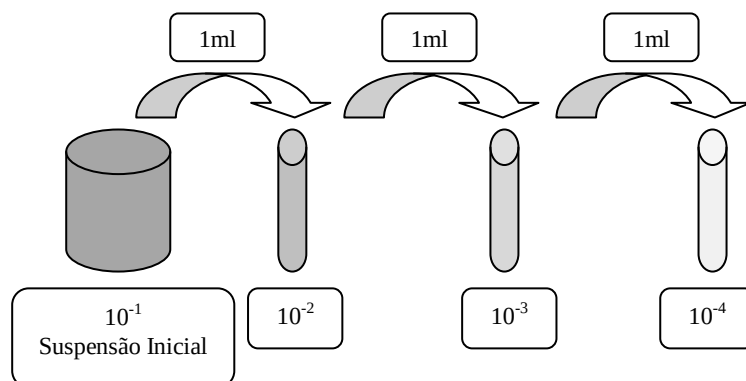


Figura 14. Esquema de preparação das diluições decimais (Fonte: Daniela Fernandes)

2.3. Contagem e Pesquisa dos Microrganismos em Estudo

Para a estimativa da flora microbiana das amostras dos pratos confeccionados em estudo, realizaram-se vários ensaios microbiológicos com diferentes métodos, usando normas ISO. Nas Tabelas 3 a 5 encontra-se o resumo desses métodos.

Tabela 3. Resumo dos métodos utilizados na contagem dos microrganismos em estudo.

Microrganismo	Norma ISO	Meio de Cultura	Diluições		Método	Tempo de Incubação	Temp. de Incubação
			Grupo I	Grupo II			
Microrganismo a 30°C	4833: 2003	PCA	10^{-1} - 10^{-3}	10^{-1} - 10^{-4}	Incorporação (1ml)	72h±3h	30°C±1°C
<i>Fungos</i>	21527-1:2008	DRBC	-	10^{-1} , 10^{-2}	Espalhamento (0,1ml)	5 dias	25°C±1°C
<i>Enterobacteriaceae</i>	21528-2:2004	VRBG	10^{-1} , 10^{-2}	10^{-1} , 10^{-2}	Incorporação (1ml)	24±2h	37°C±1°C
<i>Escherichia coli</i>	16649-2:2001	TBX	2×10^{-1}	2×10^{-1}	Incorporação (1ml)	18h a 24h	44°C±1°C
<i>Clostridium perfringens</i>	7937: 2004	TSC	10^{-1} , 10^{-2}	10^{-1} , 10^{-2}	Incorporação (1ml)	20h±2h	37°C±1°C
Estafilococos coag. Positiva	6888-1:1999	BP	10^{-1} , 10^{-2}	10^{-1} , 10^{-2}	Espalhamento (0,1ml)	24h±2h + 24h±2h	37°C±1°C
<i>Bacillus cereus</i>	7932: 2004	Mossel	10^{-1} , 10^{-2}	10^{-1} , 10^{-2}	Espalhamento (0,1ml)	18h-24h + 18h-24h	30°C±1°C
<i>Listeria monocytogenes</i>	11290-2:1998	Compass Listeria	3×10^{-1}	3×10^{-1}	Espalhamento (0,3+0,3+0,4 ml)	24h±3h + 24h±3h	37°C±1°C

Tabela 4. Resumo do método utilizados na pesquisa da *Salmonella*.

Fases	Meios / Métodos	Tempo de Incubação	Temperatura de Incubação	Norma ISO	
Pré-enriquecimento	Produto + BPW	16h-20h	37°C±1°C	6579:2002	
Enriquecimento	RP, MKT	6h-8h	41,5°C±1°C, 37°C±1°C		
	Meio M	16h-20h	41,5°C±1°C		
Deteção/Resultado	VIDAS® (Ausente ou Presente)				
Confirmação	Isolamento	XLD, HE	18h-24h		37°C±1°C
	Diagnóstico	TSI	18h-24h		37°C±1°C
	Identificação	TSA	18h-24h		37°C±1°C
		API (Chave ID)	18h-24h		37°C±1°C

2.4. Avaliação dos Conhecimentos em Higiene e Segurança Alimentar

2.4.1. População em estudo e Recolha de dados

A partir da população total da IPSS, escolheu-se uma amostra representativa, tendo em conta os objetivos do questionário. O tamanho da amostra é de 30 indivíduos adultos, de ambos os sexos e de vários níveis de escolaridade, provenientes de funções relacionada com a área alimentar (cozinheiras e ajudantes de cozinha, funcionárias do refeitório, pessoal da central de compras, entre outros).

Utilizou-se um questionário do tipo quantitativo como método para recolha de dados, tendo em conta os objetivos do trabalho, o nível de rigor pretendido e o tipo de questões colocadas. O questionário foi auto-preenchido pelos participantes, respeitando a confidencialidade e o anonimato.

Esta recolha foi realizada entre os dias 3 e 20 de Janeiro de 2012.

O questionário foi organizado em duas partes. A primeira parte descreve as características sócio-demográficas (idade, sexo, nível de escolaridade, função desempenhada) e a formação. A segunda parte foi desenhada para obter informações sobre os conhecimentos de HSA, no que diz respeito a: preocupação com a HSA, “o que é um microrganismo” e “o que é o sistema HACCP”, o que são os perigos biológicos (bactérias, fungos, parasitas e vírus), os alimentos mais sensíveis a contaminação por patogénicos, noção sobre desinfeção de alimentos consumidos crus e consumo de alimentos mal cozinhados, duas perguntas sobre temperaturas (frigorífico e congelador) e por último, conhecimento de quais são os grupos de riscos.

2.5. Avaliação das Condições de Higiene e dos Pré-requisitos das Unidades de Restauração

A Lista de Verificação foi aplicada nos dias 10, 11 e 12 de Janeiro de 2012. Algumas das questões previstas não puderam ser avaliadas, visto que, aquando da visita à cozinha, não foi possível observar as situações referentes a essas questões, nomeadamente:

- Pergunta nº6 – Existe um controlo de acesso de pessoal e visitas de modo a prevenir contaminações;
- Pergunta nº10 – Uso correto de luvas descartáveis;
- Pergunta nº63 – Exposição à temperatura ambiente dos géneros alimentícios (sobretudo os de origem animal), durante a sua preparação, inferior a 30 minutos.

Tabela 5. Resumo dos testes de confirmação bioquímica de alguns microrganismos em estudo.

Microrganismo	Colónias Características	1º Procedimento	Tempo de Incubação	Temp. de Incubação	2º Procedimento		Teste Positivo	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Rosadas ou vermelhas com ou sem halo de precipitação	Isolar 5 colónias utilizando uma ansa à superfície do TSA	24±2h	37°C±1°C	Oxidase	Fermentação	Oxidase	Fermentação
					De cada colónia isolada retirar uma porção e aplicar o reagente oxidase	Inocular cada colónia oxidase-negativa num tubo com glucose agar e incubar a 37°C±1°C / 24±2h	Mudança de cor para roxo escuro	Mudança de cor púrpura para amarelo
<i>Clostridium perfringens</i>	Pretas	Retirar 5 colónias e isolar em meio tioglicolato	18h-24h	37°C±1°C (anaerobiose)	Retirar 5 gotas do meio tioglicolato e colocar no meio LS e incubar, em banho de água a 46°C±0,5 °C / 18h-24h		Observação de produção de gás e um precipitado negro	
Estafilococos coagulase positiva	Negras ou cinzentas, convexas e rodeadas de um halo claro (opaco) contendo ou não anel opalescente	Retirar 5 colónias e colocar em meio BHI	24±2h	37°C±1°C	Retirar 0,1 ml do meio BHI para os tubos contendo plasma de coelho já hidratado e incubar a 37°C±1°C / 24±2h		Observação de plasma de coelho coagulado	
<i>Bacillus cereus</i>	Rosas e rodeadas por uma zona de precipitação	“Picar” a colónia com uma ansa e fazer estrias paralelas no meio COS	24±2h	30°C±1°C	-		Hemólise-positiva	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Azuis esverdeadas, rodeadas por um halo de precipitação	Isolar 5 colónias utilizando uma ansa à superfície do TSA	24±2h	37°C±1°C	Para as culturas catalase +, hemólise + e Gram +, efectuar a caracterização bioquímica API Listeria		Confirmação de <i>Listeria monocytogenes</i>	

2.6. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada, utilizando o software SPSS (versão 18.0, 2009, SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). Para a avaliação dos conhecimentos de HSA, além da estatística descritiva, foram utilizados os seguintes testes indutivos: Shapiro-Wilk (tamanho amostral <50) para verificar a normalidade das variáveis em estudo, o teste não paramétrico Mann-Whitney e o teste Exacto de Fisher's para verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis, e uma regressão linear simples (correlação de *Pearson*) para verificar se existe relação entre o número de formações e a idade dos funcionários. Utiliza-se o teste de Mann-Whitney em substituição do teste de *t* quando há violação dos pressupostos de normalidade, tal como, as amostras são demasiado pequenas ou estão medidas numa escala ordinal. No caso deste estudo, utilizou-se o Mann-Whitney devido à dimensão da amostra ser reduzida, mas em alguns casos realizou-se o teste *t* para se confirmar este pressuposto. Para todos os casos, foi verificada a normalidade da amostra.

Para a análise estatística dos microrganismos indicativos de qualidade e segurança alimentar, utilizou-se o teste ANOVA One-Way, para comparar as diferentes médias dos microrganismos aeróbios mesófilos (M30) e *Enterobacteriaceae* (*ENT*) dentro de cada cozinha. Para verificar se existem diferenças significativas, e sendo a amostra reduzida, optou-se por fazer os testes Welch e Brown-Forsythe, que permite confirmar os resultados obtidos pela ANOVA. Também se utilizou a regressão linear simples para verificar se existe alguma relação entre a contagem de M30 e a contagem de *ENT* presentes nas amostras.

Para todos os testes utilizados foi calculado o *p-value*, que é uma probabilidade que mede até que ponto é que os dados da amostra sugerem a rejeição da hipótese nula verdadeira. Quanto menor for o valor do *p*, maior será o grau que a hipótese nula é contradita. Se o *p-value* for superior a 0,05 o resultado do teste não é significativo, ou seja as variáveis em estudo não estão correlacionadas e se o *p-value* for inferior a 0,05 o resultado do teste é significativo (rejeita-se a hipótese nula ou seja as diferenças nos dois grupos para a população não são devidas ao acaso).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Apresentação e Discussão dos Resultados da Análise Microbiológica

No Anexo 3 apresenta-se uma tabela com a descrição das amostras dos pratos confeccionados estudados (90 amostras), incluindo o número da amostra, o nome do produto, o grupo a que pertence, a cozinha em que foi colhido (CJI, UCC e Lar), a data e hora da colheita e a data e hora das análises.

A Tabela 6 mostra a distribuição das amostras por grupos (1 e 2) nas diferentes unidades (CJI, UCC e LI). Como pode observar-se existe só uma ligeira diferença entre o número de amostras do grupo 1 e do grupo 2, o que não deverá influenciar os resultados obtidos.

O Anexo 8 mostra todos os resultados obtidos nas análises microbiológicas, tanto em ufc/g, como em logaritmo (log).

Tabela 6. Distribuição do nº de amostras do Grupo 1 e 2 (Valores Guia INSA) pelas diferentes cozinhas

	Grupo 1	Grupo 2	Total de amostras
	Nº amostras		
Creche e JI	17	13	30
UCC	16	14	30
Lar	14	16	30
Total	47	43	90

1.1. Microrganismos Indicadores de Qualidade e Higiene Alimentar

Na Tabela 7, podem observar-se a mediana e a média das contagens de M30, bem como de *ENT* encontradas em cada uma das cozinhas.

As contagens de M30 variam entre <1 e 4,97 log ufc/g na cozinha da CJI, entre <1 e 5,41 log ufc/g na cozinha da UCC e na cozinha do LI, os valores situam-se entre <1 e 6,48 log ufc/g, este último valor significa que as placas das diluições semeadas se encontravam incontáveis (>300 colónias/placa). Nas contagens de *ENT*, os valores na cozinha da CJI variam entre <1 e 3,60 log ufc/g, enquanto que nas cozinhas da UCC e LI, ambos se situam entre <1 e 4,18 log ufc/g, sendo este último valor relativo a placas incontáveis (>150 colónias/placa). Podemos verificar que a cozinha LI apresenta um nível de contaminação, em média, para estes dois grupos de microrganismos, um pouco

mais elevado. E também é esta cozinha que apresenta os valores mais elevados (máximos) para estes dois grupos de microrganismos.

Tabela 7. Contagem de M30 e de ENT nas diferentes cozinhas.

	Mediana (Log ufc/g)		Média (Log ufc/g)		Amplitude da amostra (Log ufc/g)	
	M30	ENT	M30	ENT	M30	ENT
Creche e JI	2,83	0	2,68	0,91	0 – 4,97	0 – 3,60
UCC	3,81	1,45	3,15	1,64	0 – 5,41	0 – 4,18
LI	4,09	2,83	3,18	2,13	0 – 6,48	0 – 4,18
Total (90 amostras)	3,42	1,30	3,0	1,56	0 – 6,48	0 – 4,18

M30 – Microrganismos aeróbios Mesófilos (30°C); ENT – *Enterobacteriaceae*

Os histogramas apresentados nas Figuras 15 e 16 mostram a frequência dos resultados globais de todas as amostras para M30 e ENT e permitem observar que a distribuição se afasta de uma distribuição normal, em ambos os casos. Permitem ainda verificar que a média total para M30 foi de 3,00 ($\pm 1,85$) e para ENT se situou em 1,56 ($\pm 1,61$).

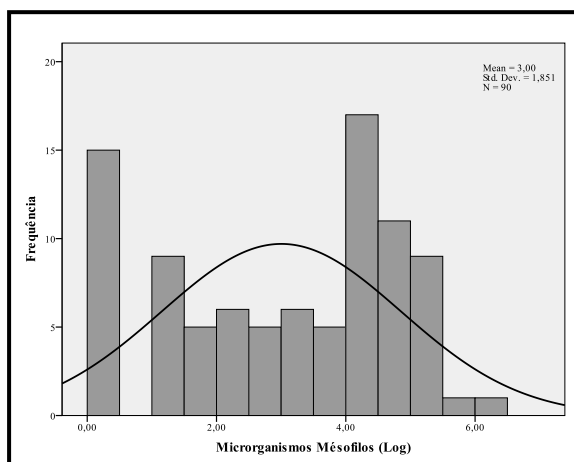


Figura 15. Histograma de Microrganismos Mésófilos (Log).

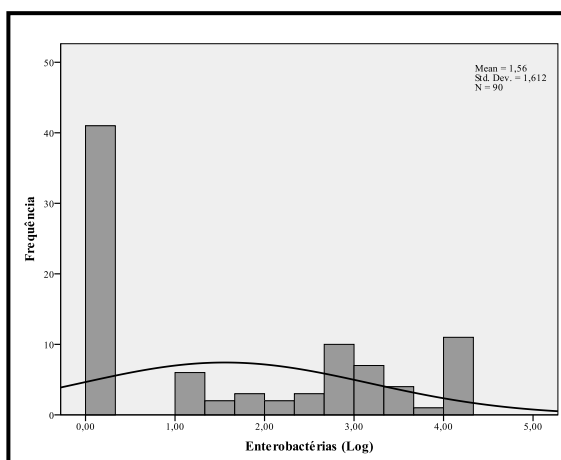


Figura 16. Histograma de Enterobacteriaceae (log).

Os histogramas apresentados nas Figuras 17 e 18 foram realizados com o objetivo de verificar se ao retirar os *outliers*, neste caso, os valores inferiores ao limite de deteção do método (<1 log ufc), a distribuição se aproximaria de uma distribuição normal, facto que se verificou ligeiramente apenas no histograma de ENT.

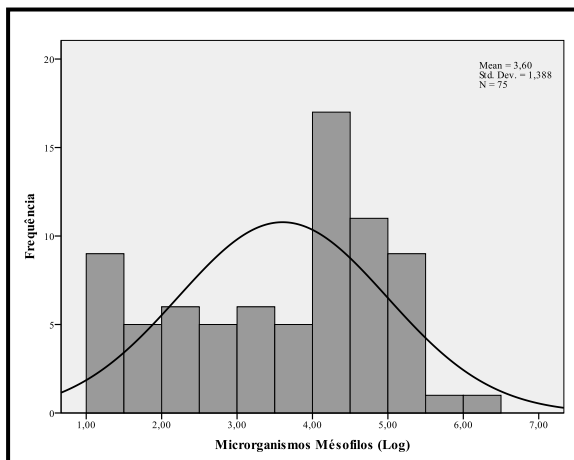


Figura 17. Histograma de Microrganismos Mesófilos (Log) sem outliers (zeros).

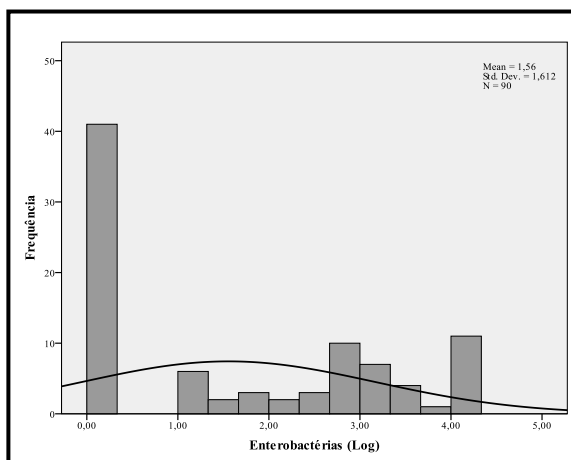


Figura 18. Histograma de Enterobacteriaceae (log) sem outliers (zeros).

Os histogramas das Figuras 19 e 20 mostram a frequência dos resultados das amostras por cozinha (CJI, UCC e LI) para M30 e *ENT*. Como se pode visualizar, para ambos os parâmetros (M30 e *ENT*), os níveis das contagens mais elevados encontram-se no LI. As amostras menos contaminadas encontraram-se na CJI, também para os dois tipos de microrganismos.

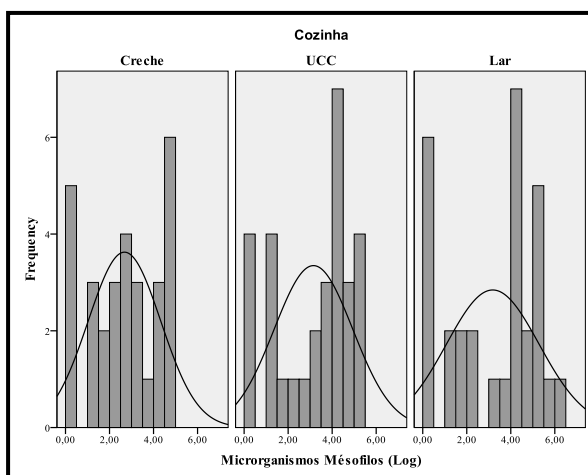


Figura 19. Histograma de Microrganismos Mesófilos (Log) nas diferentes cozinhas.

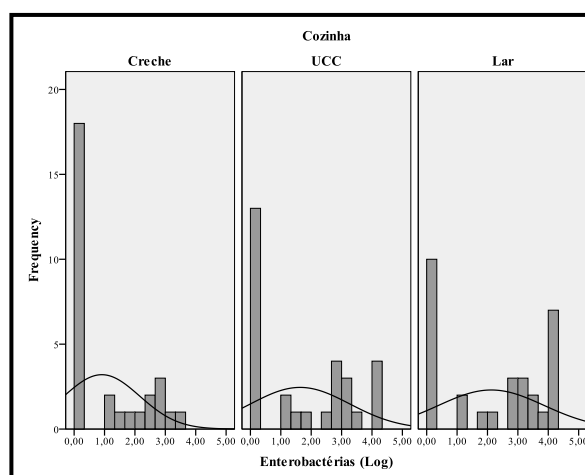


Figura 20. Histograma de Enterobacteriaceae (Log) nas diferentes cozinhas.

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados globais em percentagem para uma mais fácil visualização do número de amostras e respectivas percentagens encontradas nos diferentes níveis de contaminação. Assim, os resultados referidos mostram um nível de contaminação elevada, sendo que 43,3 % (39) das amostras apresentaram contagens de

M30 superiores a 4,0 log ufc/g e 12,2% , e 42,2 % (38) apresentaram contagens de *ENT* superiores a 2,0 log ufc/g. De realçar que, de acordo com os Valores Guia INSA (Tabela 2), para alimentos prontos a comer do grupo 1, as amostras são não satisfatórias, a partir de valores superiores a 4,0 log ufc/g para M30 e 2,0 log ufc/g para *ENT*.

Tabela 8. Níveis detectados de Microrganismos Mesófilos e Enterobacteriaceae.

Níveis (log ufc/g)	Porcentagem de amostras (%)	
	M30	ENT
<1	16,7	45,6
1 – 2	15,6	12,2
2 – 3	12,2	16,7
3 – 4	12,2	13,3
4 – 5	31,1	12,2
≥ 5	12,2	0
Total	100	100

Pretendeu-se então verificar se existiriam diferenças significativas entre os valores encontrados nas três cozinhas em estudo, relativamente aos M30 e *ENT*. Para tal compararam-se as diferentes médias destes dois grupos de microrganismos dentro de cada cozinha. Em relação aos M30, não existem diferenças significativas entre as três cozinhas ($p\text{-value} = 0,505$). Já no que respeita a *ENT*, podem ser observadas diferenças significativas entre as três cozinhas ($p\text{-value} = 0,012$). O teste confirmativo corrobora os resultados visto que se obtiveram $p\text{-value} = 0,472$ e $p\text{-value} = 0,505$, respectivamente para M30, e no caso das *ENT*, $p\text{-value} = 0,009$ e $p\text{-value} = 0,012$, respectivamente. Estes poderão indicar que as BPH são de extrema importância e que na terceira cozinha (cozinha LI), estas BPH serão menos respeitadas.

Efectuou-se uma regressão linear simples com o objectivo de verificar se existe alguma relação entre a contagem de M30 e a contagem de *ENT*. A ideia subjacente era avaliar, se as amostras com contagens elevadas de M30 também continham contagens elevadas de *ENT*. Esta análise descreve a relação estatística entre duas variáveis sendo descrita através do coeficiente de correlação de *Pearson* (r). Este coeficiente é uma medida que varia entre -1 e +1. Se r for positivo e próximo de +1, existe uma relação direta entre as variáveis, se r for negativo e próximo de -1, existe uma relação inversa entre as variáveis, se r for nulo ou aproximadamente nulo, significa que não existe

correlação linear. Assim, o diagrama de dispersão (Figura 21), permite-nos visualizar que existe uma relação entre as duas variáveis, e esta relação é estatisticamente significativa ($r=0,834$; $p\text{-value} = 0$).

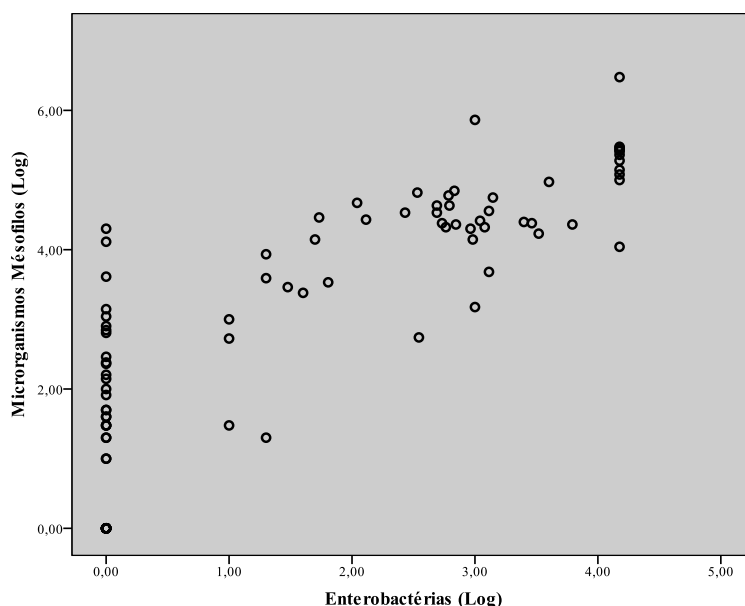


Figura 21. Relação entre a presença de Microrganismos Mesófilos e Enterobacteriaceae.

No que respeita *E. coli*, segundo o Regulamento (CE) 1441, 2007, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, este microrganismo é utilizado como indicador de contaminação fecal e nível de higiene. Igualmente o INSA refere que, as possíveis causas da contagem de *E. coli* ser não satisfatória a nível de qualidade são, a confecção insuficiente, a contaminação após a confecção, a contaminação cruzada e a manipulação deficiente / lavagem de mãos (Maia, 2008).

Neste estudo, em relação à ocorrência de *E.coli*, somente duas amostras (nº18 e nº 27, Anexo 3), ambas do grupo 2, revelaram resultados positivos, mas apresentaram um nível de contaminação bastante baixo ($1,0 \times 10^1$), mas que segundo os critérios microbiológicos utilizados, já é considerado um nível de qualidade não satisfatório. Estas estirpes de *E. coli* não revelaram factores de patogenicidade.

Em relação aos Fungos, estes foram só contabilizados nos alimentos do grupo 2 (43 amostras). No que diz respeito às leveduras não existiu nenhuma amostra que apresentasse resultado não satisfatório e é de referir que os valores mais elevados de leveduras são contabilizados na cozinha LI (amostra nº6 com 3,38 log ufc/g). No que diz respeito aos bolores, uma das amostras apresentou um resultado não satisfatório (amostra nº57 com 2,96 log ufc/g) que pertence também à cozinha LI, como também os valores mais elevados.

1.2. Microrganismos Patogénicos

A Tabela 9 apresenta os resultados encontrados para os microrganismos patogénicos neste estudo.

Tabela 9. Resultados da ocorrência de microrganismos patogénicos.

	Creche e Jardim de Infância	Unidade de Cuidados Continuados	Lar de Idosos
<i>C. perfringens</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus coag. pos.</i>	0	1	0
<i>B. cereus</i>	4	1	0
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	0

Relativamente ao microrganismo *C. perfringens*, verifica-se que nenhuma amostra se revelou positiva, embora uma amostra tenha revelado uma colónia suspeita, que após identificação se revelou negativa.

Em relação a *Staphylococcus coagulase positiva*, somente uma amostra (nº 14 – grupo 1, Anexo 3) revelou uma contagem de $2,0 \times 10^2$ ufc/g, na cozinha UCC, o que levou a classificar a amostra como não satisfatória. As possíveis causas para a contaminação por *S. aureus* são contaminação cruzada, erros na manipulação, contaminação após a confecção, má higiene pessoal ou algum manipulador infectado (Maia, 2008).

Quanto à contagem de *B. cereus*, foram 5 as amostras que revelaram resultado positivo, das quais 4 foram preparadas na cozinha da CJI (nº 13, 73, 76 e 79, Anexo 3) e a outra da cozinha UCC (nº 68, Anexo 3). Em relação aos resultados, todas as amostras revelaram um nível de contaminação muito baixo, $1,0 \times 10^2$ ufc/g para as amostras nº 13, 68, 73 e 76 de que resulta um nível de qualidade satisfatória e $2,0 \times 10^2$ ufc/g para a amostra nº 79, em que neste caso resulta num nível de qualidade aceitável. Nenhuma destas amostras revelou perigo para os utentes destas cozinhas, mas é um sinal para se ter cuidado e ter atenção às causas possíveis para este acontecimento, que podem ser a confecção insuficiente, a contaminação cruzada, os cozinhados expostos à temperatura ambiente durante muito tempo, a refrigeração inadequada ou o reaquecimento de restos (Maia, 2008), para que no futuro não haja contaminações mais elevadas, pondo em perigo crianças e idosos.

Em relação a *Listeria* spp., que pode indicar a presença de *L. monocytogenes*, obteve-se um total de 5 amostras que revelaram algumas colónias suspeitas, mas após a realização de testes de identificação nenhuma das colónias se revelou positiva.

Relativamente à pesquisa de *Salmonella* spp., foram 2 amostras que revelaram resultado positivo no teste imunoenzimático VIDAS[®]. Procedeu-se ao isolamento em meios sólidos, a partir da totalidade dos meios de enriquecimento correspondentes a estas amostras sendo que apenas uma apresentou colónias suspeitas. Na etapa de identificação, o teste API20E revelou um resultado negativo, pois identificou com 99,8% uma estirpe de *Citrobacter*, este acontecimento pode dever-se a algumas reações cruzadas que existam com estirpes de *Citrobacter* e de *Hafnia* (Anónimo, 2009).

1.3. Classificação das amostras perante os Critérios Microbiológicos

Como já foi referido as amostras analisadas foram avaliadas segundo os Valores Guia elaborados pelo INSA, que se encontram na Tabela 2.

Como se pode verificar pela observação da Tabela 10, 28,9 % das amostras obtiveram resultado Não Satisfatório, o que pode indicar que existem alguns parâmetros de HSA que estão a falhar. Tendo em conta que destas 26 amostras não satisfatórias, 21 pertencem ao grupo 2, ou seja, as amostras continham algum alimento cru como por exemplo salada de tomate e alface, pode supor-se que o problema deste resultado poderá estar na má higienização das saladas. No que se refere às 5 amostras não satisfatórias do grupo 1 (amostras nº 14, 35, 39, 47 e 71, Anexo 3), os parâmetros responsáveis por estes resultados foram *S. aureus*, ENT e M30. As possíveis causas de níveis de qualidade não satisfatória para a M30 são a refrigeração inadequada ou a permanência por um elevado período de tempo a temperaturas incorrectas. No caso das ENT, as possíveis causas são a contaminação pós-confecção, contaminação cruzada entre crus e cozinhados e a deficiente higiene na manipulação (Maia, 2008). Para *S. aureus*, as possíveis causas de níveis de qualidade não satisfatória estão especificadas no ponto anterior (III.1.2).

Tabela 10. Frequência e percentagem das amostras segundo a qualificação de acordo com os Valores Guia do INSA.

Resultado da Qualidade Microbiológica	Frequência	Percentagem (%)
Satisfatório	31	34,4
Aceitável	33	36,7
Não Satisfatório	26	28,9
Total	90	100,0

Fazendo uma comparação dos resultados da qualidade microbiológica entre as três cozinhas, como se observa na Figura 22, pode constatar-se que existe uma coincidência entre a cozinha de UCC e LI, que apresentam resultados muito semelhantes em relação aos três parâmetros de avaliação da qualidade. Também se observa que existe uma grande discrepância entre estas duas cozinhas e a cozinha da CJI. As cozinhas UCC e LI têm ambas 12 amostras não satisfatórias, enquanto que a cozinha da CJI tem somente duas amostras não satisfatórias, em que o parâmetro responsável por ambos os resultados foi *ENT*. Sendo as duas amostras do grupo 2, um possível meio de contaminação poderá ser a adição de saladas. Uma das razões para este acontecimento poderá ser o volume de refeições e de utentes que é bastante menor que nas outras duas cozinhas, o que implica menos funcionários a trabalhar e menos contaminação cruzada, outra razão seria que, na cozinha da CJI a comida é confeccionada e logo de seguida é distribuída às crianças, ou seja, existe um período de exposição do alimento à temperatura ambiente muito pequeno. Nas cozinhas UCC e LI, a comida é confeccionada muito cedo devido à distribuição para apoio domiciliário e para outras unidades e existe um enorme fluxo de funcionários dentro das cozinhas, sendo mais difícil o controlo da higiene pessoal e das contaminações cruzadas.

As Tabelas 11 e 12 mostram as percentagens de conformidade com os critérios microbiológicos de referência dos alimentos cozinhados prontos a comer em estudo, e os dados evidenciam uma certa percentagem de amostras não satisfatórias no que diz respeito aos M30 e *ENT*.

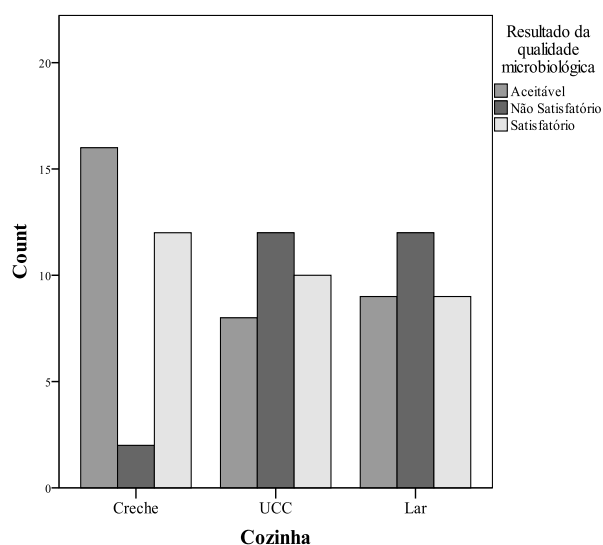


Figura 22. Distribuição das amostras por cozinha e por resultado de qualidade microbiológica.

Tabela 11. Percentagem de conformidade dos alimentos cozinhados prontos a comer para os critérios microbiológicos de referência (parte 1).

Alimentos	Qualidade Microbiológica	Percentagem de Conformidade				
		M30	ENT	<i>E.coli</i>	Leveduras ^a	Bolores ^a
Alimentos prontos a comer	Satisfatório	35,6	48,9	97,8	86,0	88,4
	Aceitável	50,0	26,7	0	14,0	9,3
	Não Satisfatório	14,4	24,4	2,2	0	2,3

^a Somente alimentos do grupo 2 (n =43)

Tabela 12. Percentagem de conformidade dos alimentos cozinhados prontos a comer para os critérios microbiológicos de referência (parte 2).

Alimentos	Qualidade Microbiológica	Percentagem de Conformidade				
		<i>C. perfringens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Alimentos prontos a comer	Satisfatório	100	98,9	98,9	100	100
	Aceitável	0	0	1,1	0	0
	Não Satisfatório	0	1,1	0	0	0

Relativamente aos outros microrganismos verificamos que *E. coli*, foi encontrado em 2,2% das amostras, os bolores em 2,3% das amostras do grupo 2, e *S. aureus* foi encontrado em 1,1% das amostras.

Num estudo realizado por Legnani, Leoni, Berveglieri, Mirolo, & Alvaro, (2004), no grupo de alimentos comparáveis com os nossos grupos 1 e 2, para a contagem de microrganismos a 30 °C, foram analisadas 220 amostras e somente 5% das amostras obtiveram resultado inaceitável. Em substituição das enterobactérias, nesse estudo, foram analisados os coliformes, em que das 220 amostras, 6,6% das amostras estavam inaceitáveis. Também neste tipo de alimentos, 5,4% das amostras obtiveram resultado inaceitável para *E. coli*, 3,3% para *S. aureus* e 0,5% para *L. monocytogenes*. Neste mesmo estudo, nenhuma amostra continha a bactéria *Salmonella*.

Um outro estudo de Santana, Almeida, Ferreira, & Almeida (2009), realizado em escolas, no qual foram avaliados somente microrganismos mesófilos, coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva encontrou valores de M30, entre os 5,0 log ufc/g e 2,5 log ufc/g, valores semelhantes aos encontrados no nosso trabalho. Relativamente a *Staphylococcus* coagulase positiva foram encontrados valores acima de 3,0 log ufc/g superiores aos encontrados neste estudo.

2. Apresentação e Discussão dos Resultados do Questionário sobre Higiene e Segurança Alimentar

No Anexo 6, apresenta-se o questionário aplicado aos colaboradores da IPSS em estudo.

2.1. Características Sociodemográficas e Formação

Dos 30 indivíduos que participaram neste estudo, apenas um era do sexo masculino, o que significa que 96,6% dos participantes eram do sexo feminino e por consequência, não se realizou nenhuma análise estatística em relação a esta variável. Este facto está de acordo com outros estudos publicados. Martins, Hogg & Otero (2012), referem também que os manipuladores de alimentos que trabalham no sector da restauração em Portugal são predominantemente mulheres. Dos 101 participantes questionados por estes autores, 96 % eram do sexo feminino. Santos *et al.* (2008) relatam que dos 124 manipuladores de alimentos participantes no seu estudo, somente um era do sexo masculino. De igual modo um relatório do Instituto para a Qualificação na Formação (IQF), (2005) indica uma forte predominância do sexo feminino, dado que refere que 85% do número total de trabalhadores nesta área de negócio eram do sexo feminino.

No presente estudo a média de idades é de 48,73 anos (variando entre 33 e 62). O nível de escolaridade é, no geral, baixo. Apenas 5 participantes (16,7%) possuem o nível secundário, 11 indivíduos possuem o ensino primário (36,7%) e 14 indivíduos possuem o ensino básico (46,7%). Do total de participantes, 20 são manipuladores de alimentos (12 ajudantes de cozinha e 8 cozinheiras), os restantes 10 exercem outras funções como funcionários de refeitório, da central de compras e responsável de cozinha. Relativamente a estas duas variáveis verifica-se também que estão de acordo com outros resultados publicados. Martins *et al.* (2011), indica no seu estudo que 75% dos participantes tinham idade igual ou superior a 36 anos e 46% tinham seis ou menos anos de educação. No estudo realizado por Santos *et al.* (2008) a média de idades era de 48 anos (variando entre 25 e 68) e o nível de educação era no geral baixo, sendo que 74% dos participantes tinham no máximo seis anos de educação.

Em relação à formação, no total dos 30 indivíduos inquiridos, seis (20%) referiram que nunca tiveram formação em HSA. A média do número de formações por indivíduo é de 1,57 (variando entre 0 e 4 formações). Conforme definido no Regulamento (CE) 852/2004, Capítulo XII, os manipuladores de alimentos devem ser adequadamente treinados para executar suas funções o que requer o levantamento das

suas necessidades de formação. No entanto, a avaliação das necessidades de formação não parece ser generalizada, especialmente nas pequenas empresas (Worsfold, 2005). No estudo realizado por Santos *et al.* (2008), os manipuladores tinham um grau variado de formação. Dos 124 participantes, no estudo realizado por estes autores, 52 (41,9%) não tinham recebido qualquer formação específica para trabalhar com alimentos, sendo este valor é bastante superior ao encontrado no presente estudo. Dos 72 restantes, 51% receberam apenas um, 32% dois e 17% três ou mais cursos de formação. Foram ainda avaliados, os efeitos específicos da formação, em que foi possível demonstrar a importância de receber ou não formação específica e o efeito que os cursos de formação mais recentes tiveram sobre o nível de conhecimentos. Foi salientado nesse mesmo estudo, que nem sempre o fator da formação influenciou os níveis de conhecimento e que se deve ter em conta o número de cursos e a duração total das formações. O mesmo se verificou no presente trabalho. Um outro estudo realizado por Gomes-Neves, Araújo, Ramos & Cardoso (2007), conclui que existe uma necessidade de formação profissional e uma avaliação eficaz do cumprimento das regras de HSA por parte dos manipuladores de alimentos, de modo a evitar erros e falhas da aplicação, verificação e validação do HACCP.

2.2. Conhecimentos em Higiene e Segurança Alimentar

Esta parte foi dividida em 7 temas: conhecimento do que é um microrganismo; conhecimento do que é o sistema HACCP; conhecimento dos agentes patogénicos; conhecimento das temperaturas de refrigeração e congelação; conhecimento dos grupos de risco; outros aspetos relacionados com HSA; relação entre o número de formações e a idade dos funcionários. Sempre que possível, estes temas analisaram-se em comparação com as variáveis idade, número de formações, nível de escolaridade e função desempenhada.

2.2.1. Conhecimento do que é um microrganismo

Pela análise da amostra verificou-se que o grupo que tem conhecimento inerente ao que é um microrganismo tem em média 49,77 [46,37 – 53,17] anos de idade, enquanto o grupo que desconhece o nome microrganismo tem em média 45,88 [40,87 – 50,88] anos de idade. O estudo sugere que não existem diferenças estatisticamente significativas para a média de idades entre os indivíduos que possuem conhecimento sobre o que é um microrganismo e os que não têm esse conhecimento (*p-value* = 0,205). O teste de Mann-Whitney corrobora a conclusão do teste t (*p-value* = 0,173).

Em relação à formação, verificou-se que o grupo que tem conhecimento inerente ao significado do que é um microrganismo tem em média 1,95 [1,51 – 2,39] formações durante o contrato na instituição contra 0,50 [0,13 – 1,13] formações nos funcionários que desconhecem o termo microrganismo. Verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas para a média do número de formações entre os indivíduos que possuem conhecimento sobre o significado de microrganismo e os que não tem esse conhecimento ($p\text{-value} = 0,002$).

Para se poder verificar se existe uma relação entre o nível de escolaridade e os indivíduos que sabem o que é um microrganismo e aqueles que não conhecem, agrupou-se o nível de escolaridade primária e básica, contra o nível de escolaridade secundário. Constatou-se que não existe uma relação entre o nível de escolaridade e o conhecimento do que é um microrganismo ($p\text{-value} = 0,287$).

Para se poder verificar se existe uma relação entre os conhecimentos do termo microrganismo e a função que os indivíduos desempenham, dividiram-se as respostas obtidas em dois grupos, manipuladores de alimentos e não manipuladores de alimentos. Constatou-se que não existe nenhuma relação entre a função que os indivíduos desempenham dentro da Instituição (relacionado com a área alimentar) e o conhecimento do significado de microrganismo ($p\text{-value} = 0,078$).

2.2.2. Conhecimento do que é o Sistema HACCP

A análise dos dados permite verificar que o grupo que tem conhecimento inerente ao HACCP tem em média 47,38 [40,88 – 53,87] anos de idade, enquanto que o grupo que desconhece este Sistema tem em média 49,23 [45,98 – 52,48] anos de idade. Os testes mostram que não existem diferenças estatisticamente significativas para a média de idades entre os indivíduos que possuem conhecimento sobre o HACCP e os que não tem esse conhecimento (Shapiro Wilk: $p\text{-value} = 0,552$; Mann-Whitney: $p\text{-value} = 0,707$).

No estudo da amostra verificou-se que o grupo que tem conhecimento inerente ao HACCP tem em média 1,88 [1,18 – 2,57] formações durante o contrato na instituição contra 1,45 [0,91 – 2,00] formações nos funcionários que desconhecem este Sistema. O estudo mostra que não existem diferenças estatisticamente significativas para o número médio de formações entre os indivíduos que possuem conhecimento sobre o HACCP e os que não tem esse conhecimento (Shapiro Wilk: $p\text{-value} = 0,379$; Mann-Whitney: $p\text{-value} = 0,321$).

No que se refere ao nível de escolaridade constatou-se que existe uma relação entre o nível de escolaridade e o conhecimento do HACCP ($p\text{-value} = 0$). Todos os indivíduos que possuem o nível de escolaridade secundário, têm conhecimentos sobre o Sistema HACCP, enquanto dos 25 indivíduos que possuem o ensino primário/básico, só 3 é que conhecem este Sistema de Segurança Alimentar.

Relativamente à função desempenhada, verificou-se que não existe nenhuma relação entre a função que os indivíduos desempenham dentro da Instituição (relacionado com a área alimentar) e o conhecimento do HACCP ($p\text{-value} = 1,0$).

2.2.3. Conhecimento dos agentes patogénicos

Do total de participantes, 93,3% respondeu que conhece *Salmonella* como agente patogénico ($n = 28$), logo não existe um grande interesse em tirar mais conclusões estatisticamente significativas. De referir que um dos indivíduos que respondeu que não conhecia *Salmonella* teve duas formações, isto pode dever-se à falta de memória das formações recebidas ou ao desinteresse em responder ao questionário.

Em relação à bactéria *E. coli*, só 20% dos participantes é que conhece este agente como patogénico ($n = 6$). A análise estatística sugere, que não há diferenças estatisticamente significativas entre as idades dos indivíduos que têm conhecimento sobre *E. coli* e os indivíduos que não conhecem este agente patogénico ($p\text{-value} = 0,815$). O mesmo acontece, entre o número de formações de indivíduos com conhecimento sobre *E. coli* e os indivíduos que não possuem conhecimento sobre a bactéria ($p\text{-value} = 0,831$). Verifica-se que existe uma relação entre o nível de escolaridade e o conhecimento da bactéria *E. coli* ($p\text{-value} = 0,041$). Por outro lado, os dados sugerem que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a função desempenhada pelos indivíduos e o conhecimento sobre *E. coli* ($p\text{-value} = 0,372$).

Constatou-se que apenas 3 indivíduos (10%) possuem conhecimento relativo a *S. aureus*. A amostra de quem conhece a bactéria tem em média 2,3 formações contra 1,5 formações nos indivíduos que desconhecem. Contudo, estas diferenças não são significativas ($p\text{-value} = 0,212$).

O mesmo acontece com o conhecimento da bactéria *L. monocytogenes*, em que apenas 3 indivíduos possuem conhecimento relativo a este agente patogénico. A amostra de quem conhece a bactéria tem em média 45,3 anos de idade, enquanto os indivíduos que desconhecem este agente patogénico têm em média 49,1 anos de idade. Tal como no caso do agente anterior, estas diferenças não são significativas ($p\text{-value} =$

0,368). Já no que se refere ao nível de escolaridade, verifica-se que existe uma relação entre este e o conhecimento da bactéria *L. monocytogenes* ($p\text{-value} = 0,002$). Os 25 indivíduos que possuem o nível de escolaridade primário/básico, não têm conhecimento deste importante agente patogénico.

Em relação ao parasita *Taenia saginata*, só 23,3% dos participantes tem conhecimento deste agente patogénico ($n = 7$). A amostra de quem conhece o parasita tem em média 46,6 anos de idade, enquanto os indivíduos que desconhecem este agente patogénico têm 49,4 anos de idade. A análise estatística mostra que não há diferenças estatisticamente significativas entre as idades dos indivíduos que têm conhecimento sobre *T. saginata* e os indivíduos que não conhecem este parasita ($p\text{-value} = 0,351$). Os indivíduos que conhecem este agente patogénico têm em média 2,3 formações contra 1,3 formações nos indivíduos que desconhecem. Os testes efetuados demonstram que existem diferenças estatisticamente significativas, entre o número de formações de indivíduos com conhecimento sobre *T. saginata* e os indivíduos que não possuem conhecimento sobre o parasita ($p\text{-value} = 0,048$). Verifica-se que não existe uma relação entre o nível de escolaridade e o conhecimento do parasita *T. saginata* ($p\text{-value} = 0,068$). A mesma conclusão foi constatada para o conhecimento da *T. saginata* ($p\text{-value} = 1,0$) e a função desempenhada pelos indivíduos.

Os agentes patogénicos, como *Aspergillus flavus* e Vírus Norwalk, não foram reconhecidos por nenhum participante.

No estudo realizado por Martins *et al.* (2012), nas questões em que os nomes de microrganismos estão presentes, as percentagens de respostas corretas são muito baixas e as percentagens da resposta “não sei” são as mais elevadas, o que mostra a falta de conhecimento sobre este tema. A mesma falta deste tipo de conhecimento por manipuladores de alimentos tem sido relatada em outros estudos (Marais, Conradie & Labadarios, 2007).

No estudo de Santos *et al.* (2008), a maioria dos manipuladores de alimentos não foi capaz de citar um patogénico de origem alimentar. Mesmo quando foi dada uma lista de seis agentes patogénicos, apenas *Salmonella* foi geralmente reconhecida. *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram reconhecidos como microrganismos patogénicos de origem alimentar apenas por uma pequena parte dos participantes. Agentes patogénicos, tais como, *C. perfringens*, *C. botulinum* e *E. coli* não foram reconhecidos por qualquer participante.

Esta situação foi pior do que a relatada por Angelillo, Viggiani, Rizzo & Bianco (2000) e Ehiri, Morris, & McEwen (1997) para manipuladores de alimentos Italianos e Ingleses, respetivamente. No primeiro estudo, observou-se que 79% e 49% dos participantes reconheciam *Salmonella* e *S. aureus*, respetivamente, e no segundo foi observado que quase todos os participantes tinham um elevado nível de sensibilização para *Salmonella* e *Listeria*.

2.2.4. Conhecimento das temperaturas de refrigeração e congelação

Constatou-se na análise da amostra, que em relação ao conhecimento da temperatura de refrigeração, 76,7% (n = 23) dos participantes respondeu corretamente que esta temperatura deve ser menor que 5 °C, só sete indivíduos é que responderam que esta temperatura deve estar entre 6 °C e 7 °C, e nenhuns dos inquiridos respondeu a terceira hipótese (8 °C a 10 °C). Em relação ao conhecimento da temperatura de congelação, 70% (n = 21) dos participantes respondeu que esta temperatura deve ser menor que -15 °C, só 9 indivíduos responderam que esta temperatura deve estar entre -10 °C e -14 °C e ninguém respondeu à hipótese -7 °C a -9 °C. Estas respostas mostram que os participantes têm uma noção das temperaturas a que um frigorífico ou congelador de uma cozinha de restauração se deve encontrar.

Pela análise da amostra verificou-se que o grupo que tem conhecimento inerente às temperaturas de refrigeração (quem respondeu “menor que 5 °C”) tem em média 49,09 [45,59 – 52,58] anos de idade, enquanto que o grupo que respondeu que a temperatura de refrigeração devia de estar entre 6° C e 7° C tem em média 47,57 [43,41 – 51,74] anos de idade e verificou-se que não existem diferenças significativas entre as idades dos indivíduos que conhecem as temperaturas de refrigeração corretas e a dos indivíduos que desconhecem este facto (*p-value* = 0,572). Relativamente à formação, verificou-se que a amostra de quem conhece a temperatura de refrigeração tem em média 1,7 formações contra 1,0 formações nos indivíduos que desconhecem, parecendo existir uma relação entre estas duas variáveis. Contudo, verifica-se que estas diferenças não são significativas (*p-value* = 0,129). Analisou-se também a existência de alguma relação entre o conhecimento da temperatura de refrigeração e o nível de escolaridade e foi possível concluir que não existe nenhuma ligação entre estas duas variáveis (*p-value* = 0,304). Conclusão idêntica foi obtida com a função desempenhada pelos inquiridos e o conhecimento da temperatura de refrigeração (*p-value* = 0,657).

Os indivíduos que conhecem a temperatura de congelação (quem respondeu “menor que -15° C) tem em média 47,71 [44,50 – 50,93] anos de idade, enquanto o grupo que respondeu incorretamente (-10° C a -14° C) tem em média 51,11 [45,04 – 57,18] anos de idade. Parece existir uma relação entre estas duas variáveis, mas as diferenças são contudo não significativas ($p\text{-value} = 0,297$). Relativamente à formação, os indivíduos que conhecem a temperatura de congelação têm em média 1,6 formações contra 1,4 formações nos indivíduos que desconhecem. Verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas, entre o número de formações de indivíduos com conhecimento sobre a temperatura de congelação e os indivíduos que não possuem esse conhecimento ($p\text{-value} = 0,575$). Constatou-se que não existe nenhuma relação entre o conhecimento da temperatura de congelação e o nível de escolaridade da amostra ($p\text{-value} = 0,286$), tendo-se verificado situação idêntica em relação à função desempenhada pelos indivíduos e o conhecimento da temperatura de congelação ($p\text{-value} = 1,0$).

Neste presente estudo, no geral, os participantes parecem conhecer o tema sobre temperaturas, apesar de serem somente duas perguntas simples e do dia-a-dia. O mesmo não acontece num estudo realizado por Martins *et al.* (2012), dado que o tema de controlo de temperaturas dos alimentos, foi o que revelou um menor nível de conhecimentos com percentagem de respostas corretas abaixo dos 50 %. A análise estatística desse estudo revelou uma diferença significativa entre os resultados do questionário completo e os resultados relacionados ao controlo de temperatura, sugerindo um nível significativamente mais baixo de conhecimento, provavelmente como resultado de um défice de informação / formação sobre este tema. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Marais *et al.* (2007), em que, as respostas às perguntas relativas à segurança alimentar com menor sucesso foram relacionados ao controlo de temperaturas, entre outros. No estudo realizado por Santos *et al.* (2008), o conhecimento do uso de temperaturas reduzidas dividiu os manipuladores de alimentos, em que alguns produziram bons resultados, mas outros revelaram um nível preocupante de desconhecimento. Num outro estudo realizado por Gomes-Neves *et al.* (2007), 59,5% dos manipuladores de alimentos sabia a temperatura correta de congelação, mas apenas 16,9 % dos estudantes do 1º ano e 22,2 % dos estudantes do 3º e 4º ano respondeu corretamente. Além disso, os manipuladores não sabiam a função da temperatura de confeção e da baixa temperatura de armazenamento para controlo dos perigos microbiológicos. Uma vez que o tratamento térmico é frequentemente o ponto

crítico de controlo de um processo de produção, a questão da compreensão da temperatura baixa poderia ser um grande obstáculo à implementação eficaz do sistema HACCP.

O uso incorreto da temperatura (calor ou frio) é um fator comum associado a focos de DOA nas escolas (Daniels *et al.*, 2002). Confeção inadequada, reaquecimento inadequado, temperaturas elevadas de congelamento e refrigeração, e alimentos cozinhados armazenados por muito tempo são as principais falhas detetadas (Medeiros Kendal, Hillers, Chen, & DiMascola, 2001; Daniels *et al.*, 2002).

O controlo da temperatura é uma das principais ferramentas usadas para controlar o crescimento microbiano em produtos alimentares e, quando inadequadamente aplicado, constitui uma das principais causas da proliferação ou sobrevivência de perigos microbianos e subsequentes DOA (Jay *et al.*, 2005; Adams & Moss, 2008; OMS, 2006a). Uma parte importante das medidas preventivas associadas a planos de HACCP na restauração, diz respeito à monitorização e controlo das temperaturas. (Martins *et al.*, 2012). A formação dos manipuladores de alimentos para a utilização correta das temperaturas é uma medida recomendada no *Codex Alimentarius*, (Santos *et al.*, 2008). É necessário reforçar e avaliar a formação sobre este tema.

2.2.5. Conhecimento dos grupos de risco

Em relação ao conhecimento sobre os grupos de risco, a maioria (90%) dos inquiridos sabe que os idosos e as crianças fazem parte destes grupos (em ambos, apenas 3 pessoas desconhecem este facto), e também 100% da amostra sabe que os jovens não fazem parte dos grupos de risco, mas 50% dos indivíduos desconhece que as grávidas também são mais suscetíveis a adquirir uma DOA.

Os indivíduos que reconhecem que os idosos pertencem a grupo de risco têm em média 49,29 [46,42 – 52,17] anos de idade, enquanto que o grupo que desconhece esse facto tem em média 43,67 [24,69 – 62,64] anos de idade. Parece existir uma relação entre estas duas variáveis, mas o teste de Mann-Whitney sugere, que estas diferenças são não significativas ($p\text{-value} = 0,20$). A amostra de quem conhece que os idosos fazem parte dos grupos de risco tem em média 1,7 formações contra 0,3 formações nos indivíduos que desconhecem, parecendo existir uma relação entre estas duas variáveis. O teste de Mann-Whitney veio a confirmar que realmente existem diferenças significativas entre o conhecimento dos idosos dentro dos grupos de risco e o número de formações. ($p\text{-value} = 0,042$). Pelo teste Exato de Fisher's, constatou-se que não existe

nenhuma relação entre o conhecimento dos idosos como pessoas mais sensíveis a contrair uma DOA e o nível de escolaridade dos indivíduos ($p\text{-value} = 1,0$). O mesmo se constatou em relação à função desempenhada pelos indivíduos ($p\text{-value} = 0,251$).

Os indivíduos que reconhecem que as crianças pertencem a um grupo de risco têm em média 47,85 [45,04 – 50,66] anos de idade, enquanto que o grupo que desconhece esse facto tem em média 56,67 [44,16 – 69,17] anos de idade. Parece existir uma relação entre estas duas variáveis, mas o teste de Mann-Whitney sugere, que estas diferenças são contudo não significativas ($p\text{-value} = 0,057$). Na análise da amostra verificou-se que os indivíduos que sabem que os idosos fazem parte dos grupos de risco tem em média 1,6 formações contra 1,0 formações nos indivíduos que desconhecem, o que parece existir uma relação entre estas duas variáveis, mas pelo teste de Mann-Whitney constatou-se que afinal, não existem diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} = 0,354$). Pelo teste Exato de Fisher's, constatou-se que não existe nenhuma relação entre o conhecimento de que as crianças estão entre os indivíduos mais suscetíveis de contrair DOA e o nível de escolaridade dos indivíduos ($p\text{-value} = 1,0$). O mesmo se constatou em relação à função desempenhada pelos indivíduos ($p\text{-value} = 1,0$).

Os indivíduos que reconhecem que as grávidas pertencem aos grupos de risco têm em média 49,07 [45,22 – 52,91] anos de idade, enquanto que o grupo que desconhece esse facto tem em média 48,40 [43,97 – 52,82] anos de idade. O teste de Mann-Whitney sugere, que estas diferenças são contudo não significativas ($p\text{-value} = 0,950$). Na análise da amostra verificou-se que os indivíduos que sabem que as grávidas fazem parte de um grupo de risco tem em média 1,9 formações contra 1,2 formações nos indivíduos que desconhecem, parecendo existir uma relação entre estas duas variáveis, mas pelo teste de Mann-Whitney constatou-se que afinal, não existem diferenças estatisticamente significativas ($p\text{-value} = 0,104$). Pelo teste Exato de Fisher's, constatou-se que não existe nenhuma relação entre o conhecimento de que as grávidas são mais sensíveis a contrair uma DOA e o nível de escolaridade dos indivíduos ($p\text{-value} = 0,330$). O mesmo se constatou em relação à função desempenhada pelos indivíduos ($p\text{-value} = 0,70$).

2.2.6. Outros aspetos relacionados com Higiene e Segurança Alimentar

Outros aspetos relacionados com HSA foram analisados estatisticamente, como por exemplo, os alimentos mais propícios de serem contaminados por bactérias. Após a análise da amostra verificou-se que apenas 4 indivíduos (13,3%) consideram incorretamente que o pão é um dos alimentos propícios de ser contaminado. A maioria das pessoas (83,3%) respondeu corretamente que a carne de vaca crua é um alimento propício a ser contaminado por bactérias. Em relação ao arroz e ao bacalhau, serem alimentos potenciais de contaminação, só um indivíduo é que concorda, mas é um indivíduo diferente para as duas respostas. Em relação aos ovos, 60% da amostra considera que este alimento não é propício de contaminação bacteriana. Em relação à salada de alface e tomate, 46,7% dos indivíduos considera como um alimento potencial de contaminação. Pela análise da amostra, verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre estes alimentos e as variáveis em estudo (idade, número de formações, nível de escolaridade e a função desempenhada). Mas observando as respostas, verifica-se que estas são inconsistentes, podendo dizer-se que no geral existe uma falta de informação em relação a este assunto.

No estudo realizado por Martins *et al.* (2012), o tema sobre os alimentos de alto risco, no geral, obteve um nível de conhecimento baixo. A falta de conhecimento sobre as fontes de contaminação ou alimentos de alto risco pode aumentar as práticas inadequadas na cozinha e armazenamento de alimentos que promovam riscos microbianos e doenças alimentares posteriores. As informações sobre estes temas têm de ser reforçadas.

Num outro estudo realizado por Gomes-Neves *et al.* (2007), que faz uma análise comparativa sobre o conhecimento geral e prático em três grupos relevantes (manipuladores de alimentos, estudantes universitários do 1º ano e estudantes universitários do 3º e 4º ano de cursos relacionados com SA) em Portugal, numa questão relacionada com os grupos de alimentos de alto risco, houve uma grande percentagem que reconhece que a carne picada é uma fonte potencial de intoxicação alimentar (58,2% para os manipuladores de alimentos, 67,4% para os estudantes do 1º ano, e 73% para os estudantes do 3º e 4º ano).

Em relação à preocupação com a HSA, só dois indivíduos (6,7%) é que não se consideram preocupados. É de referir que estes dois indivíduos não são manipuladores de alimentos.

Através da análise, pode-se confirmar que 96,7% da amostra sabe que se deve desinfetar os alimentos consumidos crus, e também reconhece que consumir alimentos mal cozinhados pode trazer algum problema para a saúde.

No estudo realizado por Santos *et al.* (2008), os participantes mostraram um alto nível de conhecimento dos perigos que as saladas preparadas a partir de vegetais podem representar, e consideram os procedimentos de lavagem e desinfecção muito importantes.

2.2.7. Relação entre o número de formações e a idade dos funcionários

Achou-se interessante verificar se haveria algum tipo de correlação entre o número de formações e a idade dos funcionários para o que se efetuou uma regressão linear simples. A ideia subjacente era avaliar, se os indivíduos com mais idade e possivelmente mais anos de casa teriam um maior número de formações, sabendo que através das análises anteriores, o número de formações e a idade influenciam as respostas corretas. Embora visualmente o diagrama de dispersão pareça sugerir uma relação entre as duas variáveis, através da correlação de Pearson pode verificar-se que esta relação não é estatisticamente significativa ($r = 0,275$; $p\text{-value} = 0,142$).

3. Apresentação e Discussão dos Resultados da Avaliação das Condições de Higiene e Pré-Requisitos

A Lista de Verificação foi aplicada nos dias 10, 11 e 12 de Janeiro de 2012, nas três cozinhas em avaliação e encontra-se no Anexo 7. Como referido, algumas das questões previstas não puderam ser avaliadas.

3.1. Cozinhas da Creche e Jardim de Infância, Unidade de Cuidados Continuados e Lar de Idosos

Na cozinha CJI, no capítulo Confeção e Distribuição, apenas se aplicou a pergunta 55 (equipamentos em bom estado de higiene e manutenção), uma vez que esta cozinha não faz transporte de refeições para outras unidades e também não faz manutenção dos alimentos a quente, pois após a confeção, os alimentos são de imediato distribuídos para o refeitório.

As Figuras 23, 24 e 25 mostram os resultados das respostas da aplicação da Lista de Verificação nas cozinhas da CJI, UCC e LI, respetivamente. Globalmente, a média das respostas positivas da cozinha da CJI é de 86,2 %, da cozinha de UCC é de 71,2% e da cozinha de LI é de 65,6% o que significa que, de acordo com o Regulamento (CE) 852/2004, as condições de higiene e pré-requisitos para o CJI e UCC estão bastante

satisfatórias, mas para o LI ainda existem parâmetros que podem ser melhorados (CAC, 2003).

Em relação à formação, todas as funcionárias da cozinha CJI têm formação em higiene dos géneros alimentícios, no entanto, nem todas as formações estão devidamente registadas. Nas cozinhas UCC e LI, nem todas as funcionárias têm formação em higiene dos géneros alimentícios ou não está devidamente registada. Em todas as cozinhas verifica-se que não existe um plano de formação anual. Em relação aos objetos de adorno, a maioria das funcionárias de todas as cozinhas só usavam aliança, o que não é grave, e está de acordo com o estipulado desde que ao lavarem as mãos lavem também a aliança (Wongworawat & Jones).

Sobre as instalações e equipamentos, verificou-se nas 3 cozinhas, que não existe um programa de vigilância do abastecimento de água, nem registo de ensaios da água, embora seja água de rede controlada pela Câmara Municipal. Na cozinha CJI não existe um local próprio somente para o vasilhame, batatas e cebolas, estando estes armazenados conjuntamente com fruta, leite e equipamentos de congelação, mas dentro das condições que têm, não existem melhorias a apontar. A conceção das três cozinhas não permite a marcha sempre em frente (pergunta nº21), que impeça o cruzamento entre circuitos limpos e circuitos sujos, mas somente na cozinha CJI é que se verifica que não existem zonas delimitadas para cada etapa da confeção dos alimentos (por exemplo, preparação de carnes, preparação de legumes, empratamento, etc). Na cozinha UCC verifica-se que o pavimento não é o mais apropriado para uma unidade de restauração, devido à dificuldade de uma limpeza e manutenção eficazes. Na cozinha LI verifica-se que a iluminação é a adequada mas existem lâmpadas sem proteção, as portas de acesso ao exterior não se encontram permanentemente fechadas, e não existe equipamento para manutenção a quente dos alimentos antes da distribuição para o refeitório e transporte para as outras unidades, o que pode implicar consequências graves no que diz respeito ao crescimento bacteriano. É de mencionar a inexistência de um programa de manutenção preventiva dos equipamentos nas três cozinhas.

No que se refere à refrigeração / congelação, em todas as cozinhas existem câmaras de refrigeração suficientes para o armazenamento dos produtos frescos separados por categorias (por exemplo, produtos crus separados dos cozinhados e dos alimentos em descongelação), sendo o único ponto negativo a inexistência de medidas corretivas a algum desvio de temperatura registada, como por exemplo, chamar imediatamente o responsável de manutenção ou a assistência do equipamento e

documentar estas medidas. Na cozinha LI, existem equipamentos que não estão em bom estado de higiene e manutenção, e as temperaturas registadas não são as adequadas.

Em relação à confeção e distribuição de refeições, no caso das cozinhas UCC e LI, não existe a monitorização e o registo das temperaturas da manutenção a quente no início e no fim do turno de trabalho, logo também não estão implementadas medidas corretivas a algum desvio registado. No caso do transporte de refeições para outras unidades, os meios de transporte não garantem a temperatura adequada aos alimentos (mínimo de 57 °C) (FDA, 2013), pois não registam a temperatura dos produtos confeccionados no momento da chegada à outra unidade.

Em relação às boas práticas, nas cozinhas CJI e LI, não é efetuado um controlo adequado na receção dos géneros alimentícios, como, a higiene, registo da temperatura, estado da embalagem e data limite de consumo. Na cozinha UCC, começou a fazer-se esse controlo na receção, faltando apenas o registo das temperaturas dos frescos e congelados. As 3 cozinhas não possuem um sistema de rastreabilidade dos géneros alimentícios (registo dos lotes das embalagens dos alimentos).

Comparando estes resultados com dados publicados pelo INSA referentes ao total das unidades de restauração avaliadas no decorrer dos anos de 2005 e 2006 (INSA, 2006), verificamos que a percentagem de cumprimento para os cinco temas avaliados revelada pelas unidades objeto deste estudo é bastante mais elevada. Segundo o mencionado estudo, a percentagem de cumprimento revelada para Formação, Saúde e Higiene Pessoal foi de 34% (nosso estudo 78%), Instalações e equipamento 52%, (nosso estudo 84%), Refrigeração/congelamento 40% (nosso estudo 80%), Confeção e distribuição 17% (nosso estudo 50%) e Boas Práticas 48% (nosso estudo 80%).

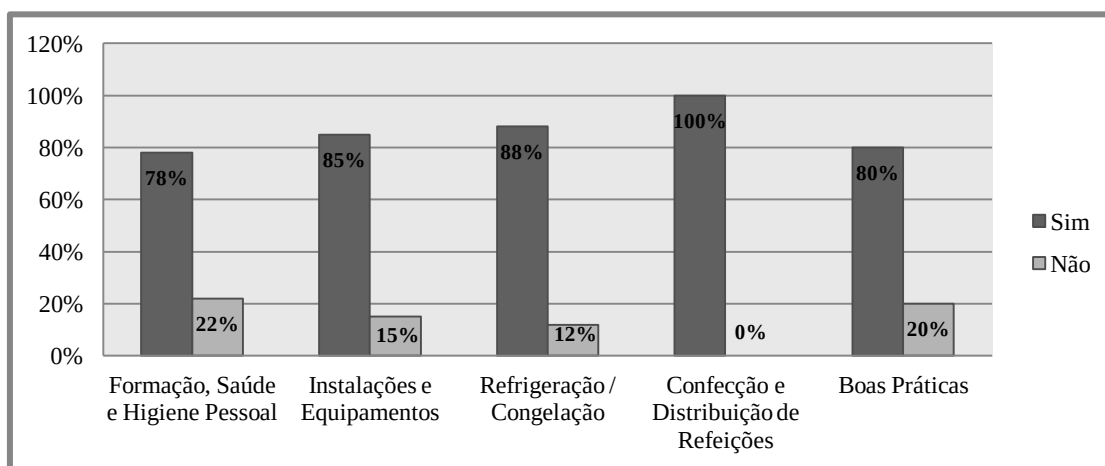


Figura 23. Resultados das condições de higiene e pré-requisitos na cozinha da CJI.

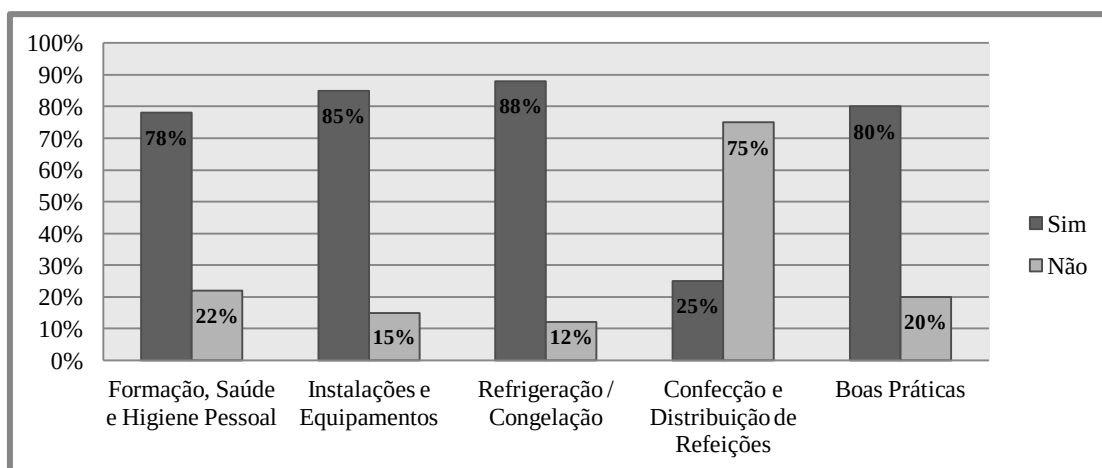


Figura 24. Resultados das condições de higiene e pré-requisitos na cozinha da UCC.

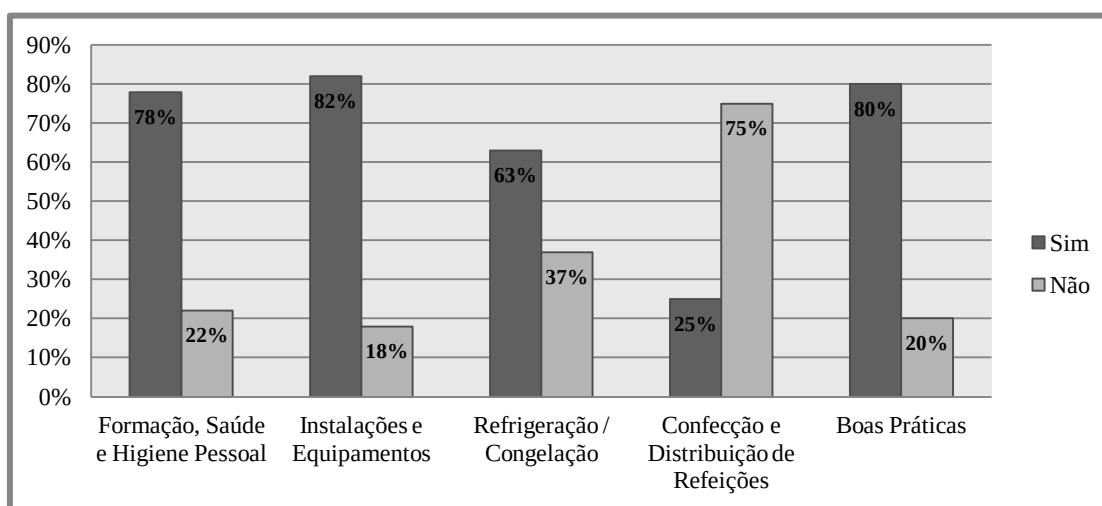


Figura 25. Resultados das condições de higiene e pré-requisitos na cozinha do LI.

IV. CONCLUSÃO

Estudos desta natureza, que envolvem análises microbiológicas a alimentos pronto para consumo, são escassos, principalmente tratando-se de indivíduos pertencentes a grupos de risco, como os idosos e crianças. Através deste estudo, tem-se uma ideia de como se encontram as condições desta IPSS no geral, desde os funcionários aos alimentos, passando pela estrutura da cozinha e todos os pré-requisitos obrigatórios por lei. É bastante importante que estas instituições cumpram ao máximo as regras de HSA, pois as pessoas depositam toda a sua confiança ao colocar lá uma criança ou idoso, podendo estar em risco de algumas DOA.

A primeira conclusão retirada deste estudo é que a incidência de microrganismos patogénicos é bastante baixa, o que significa que estão a ser asseguradas alguns parâmetros de HSA. Não foi detetado nenhum patogénico como *Salmonella*, *C. perfringens* ou *L. monocytogenes*. A incidência de *S. aureus* foi de 1,1%, de *E. coli* foi de 2,2%, não tendo sido detetado nenhum fator de patogenicidade e de *B. cereus* foi de 1,1%, mas em níveis que permitiram uma qualidade microbiológica aceitável. Com estes valores podemos concluir que não existem riscos sérios para a saúde. Relativamente aos Fungos, a incidência foi bastante baixa, não existindo resultados não satisfatórios devido a leveduras, e em relação aos bolores a sua incidência foi de 2,3%. Em relação aos M30 e *ENT*, houve valores muito elevados de contaminação numa percentagem também muito elevada. A incidência destes parâmetros foi 14,4% para os M30 e 24,4 % para *ENT*, o que significa uma qualidade microbiológica não satisfatória, segundo os valores guia do INSA. Estas elevadas percentagens interferem na qualidade dos alimentos, provavelmente, comprometendo também a qualidade nutricional, pois a microbiota e as enzimas presentes, vão degradando os alimentos utilizando muitos nutrientes, portanto o benefício a retirar dos alimentos nutricionalmente estará comprometido (Santos, 2009).

Outra conclusão a ser retirada deste estudo, em relação ao inquérito realizado, é que das quatro variáveis em estudo, somente o nível de escolaridade e o número de formações é que influenciam o nível de conhecimentos sobre HSA. A formação é essencial em qualquer estabelecimento alimentar. A falta de formação específica dos manipuladores pode comprometer algumas etapas na produção dos alimentos e, consequentemente, a qualidade final do produto. As diferentes funcionárias que responderam a este inquérito não mostram o mesmo nível de conhecimento em todos os temas analisados. Esta pesquisa aponta algumas deficiências específicas de

conhecimento dos profissionais manipuladores de alimentos sobre HSA. As áreas de melhoria incluem os perigos microbiológicos, controlo de temperatura, alimentos de alto risco e HACCP. A avaliação dos níveis de conhecimento predominantes indica que os profissionais de alimentação devem ser significativamente mais conscientes da importância que as suas ações podem ter sobre a saúde das crianças e idosos.

É importante identificar e conhecer os pontos fracos do processo de produção dos alimentos, para a melhoria do sistema de HSA e para se ajustarem os programas de formação do pessoal, a fim de obter uma maior segurança na restauração coletiva.

A *Checklist* aplicada neste estudo, permitiu uma avaliação rápida das três cozinhas, especificando as não conformidades de acordo com as fases do processo de produção de alimentos, bem como a avaliação da estrutura física, equipamentos e boas práticas. No geral, as condições de higiene e pré-requisitos são bastante satisfatórias, tendo como principais melhorias a implementar, a formação e planos de formação anuais, a manutenção dos equipamentos, o controlo da temperatura na distribuição das refeições e as medidas corretivas a desvios da temperatura registada.

Se compararmos os resultados a nível da qualidade microbiológica e os resultados da avaliação das condições de higiene e pré-requisitos, é de esperar que estas duas avaliações estejam relacionadas e o que se pode concluir é que isso realmente acontece, pois a cozinha CJI obteve os melhores resultados em ambas as avaliações, e a cozinha LI obteve os piores resultados também em ambas as avaliações. Ressalta-se que esta unidade prepara refeições para distribuição ao domicílio, que não foram objeto deste estudo, que representam um risco acrescido devido à manipulação e técnicas de manutenção a quente que implicam a estreita observância das BPH.

Como conclusão final deste trabalho, a qualidade microbiológica das refeições servidas nesta IPSS é relativamente aceitável, apesar de uma certa percentagem de alimentos ter ultrapassado os limites estipulados para os microrganismos, revelando falta de higiene. Portanto, considerando o facto de que se trata de idosos e crianças, grupos de alto risco, tanto a introdução de BPH, como uma revisão da vigilância relacionada com pontos críticos de controlo serão necessários.

V. BIBLIOGRAFIA

- Adams, M. R. e Moss, M. O. (2008). *Food microbiology*. Cambridge, UK: RSC Publishing.
- Afonso, A. (2006). Metodologia HACCP – Prevenir os acidentes alimentares. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 1 (Novembro 2006), 12-15.
- Angelillo, I.F., Viggiani, N.M., Rizzo, L., e Bianco, A. (2000). Food handlers and foodborne diseases: Knowledge, attitudes, and reported behavior in Italy. *Journal of Food Protection*, 63(3), 381-385.
- Amorim, J. (2006). *Lista de Verificação – Higiene Alimentar na Restauração Coletiva*. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. [Consultado em 28.06.2012]. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/AlimentacaoNutricao/ListaVerificacaoV2.pdf>
- Anónimo (2009). Folheto informativo VIDAS® *Salmonella* (SLM). REF 30 702, 06984 N 2009/03. [Consultado em 2011/09/30]. Disponível em: www.biomerieux.pt
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2, 1751-1773.
- ASAE (2007). *Ficha Técnica de Fiscalização – Estabelecimentos de Restauração e Bebidas*. FTF: 64/GTP/07, Versão: 01/2007, Revisão: 01/2012. [Consultado em 28.06.2012]. Disponível em: http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.asae.pt%2Fwwwbase%2Fwwwinclude%2Fficheiro.aspx%3Faccess%3D1%26id%3D11433&ei=xITFUun7OOKU0AWI04GYCg&usg=AFQjCNEwC5AsVZGmufWv9xwnItB5Y05YIw&sig2=DT_HgHue_kLZzWNsm5DaZQ
- Bangar, R. e Mamatha, B. (2007). Biochemical Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* among Infants with Acute Diarrhea from Manipal, India. *International Journal of Health Sciences*, 1(2), 237-241.
- Batista, P., Pinheiro, G. e Alves, P. (2003). Sistemas de Gestão de Segurança Alimentar. *Manual 5, Ficha Técnica*, Forvisão-Consultoria em Formação Integrada, S.A. [Consultado em 09.10.2011]. Disponível em: http://www.esac.pt/noronha/manuais/manual_5.pdf

- Barros, M. O. (2008). *Espaços de Refeição de Estabelecimentos de Educação do Município de Penafiel – Caracterização higio-sanitária* (Dissertação de Mestrado). Universidade do Porto, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Portugal.
- Beuchat, L. R. (1996). *Listeria monocytogenes*: Incidence on Vegetables. *Food Control*, 7 (4-5), 223-28.
- Bergdoll M.S e Wong A.C.L. (2006). Staphylococcal intoxications. In Riemann, H., Cliver, D.O. (Eds), *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 523-551). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc.
- Bolton, D. J. e Maunsell, B. (2004). *Guidelines for Food Safety Control in European Restaurants*. The Food Safety Department, Teagasc, Dublin, Irlanda.
- CAC - Codex Alimentarius Commission (1993). *Code of hygienic practice for precooked and cooked foods in mass catering*. CAC/RCP 39.
- CAC - Codex Alimentarius Commission (2003). *Recommended International Code of Practice – General Principles of Food Hygiene*. CAC/RCP 1.
- Cahill, S.M., Wachsmuth, I.K., Costarrica, M.L. e Embarek, P.K. (2008). Powdered Infant Formula as a Source of Salmonella Infection in Infants. *Clinical Infectious Diseases* 46, 268–273. DOI: 10.1086/524737.
- Cardiff Caerdydd (2012). *Food Hygiene Guidance for Nurseries, childminders, playgroups and out of school clubs*. Public Protection – Food Safety Team. [Consultado em 28.06.2012]. Disponível em:
http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.cardiff.gov.uk%2FobjView.asp%3FObject_ID%3D25398&ei=kb_FUoq2G-i30QWZyYDQDg&usg=AFQjCNGyw1ZZq6EDyJLg6cJOhenEqqSIIdQ&sig2=wEA7KHl1JpJb5qg_G7fKkA
- Carvalho, R. e Rocha, A. (2008). Projeto de Implementação de um Sistema de Segurança Alimentar baseado na Metodologia HACCP num Centro Social. *Alimentação Humana*, 14 (1), 41-53.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). [Consultado em 22.12.2011]. Disponível em:
http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/enterotoxigenic_ecoli/#how_infect.

- Clark, J., Sharp, M. e Reilly, W.J. (2000). Surveillance of Foodborne Disease. In Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. e Gould, G.W. (Eds.) *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 975-1010), Gaithersburg, EUA: Aspen Publication.
- Daniels, N.A., Mackinnon, L., Rowe, S.M., Bean, N.H., Griffin, P.M. e Mead, P.S. (2002). Foodborne disease outbreaks in United States schools. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 21(7), 623-628.
- D'Aoust, J. Y. (2000). *Salmonella*. In Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 1233-99). Gaithersburg, EUA: Aspen Publication.
- D'Aoust, J. Y. e Mauer, J. (2007). *Salmonella* Species. In Doyle, M. P., Beuchat, L. R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 249-269). Washington, EUA: ASM Press.
- DECO (2009). Idosos – Alimentação desequilibrada. *Proteste* 30 (Abril, 2009), 28-32.
- Decreto Regulamentar n.º 20/2008 de 27 de Novembro. Diário da República n.º 231/2008 – I Série, Ministério da Economia e Inovação, Lisboa.
- Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto. Diário da República n.º 164/2007 – I Série, Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, Lisboa.
- Dias, J. (2008). *A higienização na indústria alimentar*. [Consultado em 20-03-2011]. Disponível em: <http://www.hipersuper.pt/2008/05/30/a-higienizacao-na-industria-alimentar/>
- Duarte, C. (2010). Análise do Sistema de Segurança Alimentar de uma Indústria de Produtos da Pesca Congelados (Dissertação de Mestrado). Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- EFSA (2007). *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006*. EFSA Journal 2007–130, 2-352. doi:10.2903/j.efsa.2007.130r.
- EFSA (2009). *The Community Summary Report Food-borne outbreaks in the European Union in 2007*. EFSA Journal 2009 – 271. doi:10.2903/j.efsa.2009.271r.
- EFSA (2010). *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008*. EFSA Journal; 2010 8(1):1496. doi:10.2903/j.efsa.2010.1496.

- EFSA (2011). *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009*. EFSA Journal 2011;9(3):2090. 10.2903/j.efsa.2011.2090.
- EFSA (2012). *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010..* EFSA Journal 2012;10(3):2597. doi:10.2903/j.efsa.2012.259.
- EFSA (2013). *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011*. EFSA Journal 2013, 11(4):3129. doi:10.2903/j.efsa.2013.3129.
- Ehiri, J.E., Morris, G.P. e McEwen, J.(1997). Evaluation of a food hygiene training course in Scotland. *Food Control* 8(3), 137-147.
- EU-RAIN - European Union Risk Analysis Information Network (2003). *Catering food safety – a responsibility ignored?* Conference Report. Budapest: EU-RAIN. [Consultado em 2011-09-06]. Disponível em:
http://smas.chemeng.ntua.gr/miram/files/publ_272_11_2_2005.pdf
- FAO/WHO (2002). *Global forum of food safety regulators: Foodborne Disease*. Conference Room Document proposed by the World Health Organisation, Marrakech, Morocco, 28 – 30 January 2002. [Consultado em 03-03-2012]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/004/ab524e.htm>
- FAO/WHO (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical Report. *Microbiological Risk Assessment Series n° 5*. [Consultado em 2013.06.18]. Disponível em:
<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241562625.pdf>
- FDA – Food and Drug Administration (2012). *Bad Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*, Second Edition. Disponível em:
<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/default.htm>
[consultado entre 30 de Novembro de 2011 a 2 de Maio de 2012].
- FDA – Food and Drug Administration (2013). *Food Code*. [Consultado em 28.06.2013]. Disponível em:
<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/UCM374510.pdf>

- Forsythe, S. J. (2010) *The Microbiology of Safe Food*. Nova Iorque, EUA: Wiley-Blackwell.
- Fratamico, P.M. e Smith, J.L. (2006). *Escherichia coli* infections. *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 563-577). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc.
- Gomes-Neves, E., Araújo, A.C., Ramos, E. e Cardoso, C.S. (2007). Food handling: Comparative analysis of general knowledge and practice in three relevant groups in Portugal. *Food Control* 18(6), 707-712.
- Gonçalves, M. (2009). *Higiene e Segurança Alimentar em Cantinas Hospitalares e Satisfação dos Utilizadores* (Dissertação de Mestrado). Universidade de Coimbra, Portugal.
- Granum, P.E. (2007). *Bacillus cereus*. In Doyle, M.P. e Beuchat, L.R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 249-69). Washington, EUA: ASM Press.
- Granum, P.E. e Baird-Parker, T.C. (2000). *Bacillus* species. In Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. e Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 1029-39). Gaithersburg, EUA: Aspen Publication.
- Harmon, S.M., Kautter, D.A. e Peeler, J.T. (1971). Improved Medium for Enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology*, 22(4), 688–692.
- HPA - Health Protection Agency (2011). Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). [Consultado em 22.12.2011]. Disponível em: <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/EscherichiaColiO157/>.
- ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2003). *Microorganisms in Foods, vol 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens* (pp. 20-180). Londres, Reino Unido: Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2006). Resultados da Avaliação das Condições de Higiene na Restauração Coletiva 2005-06. Lisboa, Portugal: Departamento de Alimentação e Nutrição. [Consultado em 05.12.2011]. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Paginas/Avaliacao dasCondicoesdeHigiene.aspx>

- ISO 4833:2003. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 degrees C.* (2003). Genève, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 6579:2002. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of Salmonella spp.* (2002). Genève, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 6887-1:1999. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination – Part 1: General Rules for the Preparation of Initial Suspension and Decimal Dilutions.*(1999). Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 6888-1:1999. *Microbiology of Food and Animal Feeding Suffs – Horizontal Method for the Enumeration of of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part 1: Technique using Baird Parker agar.* (1999). Genève, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 7218:2007. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – General Requirements and Guidance for Microbiological Examinations.* (2007). Genève, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 7932:2004. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of Presumptive Bacillus cereus – Colony-count Technique at 30°C.* (2004). Genève, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 7937:2004. *Microbiology of Food and Animal Feeding Suffs – Horizontal Method for the Enumeration of Clostridium perfringens – Colony-count Technique.* (2004). Genève, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 11290-2:1998. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Detection and Enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: Enumeration Method.* (1998). AMENDMENT 1:2004. *Modification of the Isolation Media and the Haemolysis Test, and Inclusion of Precision Data.* (2004). Genève, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 16649-2:2001. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Method for the Enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli – Part 2: Colony-count Technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-*

- glucuronide*. (2001). Genève, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 21527-1:2008. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -- Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95*. (2008). Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.
- ISO 21528-2:2004. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs -- Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count Method*. (2004). Geneve, Suíça: International Organization for Standardization.
- IQF – Instituto para a Qualificação na Formação (2005). O turismo em Portugal. Lisboa: Ministério do Trabalho e Solidariedade Social.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. e Golden, D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*. Nova Iorque, EUA: Springer.
- Kendall, P.A., Hillers, V.V., Medeiros, L. (2006). Food safety guidance for older adults. *Aging and Infectious Diseases*, 42 (1 Maio), 1298-1304. doi: 1058-4838/2006/4209-0013.
- Kirk, M.D., Veitch M.G. e Hall, G.V. (2010). Gastroenteritis and food-borne disease in elderly people living in long-term care. *Clinical Infectious Diseases*, 50(3), 397-404. doi: 10.1086/649878.
- Kornacki, J. L. and Johnson, J. L. (2001). *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In Downes, F.P. e Ito, K. (Eds.), *Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 69-82). Washington, USA: American Public Health Association.
- Labbé, R.G. (2000). *Clostridium perfringens*. In Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. e Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 1010-1035). Gaithersburg, EUA: Aspen Publication.
- Lacasse, D. (1998) *Introdução à Microbiologia Alimentar*, Lisboa, Portugal: Instituto Piaget.
- Lammerding, A. M. e Todd, E. C. D. (2006). Microbial food safety risk assessment. In Riemann, H., Cliver, D.O. (Eds), *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 27-48). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc.

- Legnani, P., Leoni, E., Bervegliieri, M., Mirolo, G. e Alvaro, N. (2004). Hygienic controlo of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipament. *Food Control*, 15, 205-211. doi:10.1016/S0956-7135(03)00.
- Lopes, L.M., Fabbriocotti, S.H., Ferreira, A.J., Kato, M.A., Michalski, J. e Scaletsky, I.C. (2005). Heterogeneity among Strains of Diffusely Adherent *Escherichia coli* Isolated in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 1968-1972.
- Lund, B. M. e O'Brien, S. J. (2011). The occurrence and prevention of foodborne disease in vulnerable people. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(9), 961-973.
- Maia, C. (2008, Março). Critérios Microbiológicos. Comunicação apresentada no Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública APTAC 2008, Lisboa.
- Marais, M., Conradie, N. e Labadarios, D. (2007) Small and micro enterprises – aspects of knowledge, attitudes and practices of managers and food handlers knowledge of food safety in the proximity of Tygerberg Academic Hospital, Western Cape. *South African Journal of Clinical Nutrition*, 20(2), 50-61.
- Martins, R.M., Hogg, T. e Otero, J.G. (2012). Food handlers' knowledge on food hygiene: The case of a catering company in Portugal. *Food Control* 23(1), 184-190.
- McClane, B.A. (2007). *Clostridium perfringens*. In Doyle, M. P., Beuchat, L. R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 423-444). Washington, EUA: ASM Press.
- Medeiros, L.C., Kendal, P., Hillers, V., Chen, G. e DiMascola, S. (2001). Identification and classification of consumer food-handling behaviours for food safety education. *Journal of the American Dietetic Association*, 101(11), 1326-1339.
- Meng, J., Doyle, M.P., Zhaot, T. e Zhaot, S. (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In Doyle, M.P. e Beuchat, L.R. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 249-269). Washington, EUA: ASM Press.
- Moll, M.e Moll, N. (2006). *Compendio de riesgos alimentários*. Zaragoza, Espanha: Editorial Acribia S.A.
- Montville, T. J. e Matthews, K. R. (2008). Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In *Food Microbiology: An Introduction* (pp. 77-83). Washington, USA: ASM Press,

- Morrison, R.B. (1962). The coagulase test in the identification of pathogenic *Staphylococci*. *Journal of Applied Bacteriology*, 25(3), 432-435. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1962.tb04755.x.
- Morton, R. D. (2001). Aerobic Plate Count. In Downes, F.P. e Ito, K. (Eds.), *Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp. 63-68). Washington, USA: American Public Health Association.
- Novais, M. R. (2006). Noções gerais de Higiene e Segurança Alimentar – Boas Práticas e Pré-Requisitos HACCP. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 1 (Novembro 2007),10-11.
- NP1828:1982.Microbiologia alimentar. Colheita de amostras para análise microbiológica. (1982). Caparica: Instituto Português da Qualidade.
- OMS (2006a). *Cinco Chaves para uma Alimentação Mais Segura*. [Consultado em: 20/04/2012]. Disponível em:
http://www.who.int/foodsafety/consumer/manual_keys_portuguese.pdf
- OMS (2006b). *Doenças de Origem Alimentar – Enfoque para Educação em Saúde*. Genebra, Suíça: ROCA.
- Pagotto, F. Corneau, N. e Farber, J.M. (2006). *Listeria monocytogenes* infections. In Riemann, H.P. and Cliver, D.O. (Eds), *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 313-340). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc.
- Pereira, F. (2009). *Auditorias internas aos sistemas de segurança alimentar implementados em cantinas universitárias* (Dissertação de Mestrado), Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Pew Health Group e Center for Foodborne Illness Research & Prevention (2009). *Children and Foodborne Illness*. [Consultado em: 16/08/2011]. Disponível em:
http://www.pewtrusts.org/uploadedFiles/wwwpewtrustsorg/Fact_Sheets/Health_and_Human_Services/Children-and-FBI-Factsheet-11-09.pdf?n=8034
- Pita, J. (2012). *Surto de listeriose entre 2009 e 2011 em Lisboa e Vale do Tejo - investigação e medidas implementadas pela ASAE* (Dissertação de Mestrado), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- Rabsch, W., Hargis, B.M., Tsoilis, R., M., Kingsley, R.A., Hinz, K., Tschäpe, H. e Bäumler, J. (2000). Competitive Exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in Poultry. *Emerging Infectious Diseases*, 6(5), 443-448.

- Regulamento (CE) n.º 178/2002 de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, Jornal Oficial das Comunidades Europeias L 31/1, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Regulamento (CE) 852/2004 de 29 de Abril relativo à higiene dos géneros alimentícios, Jornal Oficial da União Europeia L 139/1, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Regulamento (CE) n.º. 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007, que altera o Regulamento (CE) n.º. 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, Jornal Oficial da União Europeia, L322/12, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Regulamento (CE) 2073/2005 de 15 de Novembro relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, Jornal Oficial da União Europeia, L338/1, Comissão Europeia, Bruxelas.
- Santana, N.G., Almeida, R.C.C., Ferreira, J.S. e Almeida, P.F. (2009). Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. *Food Control*, 20(3), 255-261.
- Santos, M.I. (2009). *Estimativa da flora microbiana e eventuais patogénicos em saladas minimamente processadas (MP) prontas para consumo* (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.
- Santos, M.I. e Cunha, I. (2007). Patogénicos emergentes em alimentos. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 2 (Maio de 2007), 10-14.
- Santos, M.I., Correia, C., Cunha, M.I.C., Saraiva, M.M., Novais, M.R. (2005). Valores Guia para Avaliação da Qualidade Microbiológica de Alimentos Prontos a Comer Preparados em Estabelecimentos de Restauração. *Revista da Ordem dos Farmacêuticos*, 64, 66 – 8.
- Santos, M. I., Venâncio, A., Lima, N. (1998). Fungos Contaminantes na Indústria Alimentar. Braga, Portugal: Micoteca da Universidade do Minho, Centro de Engenharia Biológica.
- Santos, M.J., Nogueira, J.R., Patarata, L. e Mayan, O. (2008). Knowledge levels of food handlers in Portuguese school canteens and their self-reported behavior towards food safety. *International Journal of Environmental Health Research*, 18(6), 387-401. DOI:10.1080/09603120802100212.

- Saraiva, M., Cunha, I.C, Bonito, C.C, Pena, C., Toscano, M.M., Lopes, T.T., Sousa, I. e Calhau, M.A. (2012). First case of infant botulism in Portugal. *Food Control*, 26(1), 79-80. doi:10.1016/j.foodcont.2012.01.010
- Scaletsky, I.C., Fabbriotti, S.H., Carvalho, R.L., Nunes, C.R., Maranhão, H.S., Morais, M.B. e Fagundes-Neto, U. (2002). Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 645-648.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M., Roy, S.L., Jones, J.L. e Griffi, P.M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17(1), 7-15.
- Schraft H. e Griffiths M.W. (2006). *Bacillus cereus* gastroenteritis. In Riemann, H., Cliver, D.O. (Eds), *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 563-577). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc.
- Schoeni, J.L. e Wong, A.C.L. (2005). *Bacillus cereus* Food Poisoning and its Toxins. *Journal of Food Protection*, 68(3), 636-48.
- Seo, K. S. e Bohach, G. A. (2007). *Staphylococcus aureus*. In Doyle, M. P. e Beuchat, L. R. (Eds), *Food microbiology fundamentals and frontiers* (pp. 493-513). Washington, EUA: ASM Press.
- Socket, P. N e Rodgers, F. G. (2001). Enteric and foodborne disease in children: A review of the influence of food and environment related risk factors. *Paediatric Child Health*, 6(4), 203-209.
- Strausbaugh, L.J. Sukumar, S.R. e Joseph, C.L. (2003). Infectious disease outbreak in nursing homes: an unappreciated hazard for frail elderly persons. *Aging and Infectious Diseases*, 36 (1 April), pp. 870-876. doi: 1058-4838/2003/3607-0009.
- Swaminathan, B., Cabanes, D., Zhang, W. e Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes*. In Doyle, M.P. e Beuchat, L.R. (Ed.) *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (pp. 249-69). Washington, EUA: ASM Press.
- Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M.B., Seabra, M.J., Borges, M., Fernandes, P., Nunes, S. (2009). *Perfil de Risco dos Principais Alimentos Consumidos em Portugal*, Direção de Avaliação e Comunicação dos Riscos, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. [Consultado em 10.04.2011]. Disponível em <http://www.asae.pt/aaaDefault.aspx?f=3&back=1&id=7994>
- Viegas, S. (2009). *Alterações do estado de saúde associadas à alimentação*. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Dr.

- Ricardo Jorge. [Consultado em 30.05.2012]. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Paginas/AlteracoesSaudeAlimentacao.aspx>
- Veiros, M.B., Proença, R.P.C., Santos, M.C.T., Kent-Smith, L. e Rocha, A. (2009). Food safety practices in a Portuguese canteen. *Food Control*, 20, 936-941. doi:10.1016/j.foodcont.2009.02.002.
- Walker, E., Pritchard, C. e Forsythe, S. (2003). Food handlers' hygiene knowledge in small food businesses. *Food Control* 14, 339-343.
- Wesley, I. V. (2009). Public Health Impact of Foodborne Illness: Impetus for the International Food safety Effort. In Heredia, N., Wesley, I., Garcia, S. (Eds.), *Microbiologically Safe Foods* (pp. 1-13). Hoboken, EUA: John Wiley and Sons, Inc.
- Willshaw, G.A., Cheasty, T. e Smith, H.R. (2000). *Escherichia coli*. In Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food* (pp. 1136-1177). Gaithersburg, EUA: Aspen Publication.
- WHO (2000). Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. *7th Report (1993-1998), Country Reports: Portugal*.
- WHO (2003). Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. *8th Report (1999-2000), Country Reports: Portugal*.
- WHO (2011). Outbreaks of E. coli O104:H4 infection: update 30. [Consultado em 28.02.2013]. Disponível em: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/emergencies/international-health-regulations/news/news/2011/07/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection-update-30>
- WHO (2012) Foodborne Diseases. [Consultado em 28.02.2012]. Última atualização em 2012. Disponível em http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/en/
- Wongworawat, M. D. e Jones, S. G. (2007). Influence of rings on the efficacy of hand sanitization and residual bacterial contamination. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 28(3), 351–353.
- Worsfold, D. (2005). A survey of food safety training in small food manufacturers. *International Journal of Environmental Health Research*, 15(4), 281-288.
- Yoon, Y., Kim, S. R., Kang, D. H., Shim, W. B., Seo, E., Chung, D. H. (2008). Microbial Assessment in School Foodservices and Recommendations for Food Safety Improvement. *Journal of Food Science*, 73(6), 304-313.

ANEXOS

1. Matriz (probabilidade x severidade):

Probabilidade de Ocorrência (P)	Alta (3)	P×S = 3	P×S = 6	P×S = 9
	Média (2)	P×S = 2	P×S = 4	P×S = 6
	Baixa (1)	P×S = 1	P×S = 2	P×S = 3
		Baixa (1)	Média (2)	Alta (3)
		Severidade (S)		

2. Árvore de decisão HACCP:



* Avançar para o perigo seguinte no processo identificado

** Níveis aceitáveis e inaceitáveis têm que ser determinados dentro dos objectivos globais ao identificar os PCC's do plano de HACCP

3. Tabela com a descrição das amostras dos pratos confeccionados estudados:

Número da amostra	Amostra analisada	Grupo da amostra	Local da colheita	Dia da colheita	Hora da colheita	Dia da análise	Hora da análise
1	Massinha de Cação	I	Creche e Jardim Infância	05-09-11	11:33	06-09-11	11:37
2	Massinha de Cação	I	U.C.C	05-09-11	12:00	06-09-11	11:41
3	Pataniscas de Bacalhau c/ arroz de feijão	I	Lar Idosos	05-09-11	12:25	06-09-11	11:44
4	Frango estufado c/ arroz branco	I	Creche e Jardim Infância	12-09-11	11:45	13-09-11	14:43
5	Frango assado c/ arroz de cenoura e salada de alface e tomate	II	U.C.C.	12-09-11	12:11	13-09-11	14:47
6	Frango assado c/ puré e salada de tomate	II	Lar Idosos	12-09-11	12:31	13-09-11	14:50
7	Maruca no forno c/ batata cozida e salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	13-09-11	11:26	14-09-11	10:34
8	Maruca no forno c/ batata cozida e salada de alface	II	U.C.C.	13-09-11	11:50	14-09-11	10:44
9	Maruca no forno c/ batata cozida e salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	13-09-11	12:14	14-09-11	10:47
10	Caldeirada de Abrótea	I	Creche e Jardim Infância	19-09-11	11:45	20-09-11	14:33
11	Caldeirada de Abrótea c/ salada de alface e tomate	II	U.C.C.	19-09-11	12:07	20-09-11	14:37
12	Salada Russa de Atum, ervilhas, cenoura, ovo e batata	I	Lar Idosos	19-09-11	12:23	20-09-11	14:41
13	Frango de molho c/ esparguete e salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	20-09-11	11:26	21-09-11	11:20
14	Frango estufado c/ esparguete	I	U.C.C.	20-09-11	11:46	21-09-11	11:24
15	Frango assado c/ arroz de cenoura e salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	20-09-11	12:02	21-09-11	11:30
16	Arroz de Pato	I	Creche e Jardim Infância	26-09-11	11:39	27-09-11	14:07
17	Arroz de Pato c/ salada de alface e tomate	II	U.C.C.	26-09-11	12:04	27-09-11	14:11
18	Arroz de Pato c/ salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	26-09-11	12:30	27-09-11	14:13
19	Peru estufado c/ arroz branco e ervilhas	I	Creche e Jardim Infância	10-10-11	11:34	11-10-11	14:38
20	Peru de molho c/ puré, ervilhas e salada de alface e tomate	II	U.C.C.	10-10-11	12:00	11-10-11	14:40
21	Sopa da Pedra (batata, cenoura, feijão verde, feijão vermelho, couve, carne de porco e toucinho)	I	Lar Idosos	10-10-11	12:16	11-10-11	14:44
22	Massinha de Cação	I	Creche e Jardim Infância	11-10-11	11:26	12-10-11	10:32
23	Perca no forno c/ batata cozida	I	U.C.C.	11-10-11	11:48	12-10-11	10:35
24	Massinha de Perca c/ salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	11-10-11	12:02	12-10-11	10:38
25	Bacalhau assado no forno c/ batata cozida e salada de tomate	II	Creche e Jardim Infância	17-10-11	11:35	18-10-11	14:40
26	Bacalhau assado no forno c/ batata cozida e salada de alface e tomate	II	U.C.C.	17-10-11	12:15	18-10-11	14:45
27	Caldeirada de Choco c/ salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	17-10-11	12:25	18-10-11	14:55
28	Panados de Frango com arroz de cenoura e salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	18-10-11	11:25	19-10-11	10:29
29	Febras c/ arroz de cenoura	I	U.C.C.	18-10-11	11:50	19-10-11	10:33
30	Frango frito c/ arroz de coentros	I	Lar Idosos	18-10-11	12:05	19-10-11	10:35
31	Arroz à Valenciana (salsicha, carne de vaca, ervilhas e cenoura)	I	Creche e Jardim Infância	24-10-11	11:48	25-10-11	14:50
32	Arroz à Valenciana (carne de vaca, porco e frango, ervilhas, cenoura e chouriço) c/ salada de alface e tomate	II	U.C.C.	24-10-11	12:10	25-10-11	14:53
33	Arroz à Valenciana (carne de vaca e porco, ervilhas, cenoura e chouriço) c/ salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	24-10-11	12:27	25-10-11	14:57
34	Bacalhau espiritual c/ salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	25-10-11	11:30	26-10-11	11:35
35	Bacalhau espiritual	I	U.C.C.	25-10-11	11:53	26-10-11	11:38
36	Bacalhau espiritual c/ salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	25-10-11	12:06	26-10-11	11:41
37	Meia Desfeita (Bacalhau cozido, batata, grão e ovo)	I	Creche e Jardim Infância	02-11-11	11:45	03-11-11	14:26
38	Bacalhau cozido c/ batata, ovo, grão e cenoura	I	U.C.C.	02-11-11	12:10	03-11-11	14:30
39	Bacalhau cozido c/ batata, ovo, grão, cenoura e brócolos	I	Lar Idosos	02-11-11	12:30	03-11-11	14:33
40	Frango assado c/ massa espiral	I	Creche e Jardim Infância	03-11-11	11:25	03-11-11	14:36
41	Cozido à Portuguesa (carne de vaca e porco, orelha, chispe, chouriço, toucinho, batata e couve)	I	U.C.C.	03-11-11	11:48	03-11-11	14:39
42	Cozido à Portuguesa (carne de vaca e porco, orelha, chispe, chouriço, toucinho, batata e couve)	I	Lar Idosos	03-11-11	12:03	03-11-11	14:41
43	Frango assado c/ arroz e salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	07-11-11	11:44	08-11-11	14:36

Número da amostra	Amostra analisada	Grupo da amostra	Local da colheita	Dia da colheita	Hora da colheita	Dia da análise	Hora da análise
44	Frango assado c/ arroz de cenoura e salada de alface e tomate	II	U.C.C.	07-11-11	12:15	08-11-11	14:39
45	Frango assado c/ puré e salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	07-11-11	12:27	08-11-11	14:41
46	Maruca no forno c/ batata cozida e salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	08-11-11	11:22	09-11-11	11:10
47	Maruca no forno c/ batata cozida	I	U.C.C.	08-11-11	11:46	09-11-11	11:13
48	Maruca no forno c/ batata cozida	I	Lar Idosos	08-11-11	12:00	09-11-11	11:16
49	Filetes c/ arroz de tomate e salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	14-11-11	11:41	15-11-11	14:29
50	Caldeirada de Abrótea c/ salada de alface e tomate	II	U.C.C.	14-11-11	12:06	15-11-11	14:31
51	Caldeirada de Abrótea	I	Lar Idosos	14-11-11	12:25	15-11-11	14:35
52	Frango de molho c/ esparguete	I	Creche e Jardim Infância	15-11-11	11:23	16-11-11	11:47
53	Frango estufado c/ esparguete e cogumelos salteados	I	U.C.C.	15-11-11	11:50	16-11-11	11:50
54	Frango assado c/ arroz de cenoura e salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	15-11-11	12:05	16-11-11	11:52
55	Hambúrguer c/ arroz de cenoura	I	Creche e Jardim Infância	21-11-11	11:45	22-11-11	14:14
56	Arroz de Pato c/ salada de alface e tomate	II	U.C.C.	21-11-11	12:10	22-11-11	14:17
57	Arroz de Pato c/ salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	21-11-11	12:25	22-11-11	14:19
58	Salada Russa (Atum, batata, ovo, cenoura e ervilhas)	I	Creche e Jardim Infância	22-11-11	11:11	23-11-11	10:20
59	Salada Russa (Atum, batata, ovo, cenoura e ervilhas)	I	U.C.C.	22-11-11	11:32	23-11-11	10:22
60	Red fish no forno c/ batata cozida	I	Lar Idosos	22-11-11	11:46	23-11-11	10:24
61	Douradinhos c/ arroz de tomate e salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	28-11-11	11:44	29-11-11	14:20
62	Bacalhau à Santa Casa c/ batata cozida	I	U.C.C.	28-11-11	12:10	29-11-11	14:23
63	Bacalhau no forno c/ ovo e batata cozida	I	Lar Idosos	28-11-11	12:20	29-11-11	14:25
64	Carne de Porco estufado c/ massa espiral	I	Creche e Jardim Infância	29-11-11	11:14	29-11-11	14:28
65	Empadão de carne	I	U.C.C.	29-11-11	11:40	29-11-11	14:30
66	Coelho no forno c/ arroz branco	I	Lar Idosos	29-11-11	12:00	29-11-11	14:32
67	Peru de molho c/ puré e ervilhas estufadas	I	Creche e Jardim Infância	05-12-11	11:46	06-12-11	14:28
68	Peru estufado c/ puré e ervilhas estufadas e salada de alface e tomate	II	U.C.C.	05-12-11	12:13	06-12-11	14:31
69	Sopa da Pedra (batata, feijão vermelho, feijão verde, couve, cenoura, carne de Porco e toucinho)	I	Lar Idosos	05-12-11	12:27	06-12-11	14:34
70	Perca no forno c/ batata cozida e salada de alface e tomate	II	Creche e Jardim Infância	06-12-11	11:16	06-12-11	14:37
71	Massinha de Cação	I	U.C.C.	06-12-11	11:38	06-12-11	14:39
72	Bifanas de cebolada c/ arroz Primavera e salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	06-12-11	11:52	06-12-11	14:43
73	Bacalhau cozido c/ batata cozida e salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	12-12-11	11:49	13-12-11	14:38
74	Bacalhau no forno c/ batata cozida e salada de alface e tomate	II	U.C.C.	12-12-11	12:16	13-12-11	14:42
75	Caldeirada de Choco	I	Lar Idosos	12-12-11	12:28	13-12-11	14:44
76	Panados de Frango c/ arroz de cenoura e salada de alface	II	Creche e Jardim Infância	13-12-11	11:25	13-12-11	14:46
77	Bifes de Peru de cebolada c/ arroz de cenoura	I	U.C.C.	13-12-11	11:50	13-12-11	14:49
78	Frango frito c/ arroz branco e salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	13-12-11	12:05	13-12-11	14:52
79	Peru estufado c/ ervilhas estufadas e puré	I	Creche e Jardim Infância	19-12-11	11:43	20-12-11	14:13
80	Peru estufado c/ arroz de cenoura e salada de alface e tomate	II	U.C.C.	19-12-11	12:07	20-12-11	14:19
81	Arroz à Valenciana	I	Lar Idosos	19-12-11	12:24	20-12-11	14:21
82	Maruca cozida c/ batata cozida e salada de alface e tomate	II	Creche e Jardim Infância	20-12-11	11:13	21-12-11	11:32
83	Bacalhau espiritual	I	U.C.C.	20-12-11	11:41	21-12-11	11:35
84	Bacalhau espiritual c/ salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	20-12-11	11:55	21-12-11	11:39
85	Massinha de Cação	I	Creche e Jardim Infância	26-12-11	11:41	27-12-11	14:27
86	Massinha de Cação	I	U.C.C.	26-12-11	11:59	27-12-11	14:30
87	Pataniscas de Bacalhau c/ arroz de feijão e salada de alface e tomate	II	Lar Idosos	26-12-11	12:15	27-12-11	14:32
88	Arroz de Pato	I	Creche e Jardim Infância	27-12-11	11:20	27-12-11	14:37
89	Arroz de Pato c/ salada de alface e tomate	II	U.C.C.	27-12-11	11:43	27-12-11	14:40
90	Arroz de Pato	I	Lar Idosos	27-12-11	11:57	27-12-11	14:42

4. Quadro de Leitura *Listeria monocytogenes*:

QUADRO DE LEITURA				
TESTES	COMPONENTES ACTIVOS	QTD (mg/cúp.)	REACÇÕES	RESULTADOS
				NEGATIVO POSITIVO
[DIM]	Substrato enzimático	0,106	Diferenciação <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	ZYM B / < 3 min laranja pálido beige rosado beige acinzentado laranja
ESC	Esculina Citrato de ferro	0,16 0,024	hidrólise (ESCulina)	amarelo pálido negro
αMAN	4-nitrofenil-αD- manopiranosido	0,045	α-MANosidase	incolor amarelo
DARL	D-Arabitól	0,4	acidificação (D-Arabitól)	vermelho / vermelho alaranjado amarelo / amarelo alaranjado
XYL	D-Xylose	0,4	acidificação (XYlose)	
RHA	L-Rhamnose	0,4	acidificação (RHAmmose)	
MDG	Metil-αD-glucopiranosido	0,4	acidificação (Metil-αD-Glucopiranosido)	
RIB	D-Ribose	0,4	acidificação (RIBose)	
G1P	Glucose-1-Fosfato	0,4	acidificação (Glucose-1-Fosfato)	
TAG	D-Tagatose	0,4	acidificação (TAGatose)	

- As quantidades indicadas podem ser ajustadas em função dos títulos das matérias-primas.
- Algumas cúpulas contêm componentes de origem animal, nomeadamente peptonas.

5. Quadro de Leitura API20E:

QUADRO DE LEITURA				
TESTES	COMPONENTES ACTIVOS	QTD (mg/cúp.)	REACÇÕES/ENZIMAS	RESULTADOS
				NEGATIVO POSITIVO
ONPG	2-nitrofenil-βD- galactopiranosida	0,223	β-galactosidase (Orto Nitrofenil-βD- Galactopiranosidase)	incolor amarelo (1)
ADH	L-arginina	1,9	Arginina DiHidrolase	amarelo vermelho / alaranjado (2)
LOC	L-lisina	1,9	Lisina DesCarboxilase	amarelo vermelho / alaranjado (2)
ODC	L-ornitina	1,9	Ornitina DesCarboxilase	amarelo vermelho / alaranjado (2)
[CIT]	Citrato de sódio	0,756	Utilização do CITrato	verde pálido / amarelo azul-esverdeado / azul (3)
H ₂ S	Tiosulfato de sódio	0,075	Produção de H ₂ S	incolor / acinzentado depósito negro / orla fina
URE	Ureia	0,76	UREase	amarelo vermelho / alaranjado (2)
TDA	L-triptofano	0,38	Triptofano DesAminase	TDA / imediato amarelo castanho-avermelhado
IND	L-triptofano	0,19	Produção de INDol	JAMES / imediato incolor rosa verde pálido / amarelo
[VP]	Piruvato de sódio	1,9	Produção de acetoina (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min incolor / rosa pálido rosa / vermelho (5)
[GEL]	Gelatina (origem bovina)	0,6	Gelatinase (GELatina)	não difusão difusão do pigmento negro
GLU	D-glucose	1,9	fermentação / oxidação (GLUcose) (4)	azul / azul-esverdeado amarelo / amarelo acinzentado
MAN	D-manitol	1,9	fermentação / oxidação (MANitol) (4)	azul / azul-esverdeado amarelo
INO	Inositol	1,9	fermentação / oxidação (INOsitol) (4)	azul / azul-esverdeado amarelo
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentação / oxidação (SORbitol) (4)	azul / azul-esverdeado amarelo
RHA	L-ramnose	1,9	fermentação / oxidação (RAMnose) (4)	Azul / azul-esverdeado amarelo
SAC	D-sacarose	1,9	fermentação / oxidação (SACarose) (4)	azul / azul-esverdeado amarelo
MEL	D-melibiose	1,9	fermentação / oxidação (MELibiose) (4)	azul / azul-esverdeado amarelo
AMY	Amigdalina	0,57	Fermentação / oxidação (AMIdalina) (4)	azul / azul-esverdeado amarelo
ARA	L-arabinose	1,9	fermentação / oxidação (ARABinose) (4)	Azul / azul-esverdeado amarelo
OX	(consultar o folheto informativo do teste oxidase)		Citocromo-Oxidase	(consultar o folheto informativo do teste oxidase)

- (1) Uma cor amarela muito ligeira é também positiva.
- (2) Uma cor laranja após 36-48 h de incubação deve ser considerada negativa.
- (3) Leitura na cúpula (zona aeróbia).
- (4) A fermentação começa na parte inferior dos tubos, a oxidação começa na cúpula.
- (5) Uma ligeira coloração rosa depois de 10 minutos deve ser considerada negativa.
- As quantidades indicadas podem ser ajustadas em função dos títulos das matérias-primas.
- Algumas cúpulas contêm componentes de origem animal, nomeadamente, peptonas.

6. Questionário:

QUESTIONÁRIO – HIGIENE E SEGURANÇA ALIMENTAR

O presente inquérito faz parte de uma dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar e Saúde Pública, do Instituto Superior de Ciências da Saúde e tem como objectivo a avaliação dos conhecimentos de Higiene e Segurança Alimentar dos colaboradores relacionados com a área alimentar de uma Instituição Particular de Solidariedade Social (IPSS). Este questionário é composto por 16 perguntas de resposta rápida e demora cerca de 5 minutos a ser respondido.

É totalmente anónimo e confidencial.

1. Idade? _____ anos

2. O seu sexo é:

Feminino

☐

Masculino

☐

3. Indique por favor o seu nível de escolaridade

Ensino Primário (1º, 2º, 3º e 4º ano)

☐

Ensino Básico (5º ao 9º ano)

☐

Ensino Secundário (10º, 11º e 12º ano)

☐

Ensino Superior

☐

4. Qual a função que desempenha?

Cozinheira

☐

Ajudante de Cozinha

☐

Refeitório

☐

Central de Compras

☐

Responsável da Cozinha

☐

Outro

☐

5. Já alguma vez teve formação em Higiene e Segurança Alimentar?

Sim

☐

Não

☐

6. Se já teve formação em Higiene e Segurança Alimentar, indique:
Número de Formações _____.

7. Considera-se uma pessoa preocupada com a Higiene e Segurança Alimentar?

Sim

☐

Não

☐

8. Sabe o que é um Microrganismo?

Sim

☐

Não

☐

9. Sabe o que é o Sistema HACCP?

Sim

☐

Não

☐

10. Quais destes perigos (bactérias, fungos, parasitas e vírus) conhece?

Salmonella

☐

Escherichia coli

☐

Staphylococcus aureus

☐

Listeria monocytogenes

☐

Aspergillus flavus

☐

Taenia saginata

☐

Vírus Norwalk

☐

11. Quais destes alimentos são mais propícios de serem contaminado por bactérias?

Qualidade Microbiológica das Refeições Servidas e das Condições de Higiene numa IPSS

Pão	☐
Carne de vaca crua	☐
Arroz cozido	☐
Ovos	☐
Salada de alface e tomate	☐
Bacalhau salgado	☐

12. Acha que se deve desinfectar os alimentos consumidos crus (exemplo: salada de alface e tomate)?

Sim ☐

Não ☐

13. Acha que comer alimentos mal cozinhados pode trazer algum problema para a saúde (exemplo: bife de vaca mal passado)?

Sim ☐

Não ☐

14. A que temperatura é que deve estar um frigorífico?

$\leq 5^{\circ}\text{C}$ ☐

6 a 7°C ☐

8 a 10°C ☐

15. E a que temperatura é que deve estar um congelador?

-7°C a -9°C ☐

-10 a -14°C ☐

$\leq -15^{\circ}\text{C}$ ☐

16. Quem é que acha que são as pessoas mais sensíveis a apanhar uma doença proveniente de um alimento?

Idosos	☐
Jovens	☐
Grávidas	☐
Crianças	☐

Agradeço a sua Colaboração!

Elaborado por: Daniela Fernandes

7. Lista de Verificação:

Formação, Saúde e Higiene Pessoal			
	Pergunta	Resposta	Observações
1	Todos os funcionários têm formação, devidamente registada, em higiene dos géneros alimentícios?		
2	Existe um plano de formação anual?		
3	Foi efectuado exame médico completo no início da sua actividade e, pelo menos, uma vez por ano ou uma vez de dois em dois anos, nos termos do Código do Trabalho e legislação complementar?		
4	O vestuário é adequado às funções? Roupa limpa, apropriada, exclusiva de trabalho e de cor clara.		
5	Ausência de objectos de adorno? Anéis, relógios, brincos, etc.		
6	Existe um controlo de acesso de pessoal e visitas de modo a prevenir contaminações?		
7	Lavatórios de comando não manual, exclusivos para mãos?		
8	Em número suficiente e a funcionar correctamente?		
9	Equipados com os meios de lavagem, desinfecção e secagem das mãos?		
10	Uso correcto de luvas descartáveis?		
11	Sanitários / Vestiários devidamente isolados das zonas de laboração, com correcta ventilação e manutenção?		
Instalações e Equipamentos			
	Pergunta	Resposta	Observações
12	Água	Existe um programa de vigilância do abastecimento de água?	
13		Existem registos dos ensaios efectuados?	
14	Condições gerais de armazenagem de produtos	Estão protegidos de raios solares ou outras fontes de calor?	
15		Estão colocados sobre estrados ou prateleiras?	
16		Estão a temperaturas adequadas?	
17		Estão bem identificados?	
18		É efectuada a descartonagem?	
19		Local próprio para vasilhame, batatas e cebolas?	
20		Local próprio para produtos de higiene, limpeza e desinfecção?	
Instalações e Equipamentos (cont)			
21	Área da cozinha	A concepção da cozinha, permite "a marcha em frente", impedindo o cruzamento entre circuitos limpos e circuitos sujos?	
22		Com zonas delimitadas e de dimensão adequada ao volume de refeições?	
23		As superfícies em contacto com os alimentos são lisas, não absorventes, não tóxicas e resistentes à lavagem e desinfecção?	
24		Em bom estado de manutenção e limpeza?	
25		O pavimento é impermeável , não absorvente e lavável?	
26		Em bom estado de manutenção e limpeza?	
27		As paredes são impermeáveis, não absorventes e laváveis?	
28		Em bom estado de manutenção e limpeza?	
29		Tectos revestidos e laváveis?	
30		Tectos e estruturas instaladas em bom estado de manutenção e limpeza?	
31	Protecção de animais/pragas indesejáveis	Iluminação adequada, com protecção das lâmpadas?	
32		A ventilação / exaustão é adequada?	
33		As portas de acesso ao exterior encontram-se permanentemente fechadas?	
34		Redes mosquiteiras nas janelas?	
35	Condições gerais	Insectocutor funcional?	
36		Insectocutor bem localizado?	
37		É executado um programa de prevenção/controlo de pragas, por profissionais especializados?	
38		Utensílios em quantidade adequada ao volume/tipo de refeições servidas?	
39	Condições gerais	Loiças e utensílios limpos, protegidos de contaminação?	
40		Em bom estado de manutenção e higiene?	
41		Existe equipamento que permita manter os géneros alimentícios nas suas diversas etapas (armazenagem, preparação, confeccão e distribuição), a temperaturas	

	adequadas?		
42	Existe equipamento de lavagem mecânica da loiça de acordo com as necessidades e a funcionar adequadamente?		
43	Existe um programa de manutenção preventiva dos equipamentos?		
44	Placas de corte em número suficiente, e com funções pré-determinadas?		
45	Os recipientes para o lixo, têm tampa accionada por pedal e são forrados com sacos de plástico?		
46	Em bom estado de manutenção e higiene?		

Refrigeração / Congelação

	Pergunta	Resposta	Observações
47	Equipamentos em bom estado de higiene e manutenção?		
48	Monitorização e registo de temperaturas dos equipamentos da rede de frio, no início e fim de cada turno?		
49	As temperaturas registadas são adequadas?		
50	Observa-se a implementação de medidas correctivas aos desvios registados?		
51	Produtos crus e cozinhados, guardados separadamente?		
52	Acondicionados correctamente, protegidos de contaminações?		
53	Descongelação em frigorífico?		
54	Produtos em processo de descongelação estão em recipientes adequados para o efeito?		

Confecção e Distribuição de Refeições

	Pergunta	Resposta	Observações
55	Equipamentos em bom estado de higiene e manutenção?		
56	Monitorização e registo de temperaturas de manutenção a quente no início e fim de cada turno?		
57	As temperaturas registadas são adequadas?		
58	Observa-se a implementação de medidas correctivas aos desvios registados?		
59	No caso de transporte de refeições para o exterior da unidade, os meios de transporte garantem a temperatura e higiene dos alimentos?		

Boas Práticas

	Pergunta	Resposta	Observações
60	É efectuado um controlo adequado na recepção de géneros alimentícios? Higiene, temperatura, estado da embalagem, data limite de consumo.		
61	Existe sistema de rastreabilidade dos géneros alimentícios utilizados?		
62	Identificação das tarefas sujas/limpas e cumprimento de respectiva separação em espaço/tempo?		
63	Exposição à temperatura ambiente dos géneros alimentícios (sobretudo os de origem animal), durante a sua preparação, inferior a 30 minutos?		
64	Uso de papel industrial, em substituição de panos?		
65	Observa-se a não acumulação de resíduos nas áreas de armazenagem e manipulação dos alimentos ou outras áreas de trabalho?		
66	Existe um programa escrito de limpeza e desinfeção do estabelecimento e equipamentos?		
67	A higiene das instalações e equipamentos é adequada e mantida eficazmente?		
68	Existe controlo da qualidade dos óleos de fritura, e adopção de medidas minimizadoras da sua degradação?		
69	Existe um programa de eliminação de resíduos selectiva para óleos?		
70	Recolha correcta e manutenção adequada das amostras testemunha da confecção diária?		

8. Resultados obtidos nas análises microbiológicas:

Nº Amos	Grupo	M.30º	Log M.30º	Lev	Log Lev	Bol	Log Bol	Enter	Log Enter	E.coli	Logo E.coli	C.perf	Log C.perf	S.aure	Log S.aure	Bacill	Log Bacill	List	Salmonella	Resultado
1	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
2	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
3	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
4	1	3,00E+01	1,47					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
5	2	2,40E+04	4,38	< 1,0E+02	0	1,00E+02	2	5,40E+02	2,73	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
6	2	1,00E+05	5	2,40E+03	3,38	< 1,0E+02	0	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
7	2	2,90E+02	2,46	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
8	2	3,90E+03	3,59	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	2,00E+01	1,30	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
9	2	2,50E+04	4,39	1,00E+02	2	< 1,0E+02	0	2,50E+03	3,39	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
10	1	4,00E+01	1,60					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
11	2	3,60E+04	4,55	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,30E+03	3,11	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
12	1	3,40E+03	3,53					6,40E+01	1,80	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
13	2	9,40E+04	4,97	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	4,00E+03	3,60	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	1,00E+02	2	< 1,0E+01	Ausente	NS
14	1	8,60E+03	3,93					2,00E+01	1,30	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	2,00E+02	2,30	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
15	2	1,70E+04	4,23	2,00E+02	2,30	< 1,0E+02	0	3,30E+03	3,51	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
16	1	5,00E+01	1,69					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
17	2	1,90E+05	5,27	3,00E+02	2,47	< 1,0E+02	0	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
18	2	3,00E+05	5,47	1,10E+03	3,04	1,00E+02	2	1,50E+04	4,17	1,00E+01	1	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
19	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
20	2	2,10E+04	4,32	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,20E+03	3,07	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
21	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
22	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
23	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
24	2	2,60E+04	4,41	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,10E+03	3,04	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
25	2	2,00E+01	1,30	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
26	2	2,60E+05	5,41	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
27	2	2,70E+05	5,43	6,00E+02	2,77	< 1,0E+02	0	1,50E+04	4,17	1,00E+01	1	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
28	2	8,00E+02	2,90	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
29	1	1,00E+01	1					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
30	1	1,40E+02	2,14					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
31	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
32	2	2,30E+04	4,36	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	7,00E+02	2,84	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
33	2	2,90E+05	5,46	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
34	2	2,10E+04	4,32	1,00E+02	2	< 1,0E+02	0	5,80E+02	2,76	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
35	1	5,50E+02	2,74					3,50E+02	2,54	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
36	2	2,30E+05	5,36	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
37	1	7,00E+02	2,84					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
38	1	2,40E+03	3,38					4,00E+01	1,60	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
39	1	1,10E+04	4,04					1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
40	1	2,40E+02	2,38					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
41	1	1,00E+02	2					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
42	1	4,00E+01	1,60					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
43	2	6,00E+04	4,77	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	6,10E+02	2,78	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
44	2	3,40E+04	4,53	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	4,90E+02	2,69	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
45	2	7,30E+05	5,86	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,00E+03	3	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS

Qualidade Microbiológica das Refeições Servidas e das Condições de Higiene numa IPSS

46	2	5,60E+04	4,74	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,40E+03	3,14	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
47	1	1,30E+04	4,11					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
48	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
49	2	4,30E+04	4,63	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	6,20E+02	2,79	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
50	2	7,00E+04	4,84	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	6,80E+02	2,83	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
51	1	5,00E+01	1,69					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
52	1	4,10E+03	3,61					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
53	1	8,20E+01	1,91					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
54	2	3,00E+06	6,47	1,00E+02	2	< 1,0E+02	0	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
55	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
56	2	2,90E+04	4,46	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	5,40E+01	1,73	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
57	2	2,30E+04	4,36	6,40E+02	2,80	9,10E+02	2,95	6,20E+03	3,79	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
58	1	1,00E+03	3					1,00E+01	1	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
59	1	1,40E+03	3,14					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
60	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
61	2	1,10E+03	3,04	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
62	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
63	2	2,00E+04	4,30	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	9,20E+02	2,96	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
64	1	2,00E+01	1,30					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
65	1	3,00E+01	1,47					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
66	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
67	1	6,40E+02	2,80					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
68	2	2,40E+04	4,38	1,00E+02	2	< 1,0E+02	0	2,90E+03	3,46	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	1,00E+02	2	< 1,0E+01	Ausente	NS
69	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
70	2	6,60E+04	4,81	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	3,40E+02	2,53	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
71	1	2,00E+04	4,30					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
72	2	4,70E+04	4,67	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,10E+02	2,04	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
73	2	2,70E+04	4,43	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,30E+02	2,11	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	1,00E+02	2	< 1,0E+01	Ausente	A
74	2	1,40E+05	5,14	< 1,0E+02	0	1,00E+02	2	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
75	1	2,00E+01	1,30					2,00E+01	1,30	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
76	2	3,40E+04	4,53	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	2,70E+02	2,43	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	1,00E+02	2	< 1,0E+01	Ausente	A
77	1	3,00E+01	1,47					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
78	2	4,30E+04	4,63	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	4,90E+02	2,69	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
79	1	2,90E+03	3,46					3,00E+01	1,47	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	2,00E+02	2,30	< 1,0E+01	Ausente	A
80	2	1,20E+05	5,07	1,00E+02	2	< 1,0E+02	0	1,50E+04	4,17	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
81	1	3,00E+01	1,47					1,00E+01	1	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
82	2	1,40E+04	4,14	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	5,00E+01	1,69	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
83	1	< 1,0E+01	0					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
84	2	1,40E+04	4,14	< 1,0E+02	0	1,00E+02	2	9,60E+02	2,98	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
85	1	5,30E+02	2,72					1,00E+01	1	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
86	1	1,00E+01	1					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	S
87	2	1,50E+03	3,17	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,00E+03	3	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
88	1	2,30E+02	2,36					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A
89	2	4,80E+03	3,68	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	1,30E+03	3,11	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	NS
90	1	1,60E+02	2,20					< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+01	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+02	0	< 1,0E+01	Ausente	A

Legenda: Roxo – Cozinha CJI; Azul – Cozinha UCC; Laranja – Cozinha LI. S – Satisfatório; A – Aceitável; NS – Não Satisfatório;